

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université AbouBakr Belkaïd Tlemcen

Faculté des Sciences
Département de Physique

Inscrit Sous le N°:
Date le: ...02 MARS 2011.....
Code: ...4606.....

THESE

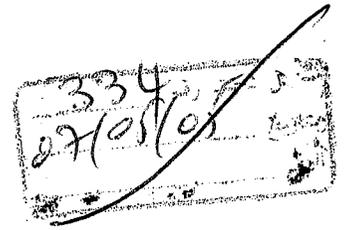
En vue de l'obtention du Diplôme de
Doctorat

Présenté par Mr MERZOUK Sid Ahmèd

Thème

**Application de méthodes expérimentales Physico-Chimiques
à l'étude du métabolisme lipidique chez les diabétiques**

Soutenue le	2005,	devant le jury
Professeur BENYOUCEF B.		Président
Professeur CHABANE SARI Nasr Eddine		Directeur de Thèse
Professeur TALEB BENDIAB S.A.		Examineur
Professeur KAJIMA M.		Examineur
Professeur KADOUN A.		Examineur

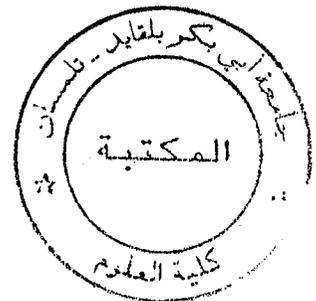


REMERCIEMENTS

J'ai décidé de démarrer cette Thèse suite aux encouragements et aux bons conseils de mon directeur de Thèse le Professeur Chabane Sari Nasr Eddine, qu'il trouve ici mes vifs et sincères remerciements.

Ce travail a été réalisé grâce à ma chère femme Hafida, qui m'a constamment soutenu et convaincu par son exemple de persévérance et d'aboutissement. Je remercie ainsi toute l'équipe de Dijon, particulièrement le Professeur N. Khan, ainsi que le couple Aziz et Sihem qui m'ont aidé sérieusement à l'accès, l'apprentissage et l'utilisation de certaines techniques physiques disponibles utilisés en biologie.

Je remercie également les Professeurs Benyoucef B., Taleb Bendiab SA., Kajima M. et Kadoun A. pour avoir bien voulu présider et examiner ce travail.



SOMMAIRE

	<i>Pages</i>
INTRODUCTION	1
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE DE TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUE UTILISEES EN BIOLOGIE	4
I. LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE), Application de la RPE à la mesure de la fluidité d'un milieu biologique	5
1. GENERALITE	5
2. LA MEMBRANE CELLULAIRE	5
3. LA FLUIDITE	6
4. IMPACT DE LA FLUIDITE	8
5. INTRODUCTION A LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)	9
6. THEORIE DE LA RPE	9
7. LES INTERACTIONS DE ZEEMAN	10
8. RELAXATION ET SATURATION	11
9. LE COUPLAGE HYPERFIN	11
10. APPLICATION DE LA RPE A L'ETUDE DE LA FLUIDITE	14
11. CALCUL DU PARAMETRE D'ORDRE S	16
II. LA CHROMATOGRAPHIE	17
<u>II.1. La chromatographie, généralités</u>	17
1. HISTORIQUE	17
2. GENERALITES	17
3. DEFINITION	18
4. LES DIFFERENTS TYPES DE TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	19
4.1. <i>Classification selon la nature des phases</i>	19
4.2. <i>Classification selon le phénomène chromatographique (mécanismes de séparation)</i>	20
4.3. <i>Classification selon les procédés utilisés</i>	28
5. DESCRIPTION ET PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE	29
6. REVELATION	31

	<i>Pages</i>
II.2. <u>La chromatographie en phase gazeuse (CPG)</u>	32
1. HISTORIQUE	32
2. GENERALITES	32
3. DESCRIPTION	33
4. INSTRUMENTATION	34
4.1. Le gaz	35
4.2. Les échantillons	35
4.3. L'injecteur	36
4.4. La colonne	37
4.5. Le détecteur	38
Description du détecteur à ionisation de flamme	40
II.3. <u>La chromatographie liquide à haute pression (HPLC)</u>	43
1. HISTORIQUE	43
2. GENERALITE	43
3. DOMAINES D'APPLICATION	45
4. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT	46
5. INSTRUMENTATION	47
5.1. Le réservoir	47
5.2. La pompe	48
5.3. L'injecteur	48
5.4. La Colonne	49
5.5. Les détecteurs	50
Description du spectrophotomètre UV-visible	50
Le Réfractomètre	52
5.6. Solvants	52
5.7. Précautions Générales	53
III. LA SPECTROFLUORIMETRIE, APPLICATION POUR LA MESURE DE L'ORAC (Capacité d'Absorption des Radicaux Oxygènes)	54
1. LES RADICAUX LIBRES	54
2. LE STRESS OXYDATIF	54
3. LE POUVOIR ANTIOXYDANT (ORAC)	55
4. LA FLUORIMETRIE	55
5. LE SPECTROFLUORIMETRE	58

	<i>Pages</i>
MATERIEL ET METHODES	60
I. Les échantillons biologiques	61
II. Les Méthodes utilisées	61
II.1. <u>Séparation des lipoprotéines par ultracentrifugation</u>	61
II.1.1. <i>Isolement des lipoprotéines de densité < 1,21g/ml</i>	61
II.1.2. <i>Isolement des fractions VLDL, LDL et HDL à partir des lipoprotéines totales (d<1,21g/ml)</i>	62
II.1.3. <i>Isolement des membranes des globules rouges</i>	62
II.1.3. <i>Isolement des lymphocytes</i>	65
II.2. <u>Détermination de la composition en acides gras des lipides membranaires par chromatographie gazeuse (CPG)</u>	65
II.3. <u>Dosage des vitamines A et E par chromatographie liquide haute performance (HPLC)</u>	66
II.4. <u>Détermination du pouvoir antioxydant total (ORAC) par fluorimétrie</u>	67
II.5. <u>Mesure de la fluidité par RPE (résonance paramagnétique électronique)</u>	68
II.5.1. <i>Mesure de la fluidité des membranes microsomales par RPE</i>	68
5.1.1. <i>Préparation des microsomes hépatiques</i>	68
5.1.2. <i>Application de la RPE à l'étude de la fluidité des membranes microsomales</i>	69
II.5.2. <i>Mesure de la fluidité des lipoprotéines par RPE,</i>	70
<i>Mesure du paramètre d'ordre S</i>	70
III. Analyse statistique	71
RESULTATS ET DISCUSSIONS	72
I. Composition en acides gras des phospholipides membranaires déterminée par CPG	73
I.1. <u>Composition en AG des phospholipides (PL) des membranes de globules Rouges</u>	73
I.2. <u>Composition en AG des membranes des lymphocytes</u>	77
II. Teneurs sériques en vitamines A et E analysées par HPLC	77
III. Pouvoir antioxydant total (ORAC) déterminé par fluorimétrie	81
IV. Fluidité des membranes et des lipoprotéines déterminée par la RPE	83
IV.1. <u>Fluidité des membranes</u>	83
IV.2. <u>Fluidité des lipoprotéines LDL</u>	87
CONCLUSION	90
GLOSSAIRE : Sous forme de dictionnaire nous donnons les connaissances succinctes et les explications nécessaires des mots biologiques qui apparaissent au cours de cette thèse.	91
BIBLIOGRAPHIE	99
PUBLICATION	106

INTRODUCTION

La recherche scientifique et ses retombés ont permis un impressionnant développement de la technologie. Actuellement les chercheurs dans tous les domaines disposent de moyens expérimentaux, des outils et des machines de travail, qui permettent la mesure de plus en plus précise de paramètres correspondant à des phénomènes naturels de plus en plus petits.

En biologie, science de la vie, l'utilisation de méthodes expérimentales, particulièrement physique, est non seulement courantes, nécessaires mais devenu indispensable pour une meilleure étude et compréhension du fonctionnement des processus au niveau moléculaire.

L'activité des physiciens autour de thématiques relevant de la biologie et de la médecine a eu de nombreux bénéfices pratiques, conduisant à des découvertes biologiques importantes pour la santé et la prospérité future. Les tests génétiques, l'amélioration des aliments, l'invention de nouveaux médicaments, l'étude de l'environnement et l'étude du corps humain sont les aspects fondamentaux de l'interface physique-biologie (Baker PT 1992; Honig B et al. 1995; Gould GW 2001; Root DE et al. 2002; Walsh SJ 2004).

Les progrès considérables réalisés en biologie au cours des 50 dernières années sont dus en partie à la mise au point de techniques d'analyse performantes basées sur les notions de la physique. Les développements les plus spectaculaires ont eu lieu dans l'étude des molécules uniques: les nouvelles techniques de micromanipulations et d'observation permettent de localiser et de travailler sur une molécule importante de la vie, l'ADN (acide desoxydribonucléique, base moléculaire du génome (Root DE et al. 2002; Walsh SJ 2004; Kitano H 2002)).

Cependant, les notions de la physique touchent d'autres aspects de la biologie, permettant, par exemple, de quantifier et de conceptualiser la mécanique cellulaire comme la mobilité et l'adhésion, de modéliser les réactions biochimiques et même de simuler le fonctionnement cellulaire (Foren S et al. 1996; Slepchenko BM et al. 2002; Schmalzriedt S et al. 2003). Par ailleurs, la médecine moderne s'appuie de plus en plus sur les méthodes physiques pour le diagnostic, le contrôle et la prévention des maladies. En effet, l'observation des cellules par l'intermédiaire des propriétés physiques des molécules et des atomes qui les constituent permet de comprendre le fonctionnement des cellules, d'étudier les structures atomiques et moléculaires jouant un rôle fonctionnel, d'élucider l'énergétique biologique impliquée dans le

fonctionnement des organismes et de déceler toute modification pouvant altérer le fonctionnement cellulaire et par la suite être à l'origine des maladies (Baker PT 1992; Kitano H 2002; Finter NB 1987).

L'application et le développement des méthodes physiques en médecine moderne ont permis non seulement la connaissance des différentes maladies mais aussi le développement des traitements appropriés comme vaccins, médicaments... (Wood DJ et al. 1990; Foster JR 2002).

Ainsi, il apparaît clairement que la biologie et la médecine moderne se basent sur les propriétés physico-chimiques des composants moléculaires de la matière vivante. Le développement des technologies de l'exploration du vivant, et la multiplication des moyens de mesure des systèmes biologiques ne sont pas le fait du hasard, mais l'objet d'une réflexion approfondie basée sur l'évaluation des critères de qualité des différentes techniques par les biologistes, les chimistes et les physiciens. Les méthodes physico-chimiques sont ainsi discutées en fonction de leurs performances propres appelés critères de fiabilité et d'efficacité, et en fonction de leurs facilités d'emploi ou critères de praticabilité dans les différents laboratoires d'analyse et de recherche (Vassault A 1991; Protocole de validation de techniques 1985).

La connaissance des caractéristiques des méthodes physico-chimiques est donc une information tout à fait pertinente pour l'évaluation des résultats d'analyse.

Plusieurs méthodes ont fait leur preuve dans le domaine de l'exploration des pathologies humaines. Parmi elles:

- La centrifugation et l'ultracentrifugation sont des techniques de séparation et de purification très puissantes. Les centrifugeuses sont très courantes dans les laboratoires, entraînant les préparations biologiques à des vitesses de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de milliers de tours par seconde, produisant des accélérations de milliers de gravitation sur les molécules à purifier (John Chapman M et al. 1981; Ingeborg R et al. 1986).
- Les méthodes chromatographiques sont destinées à séparer les différents constituants d'un mélange regroupent des techniques très variées dont la CPG (chromatographie en phase gazeuse), la HPLC (la chromatographie haute performance), méthodes de choix pour identifier les solutés qualitativement et quantitativement (Narce M et al. 1988; März W et al. 1993; Zaman Z et al. 1993).
- La spectrophotométrie, méthode optique, basée sur l'absorption et l'émission de la lumière par les molécules, est largement utilisée impliquant des appareillages spécifiques. La

fluorimétrie couvre un large domaine d'études biologiques (Ahluwalia A et al. 2002; Cao G et al. 1992; Delange RJ et al. 1989; Glazer AN 1988).

- La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode spectroscopique permettant la détection et l'étude des substances paramagnétiques, très utile pour évaluer la fluidité des macromolécules et des membranes biologiques (Zschornig O et al. 1993; Bittner B et al. 2000).

Dans ce travail, nous avons utilisé différentes méthodes physico-chimiques afin de contribuer à l'amélioration des performances des analyses permettant de comprendre les altérations métaboliques et cellulaires au cours du diabète sucré, maladie très courante en Algérie. En effet, l'incidence de cette pathologie est de 2 à 4% d'où l'intérêt du contrôle méthodique des explorations des différentes analyses biologiques permettant la compréhension de cette maladie. Nous avons donc procédé à l'utilisation de :

- L'Ultracentrifugation, pour séparer et isoler les lipoprotéines, complexes macromoléculaires du sérum (isolé du sang humain par centrifugation)*
- La CPG pour la détermination de la composition en acides gras (AG) des lipoprotéines et des membranes de cellules*
- La HPLC pour quantifier les vitamines A et E du sérum*
- La RPE pour évaluer la fluidité des membranes*
- La Fluorimétrie pour déterminer le statut antioxydant global au niveau du sérum.*

Ces techniques sont choisies parmi celles existantes en fonction du matériel dont dispose les laboratoires où ce travail a été réalisé, et en fonction des besoins des biologistes et des cliniciens avec lesquels nous collaborons dans le cadre d'un projet de recherche sur le diabète sucré.

Après un rappel bibliographique sur les méthodes physico-chimiques utilisée, les méthodologies et les résultats de ce travail sont présentés après exploitation multidisciplinaire.

L'objectif essentiel de ce travail est de contribuer à intégrer les connaissances acquises en physique par l'utilisation des techniques physiques possibles à une bonne compréhension de la biologie et des maladies humaines, par la maîtrise de la méthodologie et de l'esprit de la démarche scientifique.

***Rappel Bibliographique de Techniques Physico-chimique
utilisées en Biologie***

I. LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)

Application de la RPE à la mesure de la Fluidité d'un milieu Biologique

1. GENERALITES

L'étude de la fluidité, caractéristique principale des milieux biologique, représente une propriété générale du milieu considéré. Elle exprime la résistance au déplacement moléculaire dans toutes les directions de ce milieu et fait appel pour sa quantification à des techniques le plus souvent de nature spectroscopique. Nous nous intéressons ici à la résonance paramagnétique électronique (RPE), technique de choix pour déterminer les paramètres associés à la fluidité des milieux biologiques.

Le principe repose sur le fait que sous l'action d'un champ magnétique extérieur, le moment magnétique correspondant aux 2 états de spin d'un électron célibataire, d'une molécule paramagnétique, peut avoir 2 orientations possibles. Ces 2 états ont des énergies différentes et une transition entre eux peut être induite sous l'influence d'une radiation électromagnétique. L'enregistrement de la dérivée première du spectre d'absorption nous renseigne sur la mobilité de la sonde (molécule paramagnétique analogues incorporé dans le milieu à étudier).

2. LA MEMBRANE CELLULAIRE

Une caractéristique de toutes les cellules est la présence de membranes qui délimitent la cellule. La membrane biologique constitue une enveloppe mince et continu séparant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire, a de multiples fonctions : définir la cellule, maintenir l'intégrité de la cellule, contrôler les mouvements entrée et sortie des substances dans la cellule...

Le modèle membranaire en mosaïque fluide a été proposé en 1972 par Singer et Nicolson. Il est défini comme un modèle où les lipides sont organisés en une bicouche faite de phospholipides et de cholestérol, dans laquelle les protéines globulaires intrinsèques ou extrinsèques flottent telles des icebergs dans une mer d'huile. Beaucoup de protéines traversent la bicouche et sont des protéines transmembranaires (figure 1).

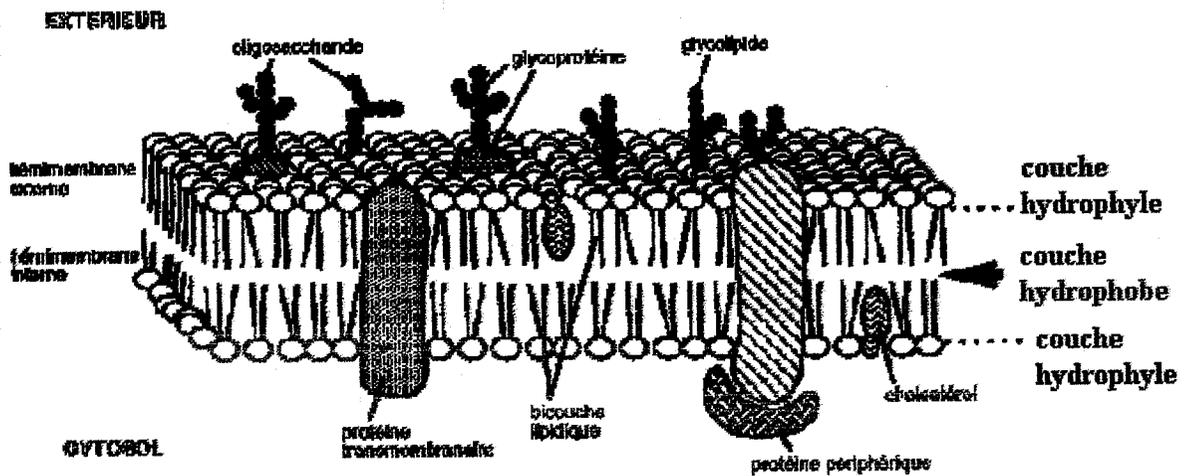


Figure 1 : Modèle de membrane plasmique en mosaïque fluide

3. LA FLUIDITE

C'est une propriété de la membrane et des lipoprotéines qui donne la possibilité à un de leur constituant (lipide ou protéine) de se déplacer au sein de la matrice lipidique.

De par leur composition chimique et leur organisation moléculaire, les lipoprotéines et les membranes sont des édifices fluides. Leurs différents constituants ont des mouvements divers. Ce qui met en mouvement le constituant peut être, soit une énergie thermique (agitation brownienne), soit un mécanisme actif d'entraînement par des protéines contractiles. Quelque soit le mécanisme l'énergie mise en jeu est très faible et la résistance de la matrice lipidique au mouvement (viscosité) est très limitante. En fait le déplacement spontané d'un constituant membranaire ne peut se faire que dans certaines directions (anisotropie de mouvement) : par exemple pour les phospholipides, la diffusion dans le plan de la bicouche (diffusion latéral) et non pas la diffusion d'un feuillet à l'autre (diffusion transversale ou flip-flop) ; La diffusion transversale du cholestérol et de différentes molécules perméantes sont aussi des mouvements moléculaires possibles et qui requièrent une certaine fluidité.

Les lipides tournent autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane, les chaînes hydrocarbonées des lipides sont flexibles et caractérisées par un mouvement de balancier plus ou moins prononcé. Ces mouvements à courte échelle confèrent à la membrane une certaine fluidité. Du fait de cette fluidité, les protéines membranaires peuvent être

animées d'une rotation sur elles-mêmes. Mais surtout, la fluidité permet des mouvements à plus longue échelle des lipides et des protéines dans le plan de la membrane : il s'agit de la diffusion latérale (figure2).

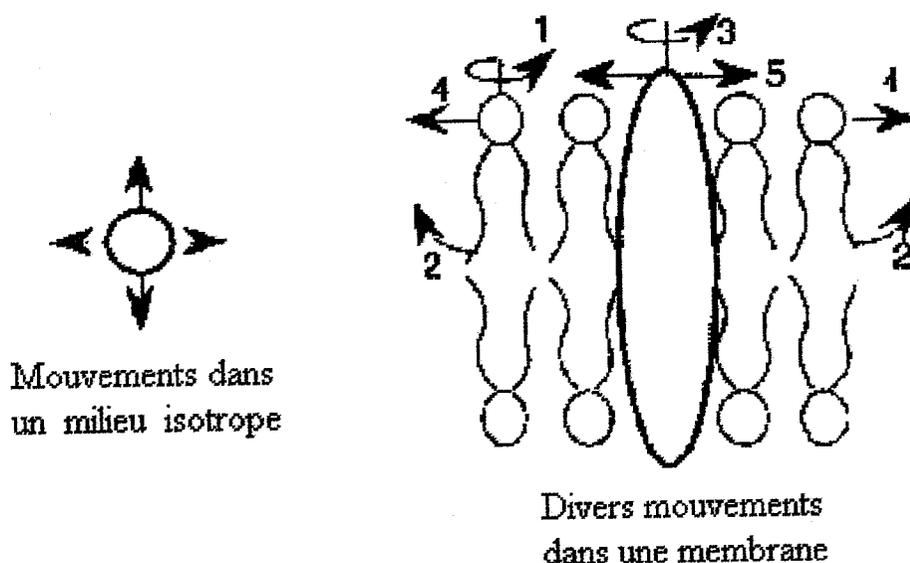


Figure 2: Les divers mouvements des constituants membranaires
1 Rotation des lipides
2 Mouvement de balancier des chaînes hydrocarbonnées
3 Rotation des protéines
4 Diffusion latérale des lipides
5 Diffusion latérale des protéines

Dans un milieu isotrope, homogène, la fluidité (ou viscosité, qui est son inverse) a une signification bien précise. Elle représente une propriété générale du milieu qui exprime la résistance au déplacement dans toutes les directions. Une membrane est un milieu anisotrope, hétérogène. La résistance au déplacement n'est pas la même dans toutes les directions. Qui plus est, dans une direction donnée elle n'est pas la même en différents endroits de la membrane. Dans ces conditions, la définition de la fluidité membranaire n'est pas simple. Le plus souvent, elle est opérationnelle : on détermine dans la membrane anisotrope un paramètre physique qui n'est relié à la fluidité ou à la viscosité de manière précise que dans un système isotrope homogène.

Ainsi pour connaître les possibilités de mouvement des molécules de la membrane on utilise des sondes moléculaires qui possèdent un groupe rapporteur fluorescent (étude par polarisation de fluorescence) ou paramagnétique (étude par résonance paramagnétique électronique, objet de notre méthode utilisée). Ce groupe rapporteur permet de suivre la position de la sonde dans l'espace en fonction du temps.

L'intervalle de temps en jeu est le temps pendant lequel la molécule sonde est excitée (temps de vie de l'état excité). Pendant cet intervalle de temps le désordre moléculaire s'accumule. L'orientation moyenne des sondes est mesurée par un paramètre d'ordre. C'est la désorientation des sondes après un intervalle de temps très court qui nous renseigne sur la fluidité de la membrane

4. IMPACT DE LA FLUIDITE

La membrane plasmique (entourant la cellule) contrôle le passage des nutriments (protéines, glucides, lipides, eau, oxygène...) indispensable au métabolisme cellulaire. La perméabilité est sélective, pour les grosses molécules la membrane possède des récepteurs spécifiques (protéines). Le processus de pénétration des nutriments se fait avec le mouvement des récepteurs, donc fonction de la fluidité membranaire. Toute altération de la fluidité dérègle le transport des nutriments et par la suite le métabolisme cellulaire.

Un fonctionnement cellulaire normal nécessite une fluidité membranaire optimale qui doit être contrôlée. Les perturbations externes (comme la température, le régime alimentaire...) qui affectent la fluidité des membranes doivent être compensées de façon à maintenir une fluidité constante. Un défaut dans la compensation de la fluidité est susceptible de provoquer une altération du fonctionnement des enzymes membranaires (une enzyme est une protéine qui catalyse une réaction biologique), ou d'induire des perturbations de la liaison ligand récepteur.

Parmi les nutriments les lipides sont apportés à la cellule par les lipoprotéines. Des études ont montré que des variations de la fluidité des lipoprotéines associées à des modifications de la composition lipidique pourraient contribuer au développement de l'athérosclérose (Tall AR et al. 1978; Kirchhausen T et al. 1979). Chez l'homme une diminution de la fluidité des LDL a été observée chez des patients atteints d'une hypercholestérolémie de type IIa (Dachet C et al., 1990, 1991). Les lipoprotéines LDL très riches en cholestérol, ont pour principal rôle le transport du cholestérol aux différentes cellules.

Comme pour la membrane, pour un bon fonctionnement des lipoprotéines, la fluidité des lipoprotéines doit être optimal et contrôlé.

Lorsque le régime alimentaire est enrichi en acides gras saturés, la fluidité du cœur des lipoprotéines est diminuée (Pownall HJ et al. 1980), et la composition en acides gras des esters de cholestérol modifiée (Shepherd J et al. 1980). Berlin E et al., 1987 ont montré que l'enrichissement du régime en acide linoléique augmente la fluidité des LDL et des HDL humaines, et que la fluidité de ces particules est dépendante de la teneur en PL et TG, respectivement. La fluidité est également modulée par la présence d'EC. De même, l'enrichissement du régime en acides gras mono insaturés provoque une augmentation de la fluidité des HDL₃, qui facilite l'efflux du cholestérol cellulaire (Sola R et al., 1993).

5. INTRODUCTION A LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE :

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une méthode spectroscopique permettant la détection et l'étude des substances paramagnétiques, c'est à dire toutes les substances contenant un ou plusieurs électrons non appariés. On citera à titre d'exemple les radicaux libres (des molécules extrêmement réactives du fait qu'elles possèdent un électron célibataire, c'est à dire un électron libre, non apparié : ions superoxydes (radical O₂⁻ très réactif), hydroxyles (présence de HO[•]), oxygène singulet), les métaux de transition, les cristaux imparfaits, les molécules gazeuses paramagnétiques, les états triplets et les électrons de conduction dans les métaux. Pour étudier la fluidité des membranes biologiques (Holtzman JL 1984), on applique la technique de sondage (ou spin-labeling) qui consiste à incorporer une molécule biochimique contenant un radical nitroxyde paramagnétique. L'étude de la structure et des mouvements des protéines membranaires est réalisée par la technique de marquage de spins consistant à greffer un radical paramagnétique par une liaison covalente sur un site stratégique de la protéine. Enfin, la technique de spin-trapping est utilisée pour le piégeage des molécules paramagnétiques afin de permettre leur dosage.

6. THEORIE DE LA RPE

Un électron célibataire d'une molécule paramagnétique possède un moment magnétique. Le mouvement de l'électron est caractérisé par un moment angulaire J qui est la résultante du moment angulaire d'orbitale L, ou mouvement de rotation de la particule autour du noyau, et du moment angulaire du spin S, ou mouvement de la particule sur elle même :

$$\mathbf{J} = \mathbf{L} + \mathbf{S} \quad (\text{en vecteurs})$$

Toute particule chargée en rotation sur elle même crée un champ magnétique local. De plus, le moment magnétique angulaire total J de l'électron étant non nul, la particule se comporte comme un dipôle magnétique. Ainsi, au moment angulaire du spin électronique est associé un moment magnétique du spin noté μ_e et défini par l'équation :

$$\mu_e = -g \cdot \beta_e \cdot S$$

g = facteur de Landé ou facteur de décomposition spectroscopique

β_e = magnéton de Bohr

S = moment angulaire intrinsèque de l'électron

En absence de champ magnétique externe H , les moments magnétiques des spins sont orientés au hasard dans l'espace.

7. LES INTERACTIONS DE ZEEMAN

En présence d'un champ magnétique externe H , continu et uniforme, les moments magnétiques s'orientent parallèlement ou anti-parallèlement à H créant ainsi 2 niveaux d'énergie distincts E ou états de Zeeman (figure 3).

Ce phénomène est aussi appelé la levée de la dégénérescence du nombre quantique de spin.

L'énergie E de ces niveaux est exprimée par l'équation : $E = -\mu_e H$

Par substitution de μ_e dans l'équation on obtient : $E = g \beta_e S H$

S peut prendre 2 valeurs qui sont $+1/2$ ou $-1/2$ correspondant respectivement à une orientation parallèle et antiparallèle du moment magnétique par rapport au champ magnétique H .

La différence d'énergie ΔE existant entre les 2 niveaux est alors définie par : $\Delta E = g \beta_e H$

A l'équilibre thermique et en présence du champ magnétique H , la répartition des spins électroniques en 2 populations se fait selon la distribution de Boltzman:

$$N^+/N^- = \exp(-\Delta E/kT)$$

N^+ = nombre d'électrons sur le niveau d'énergie E^+ le plus élevé

N^- = nombre d'électrons sur le niveau d'énergie E^- le plus bas

ΔE = différence d'énergie entre les 2 niveaux ($E^+ - E^-$)

k = constante de Boltzman ; T = température absolue

Cette distribution des spins électroniques est modifiée lorsque le champ magnétique est couplé à une onde électromagnétique de fréquence ν et d'énergie $\Delta E = h\nu$

h = constante de Plank.

Lorsque l'énergie des ondes électromagnétiques est égale à la différence d'énergie existant entre les 2 niveaux telle que:

$$\Delta E = h\nu = g \beta_e H$$

L'état de résonance est atteint, la transition des spins électroniques d'un niveau d'énergie inférieur vers un niveau d'énergie supérieur, et l'inverse, est alors possible. Les probabilités de transition des spins d'un niveau inférieur vers un niveau d'énergie supérieur (se traduisant par une absorption d'énergie), ou d'un niveau d'énergie supérieur vers un niveau d'énergie inférieur (se traduisant par une émission d'énergie) sont identiques.

Cependant, le niveau d'énergie inférieur étant le plus peuplé, le résultat global le plus favorisé est une absorption d'énergie qui se caractérise par un pic de résonance, dont la dérivée première, correspondant à une raie de résonance est présentée sur les spectres de RPE (figure 3).

D'après l'équation $\Delta E = h\nu = g \beta_e H$, l'état de résonance est dépendant de la fréquence des radiations électromagnétiques ou de l'intensité du champ magnétique H .

8. RELAXATION ET SATURATION

La relaxation du système correspond à un maintien de la population d'électrons entre les différents niveaux d'énergie et à un retour à l'état initial par réémission de l'énergie absorbée lors de l'excitation. Elle résulte d'interactions entre les spins électroniques et entre l'électron célibataire et son environnement.

La saturation du système est observée lorsque la différence de population entre les niveaux d'énergie s'annule sous l'effet d'une irradiation électromagnétique (ΔE) d'intensité trop élevée. L'augmentation de la puissance de cette onde ne s'accompagne plus d'une augmentation de l'absorption d'énergie et donc de l'intensité du signal. En pratique, une saturation de signal est obtenue lorsque la puissance des ondes exprimée en mW est trop intense. Dans nos conditions expérimentales, cette puissance est fixée à 10 mW.

9. LE COUPLAGE HYPERFIN

Le couplage hyperfin correspond à une interaction entre les moments magnétiques des électrons et les moments magnétiques nucléaires les plus proches.

Le champ magnétique externe interagit également avec le champ magnétique nucléaire provoquant la levée de la dégénérescence du nombre quantique nucléaire M .

Ainsi, pour $I=1$, M peut prendre les valeurs -1 , 0 , $+1$, correspondant à 3 niveaux d'énergie.

Le champ magnétique local (H_{loc}) produit par un moment magnétique nucléaire s'additionne au champ magnétique externe, et on obtient alors un champ magnétique effectif H_{eff} au niveau de l'électron :

$$H_{eff} = H_{loc} + H$$

Il y a $2I + 1$ valeurs de champ magnétique local. Les niveaux ainsi créés se superposent aux niveaux d'énergie électronique induits par l'effet Zeeman (figure 4).

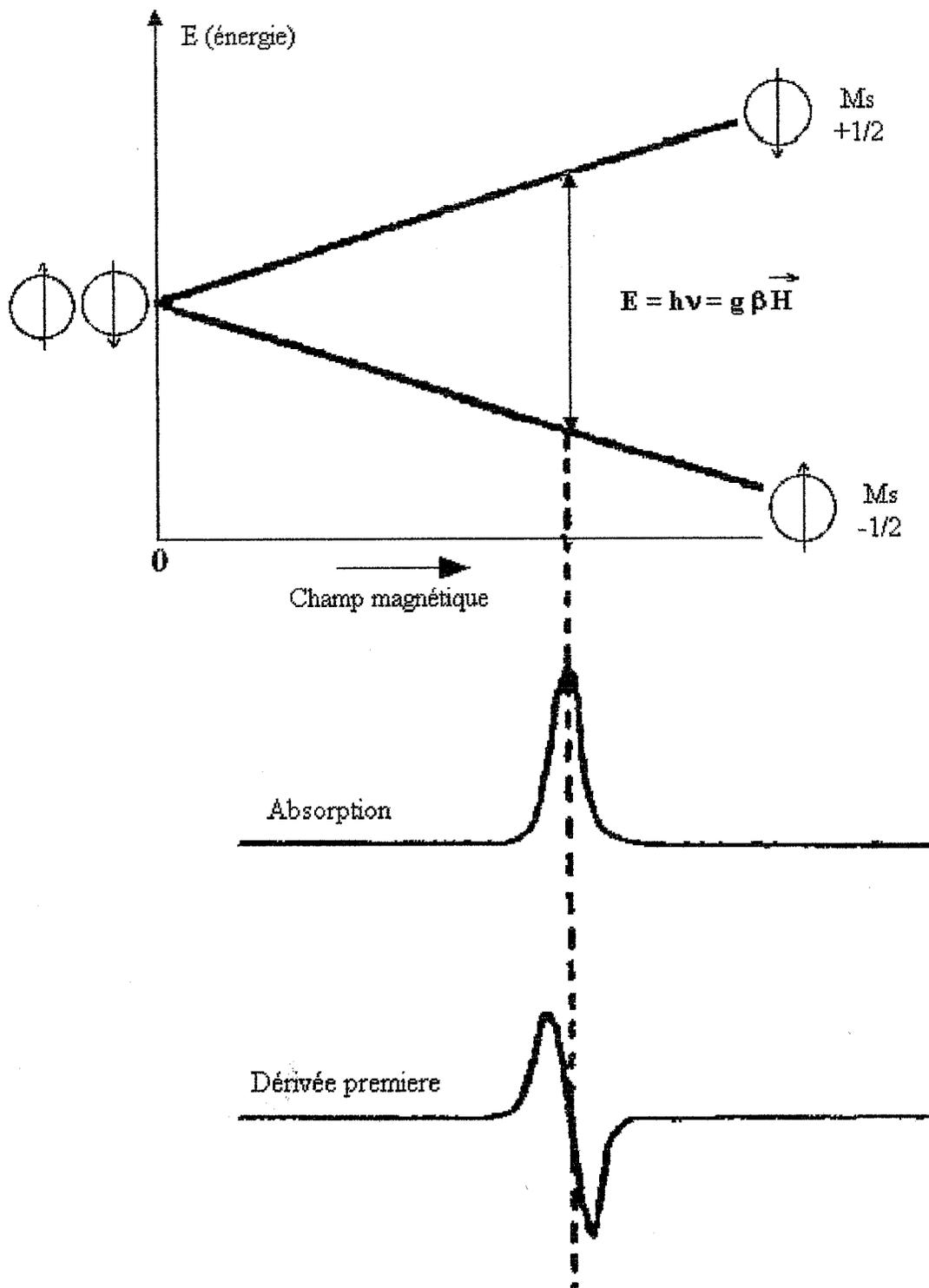


Figure 3: Interaction de Zeeman

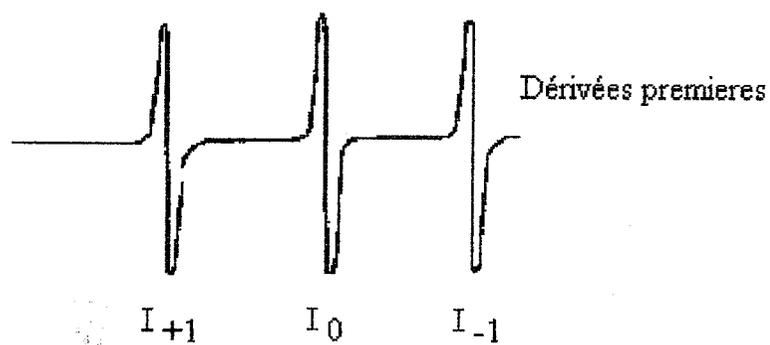
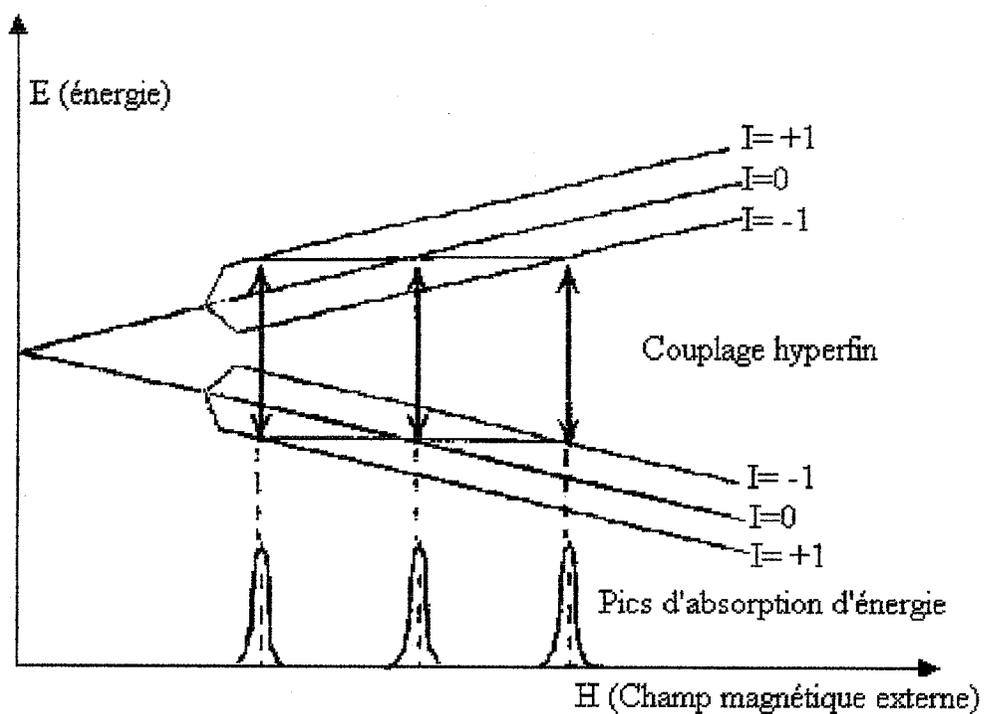


Figure 4: Niveaux électroniques de radicaux nitroxydes mobiles

Dans le cas des radicaux nitroxydes utilisés en spin labeling (Grunberger D et al. 1982), le noyau de l'atome d'azote a un spin nucléaire $I=1$. On aura donc résonance à 3 niveaux d'énergie : le signal global d'absorption est caractérisé par 3 pics de résonance, ou raies de résonance. Chaque raie est séparée par l'écart hyperfin a , également appelé constante de couplage, dépendant du moment magnétique nucléaire et de la force d'interaction entre le spin nucléaire et le spin électronique.

10. APPLICATION DE LA RPE A L'ETUDE DE LA FLUIDITE

Les molécules paramagnétiques ne sont pas en général des constituants naturels des membranes ; il est nécessaire de les y inclure. Il s'agit le plus souvent de radicaux nitroxydes. Comme exemple, nous présentons la formule du tempo, une sonde RPE couramment utilisée (figure 5), (Berliner L 1976).

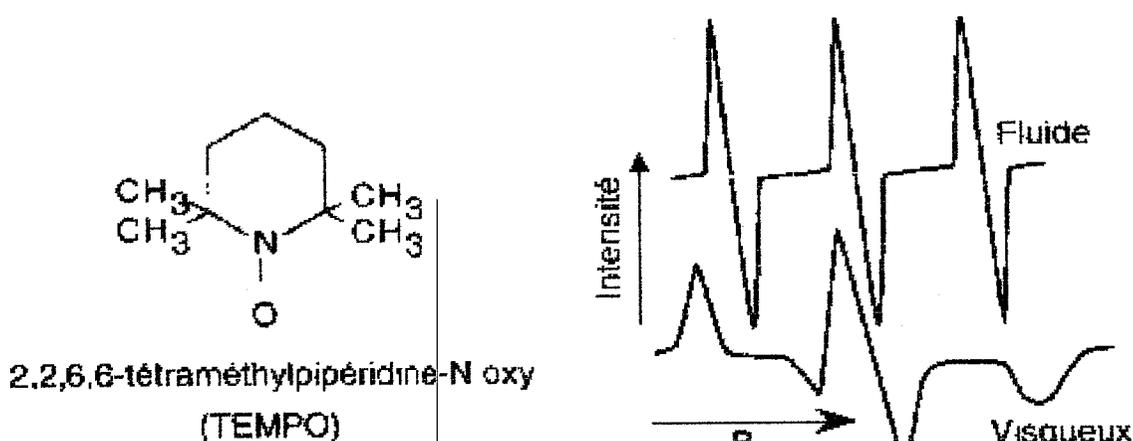


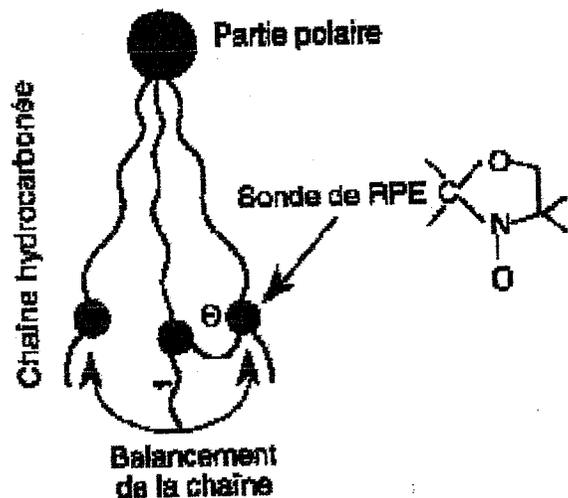
Figure 5: Formule du Tempo et spectres RPE dans l'eau (fluide) et dans le glycérol (visqueux)

Son caractère hydrophobe (pas d'affinité avec l'eau c'est à dire ne se mouille pas, contraire de hydrophile) la rend très soluble dans les membranes. Son spectre RPE fait apparaître 3 pics dus à l'interaction entre le spin de l'électron célibataire et un spin du noyau d'azote. La forme du spectre dépend de la mobilité de la sonde. C'est par ce biais que l'on atteint des paramètres reliés à la fluidité de la membrane et donc de la fluidité du milieu. Nous présentons également les 2 formes extrêmes du spectre du tempo respectivement dans un milieu isotrope très fluide (eau) et dans un milieu très visqueux (90% glycérol).

Un radical nitroxyde peut être attaché de manière covalente à la chaîne hydrocarbonée d'un acide gras ou d'un phospholipide inséré dans la bicouche lipidique (figure 6)

Figure 6:

Acide gras marqué par un radical nitroxyde et mouvement de balancier de la chaîne hydrocarbonée de cet acide gras inséré dans une bicouche membranaire.



L'allure du spectre de RPE dépend du mouvement de la sonde. Le mouvement balancier de la chaîne est d'autant plus important que le milieu est fluide. On peut définir un paramètre (voir paragraphe calcul du paramètre d'ordre S), désigné paramètre d'ordre : $S = \frac{1}{2} (3 \cdot \cos^2\theta - 1)$
 S mesure l'angle au sommet du cône dans lequel la sonde oscille.

- Lorsque le milieu est totalement rigide, θ est constamment égale à 0 et on a un ordre parfait ($S=1$).
- Lorsque le milieu est totalement fluide, l'orientation des chaînes est aléatoire et $\cos^2\theta = 1/3$ ($S=0$).

Les caractéristiques spectroscopiques d'une sonde dans une membranes peuvent être comparées à celle de la même sonde dans des milieux isotropes de viscosité bien définie.

Exemple dans des conditions physiologiques la viscosité d'une membrane est proche de celle d'un mélange constitué de 90% de glycérol et 10% d'eau (viscosité = 0.1 N.s.m^{-2} , soit 1 poise). Cette viscosité est 100 fois plus élevée que celle de l'eau ($10^{-3} \text{ N.s.m}^{-2}$). C'est une bonne viscosité pour une membrane. Un mélange de 90% de glycérol et 10% d'eau ne coule pratiquement pas, mais ce n'est pas un solide et on peut plonger son doigt. Une membrane ayant cette viscosité maintient son intégrité (Schreier et al. 1978)

Dans l'étude où nous nous intéressons, ce sont des analogues d'acides gras qui sont utilisés.

Les acides gras paramagnétiques se comportent de manière identique à des acides gras diamagnétiques.

11. CALCUL DU PARAMETRE D'ORDRE S

Les mouvements des acides gras paramagnétiques incorporés à un édifice lipidique sont lents car restreints par leur environnement lipidique. Cette condition permet le calcul d'un paramètre d'ordre S. Le paramètre d'ordre S est une mesure de la distribution des orientations du groupement N-O dans la membrane par rapport au champ magnétique (Douste-Blazy L et Mendy F 1988). L'orientation correspond à l'angle θ établi entre l'axe x (définissant une des coordonnées du radical nitroxyde par rapport à un axe de référence). Cet axe est usuellement choisi comme la normale à la surface de la membrane.

Ainsi le paramètre d'ordre est défini comme correspondant à l'orientation moyenne de toutes les molécules paramagnétiques, selon:

$$S = \frac{1}{2} (3 \cdot \cos^2 \theta - 1)$$

En pratique, S est calculé à partir des spectres de RPE par application de la formule donnée par Hubbell et McConnell 1969, et utilisée par Laggner et Kostner 1978, pour la mesure de fluidité des lipoprotéines :

$$S = (T_{//} - T_{\perp}) / (T_{zz} - T_{xx}) \times (a_n / a_n')$$

$$\text{Avec } a_n = 1/3(T_{xx} + T_{yy} + T_{zz}) = 14.1 \text{ G}$$

$$\text{Et } a_n' = 1/3 (T_{//} + T_{\perp})$$

$T_{//}$ et T_{\perp} représentent la moitié de la distance du premier extremum jusqu'au dernier minimum, et la moitié de la distance du premier minimum au dernier extremum, respectivement. Ces distances sont représentés sur le spectre 5-Ds incorporé aux membranes microsomales du rat WKY (rats hypertendus, l'expérience a été faite sur des rats adultes donc hypertendu génétiquement, soumis à un régime riche en acides gras poly insaturés pour observer les effet de ces AGP sur la fluidité), (voir figure1 dans résultats et discussion, détermination des paramètres spectraux)

T_{xx} , T_{yy} et T_{zz} sont des composantes du tenseur hyperfin T déterminé à partir des acides gras paramagnétiques orientés dans un cristal (Scindler et Seelig, 1973).

$T_{zz} - T_{xx}$ est égal à 25.0 G.

Le paramètre d'ordre S permet donc d'exprimer la fluidité du domaine environnant la sonde paramagnétique. S varie de 1 à 0. S=1 correspondant à un environnement extrêmement rigide, S=0 correspond à un environnement extrêmement fluide

II. LA CHROMATOGRAPHIE

II.1. La chromatographie, généralités

1. HISTORIQUE

Etymologiquement, chromatographie signifie l'image en couleur, puisque historiquement, les premières méthodes chromatographiques utilisées étaient faites sur support papier et servaient à séparer des mélanges. Si les produits étaient colorés, le chimiste ne faisait que constater la migration, sinon il utilisait des révélateurs colorés pour constater la migration.

La première chromatographie a été réalisée en 1906 par le botaniste russe Mikhail Tswett et consistait à séparer les pigments d'une feuille d'épinard. Il avait observé la séparation des colorants végétaux, dont les chlorophylles, lorsqu'il filtrait leur solution dans l'éther de pétrole, sur une colonne de carbonate de calcium. Dans ces conditions, en effet, des zones colorées vertes et jaunes se forment. Il constatait : "Tout comme les rayons lumineux d'un spectre, les différentes composantes d'un mélange de colorants se déploient sur la colonne de carbonate de calcium selon une loi et peuvent être analysées qualitativement et quantitativement" (Tswett M 1906).

Cette invention de la Chromatographie d'absorption par Tswett resta ignorée jusqu'en 1931; où Kuhn et al. 1931, l'exploitèrent de nouveau avec succès.

En 1950 apparut la chromatographie en phase gazeuse, puis dans les années 60 la chromatographie d'exclusion.

De nos jours, ce terme recouvre plus généralement toutes les techniques de séparation de substances en solution par passage au travers d'un matériau sélectif.

2. GENERALITES

La chromatographie, très utilisée dans des laboratoires industriels, de recherche et d'enseignement est une technique physique de séparation et d'analyse, pour l'identification et la quantification extrêmement puissante des constituants qui composent une substance d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse même très complexe.

C'est un outil de choix, dans les laboratoires d'analyse, de détection des polluants (Ahuja S. 2000).

La chromatographie emploie diverses techniques, utilisant différents principes physiques de séparation, basée sur le partage des substances à analyser conséquent des différences

La chromatographie emploie diverses techniques, utilisant différents principes physiques de séparation, basée sur le partage des substances à analyser conséquent des différences d'affinité de ces substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

C'est l'entraînement des constituants d'un mélange (le soluté dont on veut connaître la composition) au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé) qui produit la répartition sélective du soluté entre ces deux phases.

Il est donc nécessaire d'avoir une phase mobile dans laquelle le soluté peut se dissoudre (s'il s'agit d'une phase liquide) ou se vaporiser (s'il s'agit d'une phase gazeuse), et une phase fixe sur laquelle le soluté peut se fixer.

Les molécules à séparer sont dissoutes dans un solvant convenable le soluté obtenu entraînée par la phase mobile circule entre les particules du support de la phase stationnaire ou dans ses micro canalisations. Des interactions physiques et spécifique s'établissent entre le support et les molécules à séparer, par exemple forces de Van der Wals (liaison de faible énergie, inférieur à 100 kJ.mol^{-1}), ou liaisons polaires. Il se produit ainsi des réactions de fixation rapides et réversible dont la force dépend de la nature chimique des molécules à séparer, celles ci sont plus ou moins retenues selon leur structure chimique (Rouessac F 2000).

Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile). Ainsi, la séparation est réalisée grâce à l'entraînement différentiel des constituants par la phase mobile sur la phase fixe avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).

Les interactions qui peuvent entrer en jeu à cette échelle sont de trois natures : Electrostatiques, liaison hydrogène et stériques (Braithwaite and Smith 1985).

3. DEFINITION :

Une chromatographie est initialement une méthode de séparation avec deux utilisations possibles : purifier et caractériser. On distinguera les méthodes non destructives pouvant être utilisées en purification des méthodes chromatographiques destructives destinées à l'identification (Chavanne et al. 1991)

Les méthodes chromatographiques, bien que très diverses, mettent en jeu un certain nombre de principes communs : les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un équilibre lié à un coefficient de partition ou de partage K , qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées: $K = C_s / C_m$

Les quantités analysés doivent être extrêmement minimales afin de ne pas s'écarter des règles d'idéalité de la thermodynamique (K n'est autre qu'une constante d'équilibre thermodynamique, où les activités intervenant ne sont égales aux concentrations que si elles sont très faibles).

Les systèmes de détection devront donc être très sensibles.

- le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une migration des substances le long de la phase stationnaire, avec des vitesses différentes en fonction de leur affinité avec les deux phases

- la séparation est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre (et dépend du coefficient de partition décrit ci-dessus). Les composés ayant le plus d'affinité pour la phase mobile va migrer le plus rapidement.

4. LES DIFFERENTS TYPES DE TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Les Phénomènes ou facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont: - la solubilité dans un solvant liquide - la taille (la forme) - la polarité - la charge électrique - la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers (Bernard et Schneider 1996)

Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon des modalités différentes (De Graeve, Berthou et Prost 1986)

- Classification selon la nature physique des phases:
- Classification selon le phénomène mis en œuvre (en fonction des mécanismes de séparation)
- Classification selon le procédé opératoire.

4.1. Classification selon la nature des phases :

Phase mobile:

La phase mobile est un fluide, donc elle peut être :

- soit un liquide, on peut distinguer la chromatographie sur colonne de la chromatographie de surface (sur couche mince: CCM et sur papier: CP), la phase mobile est alors appelée éluant ou plus rarement solvant.

- soit un gaz. (Ex: chromatographie en phase gazeuse: CPG), la phase mobile est alors appelée gaz vecteur ou gaz porteur.

- soit un gaz. (Ex: chromatographie en phase gazeuse: CPG), la phase mobile est alors appelée gaz vecteur ou gaz porteur.

Phase fixe:

La phase fixe ou stationnaire peut être soit un solide ou soit un liquide.

Les solides, silice ou alumine traitée, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (CCM).

La phase fixe peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée). Ainsi en chromatographie sur papier, la phase fixe est formée par l'eau que les molécules de cellulose du papier adsorbent, alors qu'en chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatil et thermiquement stable imprégnant un granulé poreux.

4.2. Classification selon le phénomène chromatographique (mécanismes de séparation):

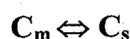
1. La chromatographie de partage :

Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage des substances à analyser dans les deux phases liquides (fluides non miscibles).

Ce sont les différences de solubilité des molécules à séparer qui interviennent (Savidan 1963) Plus généralement, cette technique utilise les différences d'interaction avec les molécules greffées sur le solide (BPC: Bonded Phase Chromatography). Dans ce cas, on peut réellement parler de phase fixe et de phase mobile, et il existe un coefficient de partage entre 2 milieux (liquide/liquide ou liquide/gaz).

On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins.

Théorie de la partition : La distribution d'un soluté entre deux solvants non miscibles, l'un aqueux (phase mobile), l'autre organique (phase fixe ou stationnaire), relève de l'équilibre :



C_s concentrations en soluté dans la phase fixe organique

C_m concentrations en soluté dans la phase mobile aqueuse.

Noter ici, que si nous avons un soluté qui est plus miscible dans le solvant organique que dans le solvant aqueux, K aura une valeur supérieure à 1.

La transposition de cette partition d'un composé entre deux phases liquides dans un système chromatographique est rendue possible par la fixation de l'un des solvants sur un support inerte, l'autre solvant constituant la phase mobile. Un soluté très soluble dans la phase fixe migrera lentement, la force de rétention prédominant sur la force d'entraînement. A l'inverse, un soluté soluble dans la phase mobile migrera rapidement (figure 1).

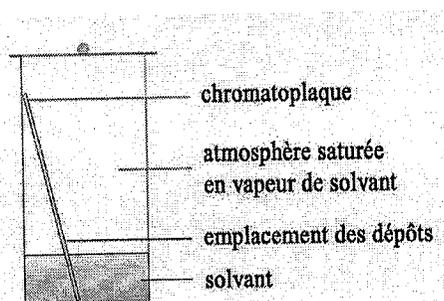


Figure 1: Schéma d'une chromatographie liquide-liquide ascendante

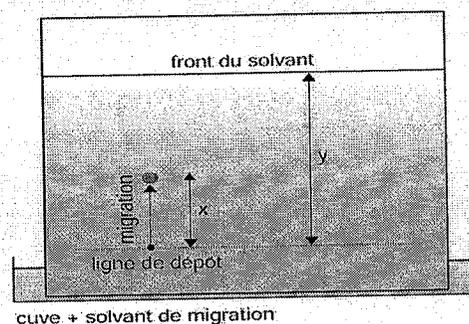


Figure 2: Rapport frontal

Rapport frontal :

On appelle rapport frontal, R_F (ou référence front, coefficient de migration) le rapport suivant:

$$R_F = \text{Distance parcourue par le soluté} / \text{Distance parcourue par le solvant}$$

La figure 2 montre comment calculer le R_F dans le cas d'une chromatographie liquide-liquide ascendante. Le rapport frontal est donc égal à :

$$R_F = x/y \quad (R_F < 1)$$

Un soluté très soluble dans la phase fixe aura un R_F faible; très soluble dans la phase mobile, son R_F sera élevé et proche de 1.

Remarques : Dans le cas où le mélange contient des solutés de mobilités voisines, on peut augmenter le pouvoir séparateur en réalisant une chromatographie bidimensionnelle (figure 3): sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première.

a) première chromatographie ;

b) deuxième chromatographie.

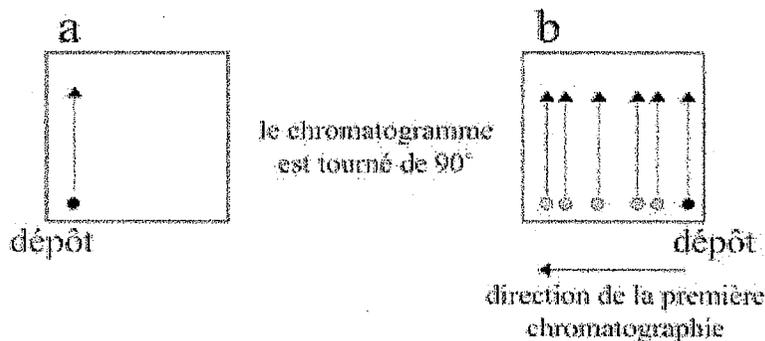


Figure 3: Schéma d'une chromatographie bidimensionnelle

Solvants : Les deux solvants sont caractérisés par leur différence de polarité et leur non miscibilité. Généralement, **le solvant fixe est polaire** : très souvent, ce sera l'eau.

Le solvant mobile non polaire est souvent un mélange plus ou moins apolaire, choisi selon les nécessités de la séparation.

Technologie : C'est une technique essentiellement qualitative.

- **sur colonne :** la colonne est remplie d'un support inerte imprégné du solvant fixe, le tout constituant la phase stationnaire. Or, les supports sont rarement totalement inertes; il est donc difficile de déterminer ce qui relève du partage et de l'adsorption. Autrement dit, les solutés vont être séparés selon deux mécanismes : le partage et de l'adsorption.

- **en HPLC,** cette chromatographie fait aussi intervenir le phénomène de polarité de la phase: on peut utiliser des phases stationnaires peu ou non polaires, la phase mobile étant polaire (eau ou mélange eau - méthanol): on parlera alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée.

- **sur papier :** en chromatographie ascendante ou descendante. Ici aussi l'intervention du papier ne peut être négligée : on assistera à un mélange de phénomènes d'adsorption et de partage.

- **sur couche mince :** le support inerte du liquide qui constituera la phase mobile est coulé sur une plaque de verre. Les solvants migreront par capillarité (Bounias 1983)

2. La chromatographie d'exclusion :

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme.

La phase fixe est généralement un solide polymère poreux dont les pores sont de l'ordre de grandeur de celle des molécules à analyser. La séparation résulte du fait que les grosses molécules, ne pouvant pas pénétrer dans les pores, sont éluées en premier, alors que les petites. En revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel, sont retenues plus ou moins longtemps, leur migration est freinée en diffusant dans le gel, et sont éluées ensuite. La phase stationnaire se comporte donc comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille, on parle alors de chromatographie de perméation de gel, de gel d'exclusion, de filtration sur gel ou de perméation sélective, selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique), (figures 4 et 5)

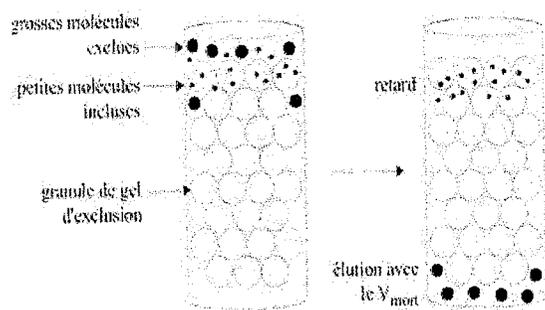


Figure 4

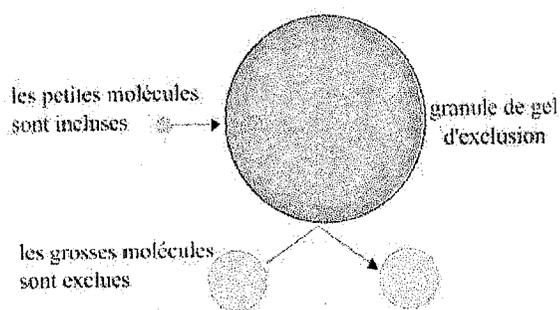


Figure 5

La méthode s'applique également à la séparation de molécules de polymères, en fonction de leurs masses moléculaires (Cserhati T et al. 1994)

Le coefficient de partition K s'appelle dans ce cas le coefficient de diffusion.

Le diamètre des pores est une caractéristique de chaque type de gel.

La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses molaires. Dans cette technique il n'y a pas d'interactions entre la phase mobile liquide et la phase stationnaire. Les molécules restent donc en solution tout au long de leur séparation.

Le principe de base de cette technique est très simple: les billes poreuses constituant le gel forment un réseau tridimensionnel dont l'accessibilité est déterminée par la taille des pores. L'encombrement stérique des molécules et les mailles du réseau détermine donc leur exclusion. Le paramètre qui définit l'encombrement stérique est le rayon de Stokes R_s , c'est le rayon d'une particule sphérique qui aurait le même comportement hydrodynamique que la molécule considérée. Les molécules exclues traversent la colonne directement entre les billes alors que les autres sont retardées par leur passage à l'intérieur des billes.

Le type du support (dextran, acrylamide ou support mixte par exemple) et le diamètre des pores, qui est variable en fonction du diamètre des billes, déterminent la fourchette des tailles de molécules pour lesquelles la séparation est effective: c'est la gamme de fractionnement.

Définition du comportement d'une molécule dans un gel particulier:

Le coefficient de partage K est alors : $K = \text{volume accessible à l'intérieur des billes pour la molécule considérée} / \text{volume total accessible à l'intérieur des billes}$

Les résultats sont illustrés sur les figures 6 et 7

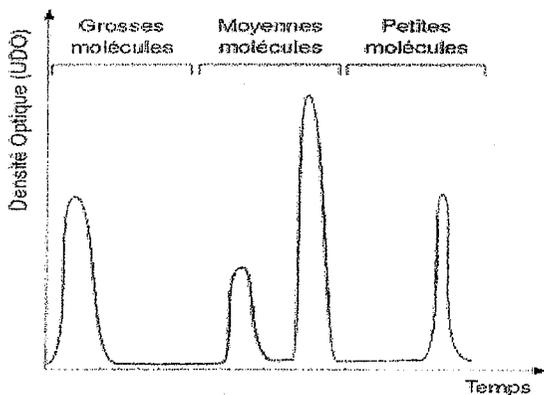


Figure 6: Elution des solutés dans l'ordre inverse des masses moléculaires

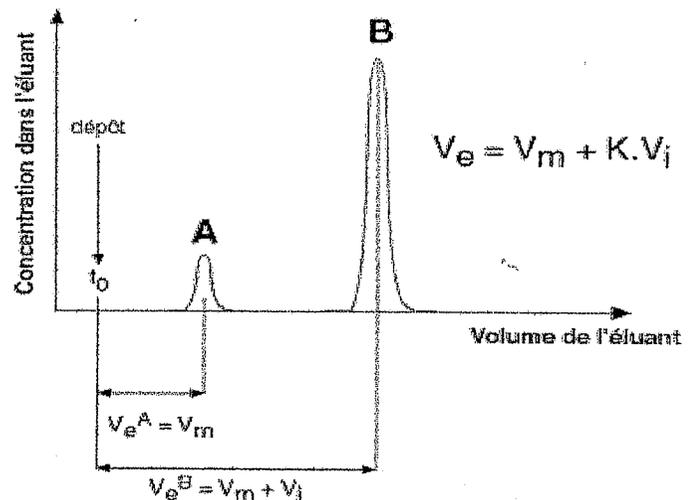


Figure 7: Diagramme d'éluion des substances A et B.

Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.

Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires (figure 7).

Technologie : Elle se pratique en chromatographie sur colonne, par filtration sur gel d'exclusion ou de perméation

3. La chromatographie d'adsorption :

L'adsorption est un phénomène d'interface à la différence de l'absorption (Laguës M 1990).

L'adsorption consiste en la formation de liaisons entre les molécules (ou atomes) d'un composé et celles de la surface adsorbante. L'adsorption est un phénomène de pénétration d'un composé à l'intérieur d'un autre. La phase stationnaire est un adsorbant polaire, ou apolaire (adsorption en phase inverse) et la séparation est basée sur l'adsorption sélective des composants d'un mélange à la surface du solide.

L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes par la phase solide. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée : liaison dipôle-ion, ou dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals. Contrairement à la chromatographie d'exclusion, ce type de chromatographie implique un changement de phase des molécules de l'état de soluté - dans la phase mobile - à l'état adsorbé - à la surface de la phase stationnaire . Le type de chromatographie est déterminé par la nature des interactions requises pour l'adsorption.

Pour chaque espèce on peut définir un coefficient de partage K entre la phase stationnaire et la phase mobile: La mobilité des espèces dépend donc de K, puisque ce sont les molécules non adsorbées qui subissent le flux de la phase liquide au travers de la colonne.

Les molécules se déplacent donc d'autant plus vite dans la colonne que leur coefficient de partage est faible. Un soluté pour lequel $K = 0.8$ se déplace dans la colonne avec une vitesse correspondant à 20 % de celle de la phase mobile.

Le phénomène d'adsorption est celui de la fixation sur des sites particuliers situés en surface. Ces sites peuvent être hydrophobes (chromatographie dite en phase inverse), hydrophiles (chromatographie sur adsorbant de type silice...), chargés (chromatographie d'échange d'ion), spécifiques pour un ligand donné (chromatographie d'affinité) (Pefferkorn, E 1999)

Les adsorbants : Ce sont des solides très divisés (l'adsorption est un phénomène de surface); c'est ainsi que 1 g d'alumine pour chromatographie peut représenter une surface de l'ordre de 100 m^2 . On distingue

- Les adsorbants à faible capacité d'adsorption comme l'alumine, le talc ou le carbonate de sodium.
- Les adsorbants forts comme le gel de silice.

Certains adsorbants présentent une forte polarité électrique comme le gel de silice ou l'alumine ; d'autres ont une faible polarité comme le charbon actif (figure 8).

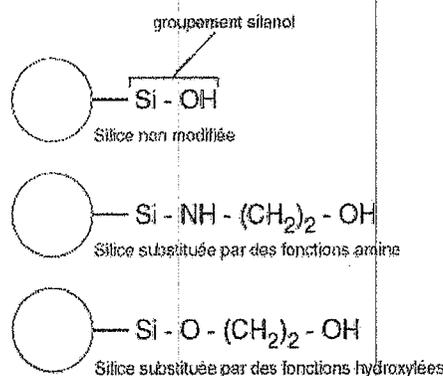


Figure 8: Silices polaires greffées

Les adsorbants figurant dans la liste ci-dessous sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec des composés polaires.

Papier, cellulose ; Kieselguhr, terre de diatomées ; Amidon ; Sucres ; Talc ; Carbonate de sodium ; Oxyde de magnésium ; Gel de silice ; Alumine ; Charbon activé

Le gel de silice et l'alumine sont les adsorbants les plus utilisés. En général, plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. Il est cependant possible de traiter un adsorbant pour modifier ses capacités d'adsorption et ses propriétés: Plus la teneur en eau d'un adsorbant est faible (ce qui a pour conséquence la présence d'un plus grand nombre de sites d'adsorption pour le soluté), plus il est polaire ou actif.

Technologie : La chromatographie d'adsorption est appliquée selon différentes techniques :

- sur colonne : ouverte à pression ambiante, en flash chromatographie, à moyenne pression, en HPLC;
- sur papier : en chromatographie ascendante ou radiale ; dans cette technique le papier constitue la phase fixe ;
- sur couche mince : le gel adsorbant (cellulose, silice) est coulé sur une plaque (verre, aluminium, plastique), mélangé à un liant (plâtre).

4. La chromatographie ionique

La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse (polystyrène) de groupements ionisés (sites ioniques) négativement ou positivement (groupes fonctionnels acides ou basiques, sphères de quelques micromètres de diamètre), exerçant des interactions de type électrostatique et liaison hydrogène avec les solutés ioniques du milieu. C'est l'échange d'ions entre phases qui entraînent la séparation des composés ionisés.

La séparation est fondée sur le fait que plus la charge ionique des composants est élevée, plus la rétention à la surface du solide est importante. La phase mobile est habituellement une solution tampon aqueuse dont le pH permet de contrôler la mobilité des composants du mélange analysé.

La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique entre les deux phases.

Le partage s'effectue en fonction de la charge.

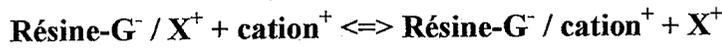
Un échangeur d'ions est une substance, généralement poreuse, sur laquelle est greffé, par liaison covalente, un groupement chimique ionisable. Cette partie chargée peut interagir fortement avec des ions présents dans la solution chromatographiée.

Ainsi, des molécules chargées peuvent s'adsorber réversiblement sur l'échangeur d'ions, et être ensuite relarguées de la résine, en modifiant la composition ionique du solvant (Jinno K 1996)

Principe: Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution.

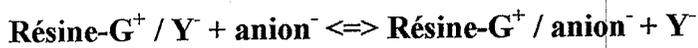
Résine cationique : qui échange réversiblement des cations.

Une résine cationique est chargée négativement (figure 10).



Résines anioniques : qui échange réversiblement des anions.

Une résine anionique est chargée positivement (figure 11).



Résine échangeuse de cations (cationique) :

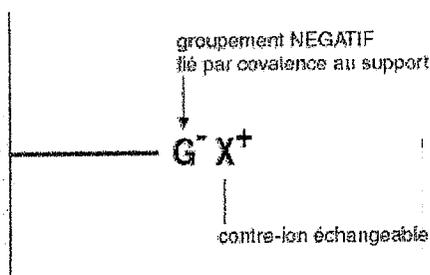


Figure 9

Résine échangeuse d'anions (anionique) :

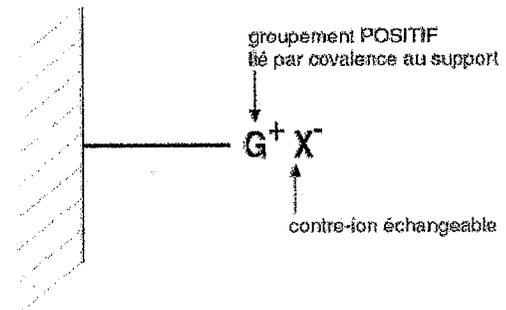


Figure 10

Technologie : La chromatographie par échange d'ions se pratique le plus souvent sur colonne, mais la méthode peut être transposée sur couche mince. Du papier échangeur d'ions est également commercialisé. Enfin l'échange d'ions peut être réalisé en batch : la résine est mise en présence de la solution et agitée mécaniquement.

Propriétés des échangeurs d'ions : Le support peut être minéral, mais il est le plus souvent organique (résine de copolymérisation, polysides : dextrans ou celluloses - voir au verso).

Les groupements fonctionnels chargés des résines sont fixés par covalence sur le support.

5. La chromatographie d'affinité :

La chromatographie, ici, est basée sur une grande affinité existant entre une macromolécule (protéine, acide nucléique, glucane...) donnée et un ligand.

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement (figure 11).

Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité (Provdor T et al. 1996)

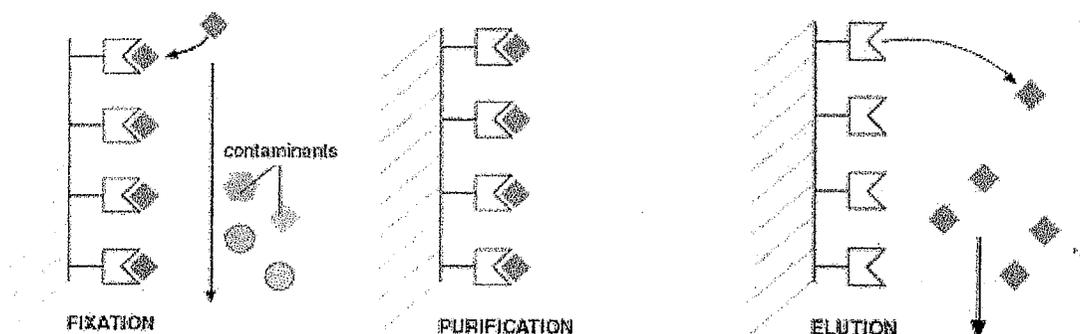


Figure 11

1 - Etape de FIXATION : Le mélange de molécules contenant le composé à purifié est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

2 - Etape de PURIFICATION : En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.

3 - Etape d'ELUTION : La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluat. Souvent, l'un des deux partenaires de l'interaction au moins est une protéine (P), l'autre sera qualifié de ligand (L) de cette protéine

4.3. Classifications selon les procédés utilisés :

Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

La chromatographie sur papier, la plus simple : le substrat (phase fixe) est l'ensemble charge (eau, sels,...) plus les fibres d'un papier convenablement choisi; la solution à séparer (phase mobile) se déplace dans la papier grâce au forces capillaires

La chromatographie sur couche mince : répond à la même description mais le substrat (gel de silice) est étalé et fixé sur une plaque inerte verre ou autre.

La chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne en phase gazeuse (CPG) qui permet de travailler sur de plus faibles quantités de matière, et la chromatographie sur colonne en phase liquide qui est la plus efficace dans la séparation des molécules (HPLC), et qui font l'objet de notre étude par la suite, sont des méthodes chromatographiques sur colonnes les plus couramment employées.

5. Description et principe de la chromatographie sur colonne:

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption (Beesley TE et al 1998).

La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de section variables. L'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

Adsorbant:

Le plus utilisé est l'alumine; cependant, on la limitera aux composés organiques stables car, sous sa forme basique, elle peut provoquer la déshydratation des esters par exemple.

Le gel de silice est également fréquemment utilisé pour la séparation de composés qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être traités par l'alumine.

La granulométrie de l'adsorbant doit être supérieure à celle des adsorbants utilisés en CCM. Leur taille est habituellement comprise entre 50 et 200 μm .

La quantité d'adsorbant dépend de la difficulté de la séparation et de la masse d'échantillon. On peut considérer que pour chaque gramme d'échantillon, il faut 30 à 50 g d'adsorbant si la polarité des composants à séparer est très différente et jusqu'à 200 g si la séparation est difficile.

Eluant:

L'éluant est en général un mélange de deux solvants. Au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les substances les moins retenues par l'adsorbant (les moins polaires). Ensuite on fait varier la composition de l'éluant en additionnant graduellement le solvant le plus polaire. Ainsi les composés les plus polaires, retenus sur l'adsorbant, ne migreront que graduellement vers le bas de la colonne.

Diverses colonnes de chromatographie

Séparation en fonction de la taille.

En jouant sur le diamètre des billes, on pourra plus ou moins ralentir les grosses molécules ; les petites qui peuvent passer entre les billes migreront rapidement. A l'inverse, si on prend des billes poreuses, les petites molécules pénétreront dans les billes et y seront retardées alors que les plus grosses qui ne peuvent pas y pénétrer passeront par la voie directe entre les billes et plus vite.

Séparation en fonction de la charge.

En prenant des billes chargées, les molécules qui portent une charge opposée vont se fixer, les autres vont migrer. Quand toutes les molécules sont fixées, on augmente progressivement la force ionique du solvant ; les molécules vont se séparer des billes les unes après les autres, chaque molécule se sépare à sa propre force ionique ; elles vont donc se présenter une à une devant le détecteur.

Séparation immunologique (colonne d'affinité).

Les billes portent ce coup-ci un anticorps greffé à leur surface. Seules les molécules, peu nombreuses, reconnues par cet anticorps, vont se fixer sur la bille. Les autres vont traverser la colonne. Pour récupérer la molécule, il suffit d'augmenter la force ionique du solvant. On peut procéder de façon inverse pour récupérer un anticorps, il "suffit" de disposer de billes greffées avec les molécules reconnues par l'anticorps.

Polarité des phases:

Les séparations sont basées sur le principe de polarité c'est à dire l'existence de dipôles.

Phase mobile: Le pouvoir éluant d'un liquide dépend de sa propre polarité. Les liquides classés ci-dessous le sont par **polarité croissante**. On obtient ainsi une **série éluotropique**.

éther de pétrole ; cyclohexane ; tétrachlorométhane ; trichloréthène ; toluène ; benzène ; dichlorométhane ; éther diéthylique ; trichlorométhane ; éthanoate d'éthyle ; pyridine ; propanone ; propan-1-ol ; éthanol ; méthanol ; eau ; acide éthanoïque

Interactions entre le composé à analyser et les deux phases:

Lorsque les solutés sont neutres, l'ordre d'adsorption sur un adsorbant polaire comme le gel de silice ou l'alumine est le même que celui présenté pour les solvants. Les solutés apolaires (ex: alcanes) sont peu adsorbés alors que les solutés polaires (ex: méthanol) le sont fortement.

Par contre, on utilisera de préférence l'alumine pour séparer des solutés basiques comme les amines et le gel de silice pour les phénols et les acides, car les solutés acides sont fortement adsorbés par l'alumine alors que les solutés basiques le sont par la silice.

6. REVELATION

Dans toutes les méthodes de séparation, et donc dans les chromatographies, la question générale qui se pose est celle de la mise en évidence des molécules (Poole, C.F. et al. 1991) En effet, il faut disposer d'une méthode qui permette de préciser leur présence (et éventuellement leur concentration) dans le milieu mis à part, si elles ne sont pas naturellement colorées.

On utilise des méthodes directes ou indirectes:

- méthodes directes: spectres d'absorption dans d'autres gammes de longueur d'onde que dans le visible (voir spectroscopies); luminescence; radioactivité si les éléments séparés sont eux mêmes radioactifs; éventuellement méthodes électrochimiques (si les molécules séparées réagissent à la surface d'électrodes, par exemple); spectres de masse.
- méthodes indirectes après modifications ou complexations chimiques, quelquefois spécifiques des composés telles que: ionisation (voir chromatographie en phase gazeuse ci dessus, par exemple); oxydation (acide sulfurique à plus ou moins haute température, qui conduit à des couleurs parfois spécifiques des composés -par exemple les stérols); réactifs des amines (ninhydrine, fluorescamine...); des phosphates (acide molybdique); des protéines (bleu de coumassie, ninhydrine, sels d'argent...); des acides nucléiques (bromure d'éthidium..

II.2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

1. HISTORIQUE (Pascale Richardin)

On attribue la découverte de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) à Archer John Porter MARTIN et Richard Laurence Millington SYNGE (Arpino et al 1995), qui publient dès 1941 la théorie de la chromatographie de partage (Martin et al 1941). Ils reçoivent en 1950 le prix Nobel de chimie pour cette découverte qui bouleversera le monde de l'analyse.

2. GENERALITES

La CPG, méthode d'analyse immédiate, permet de séparer les constituants d'un mélange selon leur partage entre deux phases l'une fixe et l'autre mobile.

Comme son nom l'indique elle permet de séparer des composés en phase gazeuse. Les constituants du mélange à séparer se partagent entre le gaz vecteur phase mobile et la phase stationnaire (liquide ou solide).

La phase stationnaire selon sa constitution, va plus ou moins retenir sélectivement chacun des produits. Les vitesses de progression seront différentes pour chaque constituant. Nous arriverons ainsi à éluer le mélange, c'est à dire à séparer dans l'espace et dans le temps les différents composants du mélange.

La CPG permet l'analyse et l'identification d'un très grand nombre de matériaux organiques, donc adaptée à l'analyse de la composition d'un grand nombre d'objets de notre patrimoine moderne ou ancien, qui sont constitués de mélanges complexes de produits naturels (cires, résines, gommes, tannins, huiles, etc.). Exemples d'application concernant l'analyse des adhésifs archéologiques, baumes de momification (Mejanelle P et al. 1996), reliures anciennes, sculptures en cires (Colinart S 1987), encres, bitumes... (Bleton J et al 1996; Casoli A et al. 1995; Connan J et al. 1996; Regert M et al. 1996)

Les progrès de l'instrumentation (colonne capillaire, détecteurs, ..) et sa relative facilité d'emploi font de la CPG une technique d'analyse de routine essentielle dans de nombreux laboratoires. Elle reste la méthode de choix utilisée pour l'analyse de mélange de composés volatils possédant des points d'ébullition proches (Arpino A et al. 1995)

Le solvant liquide est transformé en gaz dans cette méthode, et la mesure des concentrations des composés analysés dans le gaz est possible grâce à la mise au point aujourd'hui de système de détections sensibles (de l'ordre du picogramme) et fiables. La CPG s'applique

donc à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur.

Elle s'applique à des molécules volatiles naturellement mais aussi à des molécules qui, par des réactions de dérivations, sont rendus volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition. Son principal intérêt est qu'elle peut détecter des substances à l'état de traces (presque toutes les catégories de petites molécules) : les dosages des acides gras libres, acides aminés; acides cétoniques; d'oses; d'osamines; de toxiques; peptides; stéroïdes; catécholamines... ainsi que leurs dérivés volatil stable (Richardin P et al. 1996; Martin AJP et al. 1941).

Le couplage de la CPG avec la spectrométrie de masse est intéressant pour l'identification de substances naturelles ou médicamenteuse (Mejanelle P et al. 1996).

On distingue :

- La chromatographie gaz-liquide (ou de partage).

La phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil fixé par imbibition sur un support inerte. Le soluté se partage entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire. Plus un soluté est soluble dans la phase stationnaire, plus le R_F (distance parcourue par le soluté / distance parcourue par la phase mobile) est petit et le temps d'émergence élevé.

- La chromatographie gaz-solide (ou d'adsorption).

La phase stationnaire est un solide adsorbant (gel de silice, alumine, zéolites ou autres polymères adsorbants ...). Plus l'adsorption d'un soluté sur la phase stationnaire est élevée, plus le R_F est faible et le temps d'émergence élevé.

Dans les deux cas la phase mobile est constituée du gaz vecteur qui véhicule les solutés gazeux.

3. DESCRIPTION

Dans cette forme de chromatographie, la phase stationnaire destinée à séparer les molécules, est une colonne à l'intérieur de laquelle est déposée une substance poreuse formée de petites billes. La CPG est ainsi extrêmement riche car en jouant sur le matériaux contenu dans la colonne on peut faire varier les conditions de séparation des constituants.

La colonne placée dans un four thermo staté, afin de maintenir les molécules sous forme gazeuse pendant leur traversée, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire.

La phase mobile ou fluide est un gaz qui balaie en permanence la colonne, entre par une extrémité de la colonne et sort par l'autre. Les deux phases sont en contact intime.

La substance à analyser (solvant liquide) avant d'entrer dans la colonne est chauffée pour passer à l'état vapeur. Le fluide déplacé activement par une pompe va entraîner le solvant jusqu'à la colonne (sur la phase stationnaire) qui va retarder ses différents constituants. Les molécules vont se déplacer différemment dans la colonne et prendre un certain retard dans la migration, suite aux échanges et partages du solvant qui ont lieu entre ce gaz et la phase immobile. Elles vont donc se présenter avec un certain retard en sortie de colonne selon leur concentration.

Chaque constituant est ainsi caractérisé par le coefficient de partage K .

Le coefficient de partage est un des paramètres qui conditionne la durée de parcours du constituant dans la colonne. Cette durée est appelée temps de rétention.

Un détecteur placé en sortie de colonne va permettre de déceler le passage de chacune de la substance. Selon les propriétés physiques de la molécule à détecter, et selon le type de détecteur, le détecteur ne sera pas capable de dire quelle est cette molécule, juste de dire qu'elle est là, mais le retard étant parfaitement calibré, il permettra de l'identifier. L'intensité de la réponse du détecteur va aussi permettre, par rapport à un étalonnage, de donner la concentration de la molécule.

Un grand choix de détecteur permet l'analyse sélective et parfois l'identification de mélanges très complexes.

4. INSTRUMENTATION

Dans la configuration la plus classique, le chromatographe est équipé d'un injecteur diviseur (vaporisateur), d'une colonne capillaire (colonne de séparation), d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un enregistreur pour l'exploitation des données, figure 1 (Gardais et al. 1982)

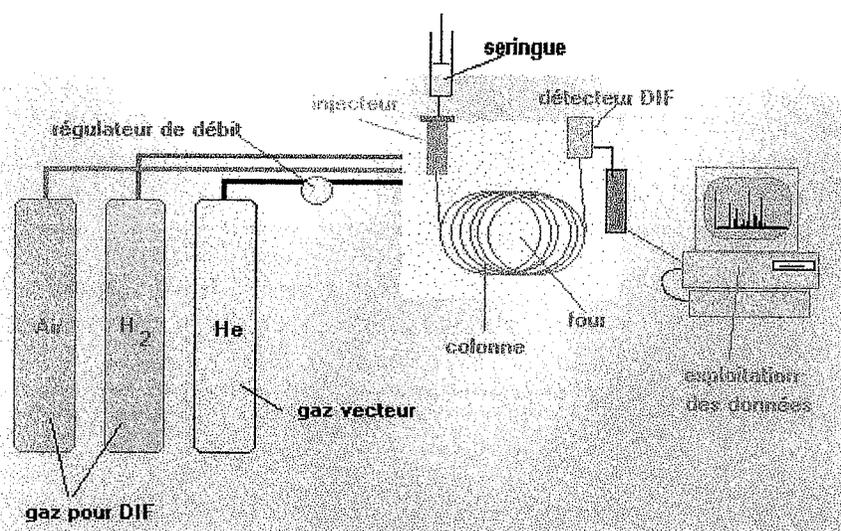


Figure 1 : Schéma d'un appareil de CPG, muni d'un détecteur à ionisation de flamme

Les données sont traitées par un système informatique.

4.1 Le gaz

Le gaz choisi comme phase mobile doit posséder une grande inertie chimique, un grand degré de pureté, être adapté au détecteur et de coût pas trop élevé.

Les gaz les plus couramment utilisés sont: azote, hélium et hydrogène. L'azote est le plus lourd donc réalise le meilleur entraînement. Le choix du gaz dépend de sa viscosité en fonction de la température (influence sur le débit) et de la nature du détecteur (un catharomètre nécessite l'emploi de gaz à haute conductivité comme l'hydrogène ou l'hélium)

Le gaz vecteur ne doit contenir aucune trace d'eau ou d'oxygène, pour éviter une dégradation rapide des colonnes capillaires, un double système de purification (desséchant et fixant l'oxygène) est alors interposé entre la bouteille et le chromatographe.

Le débit d'entrée dans la colonne est régulé par un régulateur de débit

4.2. Les échantillons

Si le composé ou le mélange à étudier est un liquide, il est dilué dans un solvant, si c'est un solide, il est dissous dans un solvant. Les solvants généralement utilisés sont le dichlorométhane ou l'éther diéthylique.

Les échantillons liquides obtenus sont injectés dans la chambre de vaporisation à l'aide d'une micro seringue en petite quantité (5, 10, 20 ou 50 μL selon les modèles) à travers le septum de l'appareil (figure 2).



Figure 2: microseringue CPG

La température (c'est généralement celle du four) est telle que la vaporisation est immédiate.

Une étape préalable est donc nécessaire pour la préparation de l'échantillon, ceci pour rendre injectable l'échantillon : Extraction , Purification , Concentration , Dérivatisation .

Le traitement de l'échantillon varie selon les substances analysées:

- lorsque les solutés sont directement volatilisables, les substances sont solubilisées dans un solvant et chromatographiées.

- lorsque les solutés ne sont pas volatils à la température du chromatographe, il faut les transformer en dérivés volatils stables: les acides aminés sont ainsi estérifiés par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés...

La CPG permet l'analyse d'un grand nombre de composés de masse moléculaire inférieure à 500, thermorésistants et volatilisables, en particulier tout liquide biologique.

Cependant, si les substances à analyser sont très polaires, thermosensibles ou non volatilisables, on peut réaliser une étape de dérivation: différents réactifs sont disponibles selon les fonctions à modifier (silylation, acylation, méthylation...)

4.3. L'injecteur

Pour les échantillons liquides ou solides on fait appel à la vaporisation grâce aux injecteurs car les échantillons doivent être obligatoirement gazeux avant d'être introduit dans la colonne et se mélanger avec le gaz vecteur.

Un très grand choix d'injecteur est disponible sur le marché en fonction de la nature du mélange à séparer (solide, liquide, polaire, etc).

Le système d'injection permet l'évaporation et le transfert dans la colonne des échantillons.

Parmi les injecteurs classiques, l'injecteur diviseur est le plus utilisé dans le cas d'échantillon en solution (figure3).

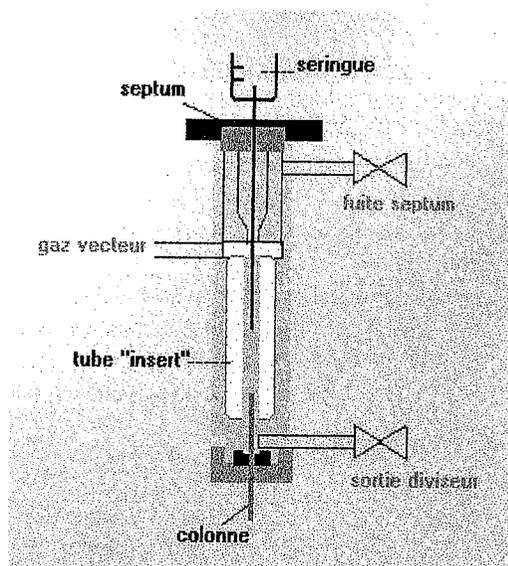


Figure 3 : Injecteur CPG

Un système de vannes élimine une partie de l'échantillon et permet ainsi une analyse plus précise d'une certaine quantité de produit sans surcharge de la colonne.

4.4. La colonne

C'est l'organe principal. C'est un tube pouvant avoir diverses formes: rectilignes, en U, en spirales (la plus répandue)

Deux grands types de colonnes sont employés à l'heure actuelle : les colonnes compactes (remplies, classique, ou à garnissage) et les colonnes capillaires (figure 4):

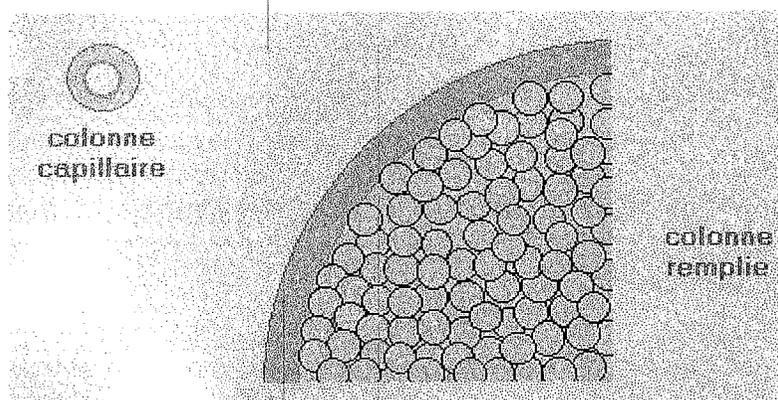


Figure 4: Représentation à la même échelle des deux colonnes (Capillaire et remplie)

- Les colonnes remplies, encore utilisées pour l'analyse de gaz, sont généralement constituées d'une tubulure en verre ou en métal de diamètre intérieur de 2 à 8 mm et de longueur 1 à 10 m, remplies d'un granulé poreux (support solide inerte) en poudre fine, comme la terre de diatomées (Kieselguhr), la brique réfractaire rouge pilée (Chromosorb P), la brique blanche (Chromosorb G ou W), la poudre de polystyrène (Chromosorb A) ou de téflon (Chromosorb T), des poudres de diverses matières plastiques comme les polystyrènes et polyaromates de la série des Chromosorb 100 (Merck), le charbon actif, la poudre de verre, le quartz, l'argile... Le liquide stationnaire est un hydrocarbure, un silicone, un ester, un polyol, caractérisé par sa température d'utilisation et sa polarité.
- Les colonnes capillaires ont entre 10 et 100 m de long avec un diamètre interne de 0,05 à 1 mm. Elles sont faites d'acier, de cuivre, d'aluminium, de silice fondue, de quartz, de verre ou de plastique, généralement disposées en spirale.

A la différence des colonnes compactes, il n'y a pas de support introduit dans la colonne : la phase stationnaire est déposée sur la paroi interne sous la forme d'un film régulier (mince couche d'épaisseur 0,1 à 5 μm).

Les colonnes capillaires permettent de travailler à une température plus basse, en gardant des temps d'analyses satisfaisants. Les colonnes capillaires (et tout particulièrement les "narrow bore") sont caractérisées par les avantages : une grande efficacité, mais une faible capacité d'échantillon (injection très faible), un faible débit.

Le diamètre moyen des pores varie de 0,3 à 0,005 μm selon les colonnes.

La réussite d'une bonne séparation chromatographique dépend dans une large mesure du choix de la phase stationnaire. On distingue :

- les phases apolaires à base d'hydrocarbures aliphatiques saturés ou silicone ramifiés (squalane), polydialkylsiloxanes (silicones) greffés ou non, polyéthers (Carbowax) ...
- les phase polaires c'est des polymères polyols, polyesters, polyamides ...

Les adsorbants les plus classiques sont les adsorbants minéraux, tel le charbon actif, l'alumine, les tamis moléculaires. On utilise aussi des adsorbants organiques à haut poids moléculaire. Ce sont des copolymères, ils ont l'avantage de permettre toutes sortes d'analyses.

D'un point de vue technique, la colonne est maintenue dans un four à bain d'air thermostaté, à une température légèrement supérieure au point de vaporisation du constituant le moins volatil.

En ce qui concerne le réglage de l'appareil, il doit-être avant-tout équipé d'une colonne appropriée à la séparation des composés du mélange.

Il existe des colonnes de polarités différentes.

Voici les caractéristiques des colonnes courantes :

Colonne	Composition	Polarité	Température maximale tolérée (en °C)
Squalane	Alcane ramifié	Apolaire	150
SE-30	Méthylsiloxane	Peu polaire	350
Carbowax 20 M	Polyglycol	Polaire	225

4.5. Le détecteur

Les molécules séparées dans la colonne parviennent à la sortie à l'état gazeux et se prêtent à de multiples modes de détection et d'évaluation basées sur des méthodes physiques.

Le détecteur est un appareil de mesure physico-chimique qui produit un signal au passage de chaque constituant, et qui s'inscrit en forme de pic sur une table traçante.

On obtient un spectre où apparaissent des pics d'intégration proportionnelle à la quantité de produit injecté. Le pic est caractérisé par son temps de rétention (variable selon la nature de la colonne polaire ou pas et de la température du four), porté en abscisse.

De façon à identifier un produit, la solution préparée doit contenir un mélange équimolaire du composé et de l'étalon.

On distingue les détecteurs :

- **Spécifiques** présentant une très grande sensibilité pour certaines familles de composés tel que :

Le détecteur à capture d'électrons qui comporte une source d'électrons (par décomposition γ d'un isotope radioactif). Ces électrons se fixent sur les molécules sortant de la colonne et les transforment en radicaux libres chargés négativement, qui passent entre deux électrodes et sont attirés par l'anode. Chaque variation de la composition du gaz (chaque passage de molécules séparées par la chromatographie) se traduit par une variation d'intensité du courant entre les électrodes, ce courant est amplifié et transmis à l'enregistreur. la détection ne concerne que les molécules capables de fixer des électrons (électrophiles) : halogènes, dérivées heptafluorobutyriques des stéroïdes, trifluoroacétates de catécholamines, bromométhyl-diméthylsilyl éthers, certains composés soufrés, etc... utilisé pour les composés halogénés et les noyaux aromatiques.

Le détecteur thermo-ionique ou azote-phosphore utilisé pour l'analyse des substances qui contiennent ces de N ou P , métalloïde (nucléotides, esters phosphoriques d'oses), détection d'alcaloïdes organo-phosphorés.

Le photomètre de flamme ;

Le spectromètre de masse et la spectroscopie infrarouge fournissent des données structurales permettant l'identification des molécules et de mesurer la proportion d'isotope lourds éventuels dans chaque pic ;

Le détecteur de phosphore ;

Dans tous les cas le détecteur est thermostaté (réglé en général à une température supérieure à celle de la colonne) pour maintenir les substances sous forme gazeuse.

- **Non spécifiques** : répondant à tous les types de composés tel que :

Le catharomètre basé sur le chauffage d'un fil métallique dont la résistance dépend de la nature du gaz environnant ;

La balance de densité de gaz;

Le plus usuel des détecteurs en analyse des composés organique est le détecteur à ionisation de flamme. Il est le plus pratique (facile à utiliser) car très sensible et possède une réponse linéaire dans un large domaine de détection.

Description du détecteur à ionisation de flamme:

Le mélange gaz vecteur et molécules à analyser en sortie de colonne à débit constant pénètre et brûle dans une flamme obtenue par combustion du mélange hydrogène et d'air.

L'extrémité du brûleur est portée à un potentiel négatif

Tant que le gaz vecteur est pur, la combustion produit quelques ions collectés par une électrode donc un courant ionique résiduel très faible circulant entre les électrodes (entre lesquelles est appliqué une différence de potentiel autour de 300 volts). Ce courant est constant et génère comme enregistrement une ligne de base parfaitement rectiligne.

Lorsque les composés organiques fragmentés arrivent dans la flamme du détecteur leur combustion se traduit par une augmentation du nombre de ces ions et modifie l'intensité du courant, il y a formation, en particulier, d'ions négatifs et d'électrons qui sont captés par une électrode collectrice portée à un potentiel positif par rapport à la tête du brûleur, qui provoque la création d'une impulsion électrique, c'est un courant de quelques nA transformé par un électromètre en signal tension fonction du débit massique. Ce signal est amplifié, il est proportionnel à la quantité de substance brûlée donc à la quantité de soluté dans le mélange, il se présente sous forme d'un pic dont la déflexion est proportionnelle à la quantité de substance détectée, puis transmis au calculateur-enregistreur (figure 5).

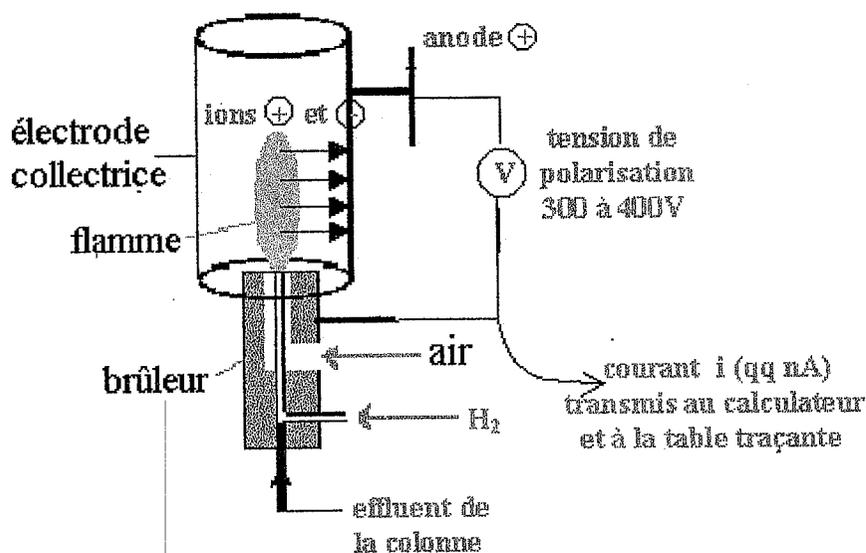
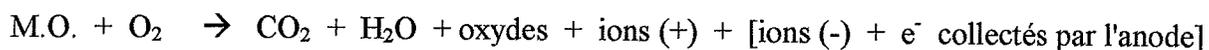


Figure 5 : Détecteur à ionisation de flamme

Cette technique d'analyse est parfaitement adaptée aux dosages quantitatifs.

Mécanisme proposé pour la combustion d'une substance organique dans une flamme air-hydrogène.



La sensibilité est grande : de 20 à 100 pg/s.

Ce type de détecteur est le plus utilisé, en particulier avec les colonnes capillaires.

La gamme linéaire est grande et la réponse est stable.

Les analyses chromatographiques aboutissent à l'obtention d'un chromatogramme qui représente l'évolution d'un paramètre (signal électrique provenant du détecteur) lié à la concentration instantanée du constituant élué (ou soluté), en fonction du temps. Le chromatogramme est une représentation graphique où des pics émergent de la ligne de base, tracé obtenu en l'absence de composés (figure 6).

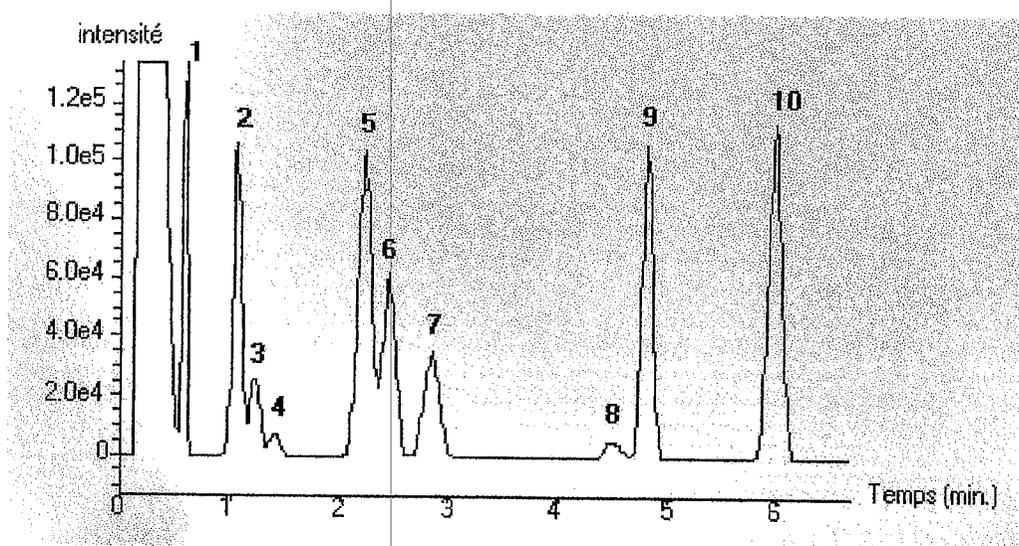


Figure 6: Exemple de chromatogramme (obtenu par CPG)

Un chromatogramme correct est composé de pics de forme symétrique, pas trop larges et bien séparés (courbe de distribution typiquement gaussienne).

C'est en jouant sur les conditions opératoires que l'on arrive à un tel chromatogramme.

Les facteurs favorables à une bonne séparation sont :

- des temps de rétention suffisamment différents (choix de la colonne)
- des pics peu élargis.

Le chromatogramme permet des suivis :

Qualitatifs : pour des identifications par comparaison des pics avec ceux produit dans un chromatogramme du standard. C'est la valeur du temps de rétention qui sera caractéristique de chaque composé.

Quantitatifs : Chaque pic délimite une surface proportionnelle à la quantité de matière injectée dans l'appareil. Sur un spectre, la détermination des surfaces donnera une indication relative quant aux proportions de chaque composé. Pour déterminer ces surfaces relatives, un ordinateur couplé à l'appareil calcule lui-même les surfaces par intégration.

Moyennant un étalonnage préalable avec des produits purs, la CPG permet donc l'analyse qualitative et quantitative des constituants d'un mélange.

On aura donc recours à des méthodes d'étalonnage, qui, comme en analyse qualitative, feront de la chromatographie quantitative un procédé relatif vis-à-vis de substances connues.

La principale méthode utilisée est celle de l'étalonnage interne :

Dans cette méthode, on compare individuellement chacun des pics à évaluer au pic d'une substance étalon, convenablement choisie, introduite en proportion connue dans le mélange à analyser. Il convient évidemment que le pic étalon ne soit confondu avec aucun des pics du chromatogramme.

On calculera donc la réponse de chaque soluté concerné par rapport à l'étalon. La méthode est générale. Elle est précise et reproductible.

Elle suppose néanmoins le choix d'un étalon qui, outre la nécessité de ne pas chevaucher avec les autres solutés, doit donner un pic de valeur de rétention proche de celle du pic à mesurer, d'aire approximativement égale à celle du pic du soluté, et dont la réponse doit se situer dans la zone de linéarité du détecteur utilisé.

Remarque évidente : dans tous les cas, seules des conditions opératoires identiques permettent de pouvoir comparer deux ou plusieurs chromatogrammes.

II.3. La Chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC)

(ou bien la chromatographie en phase liquide)

Il faut tout d'abord préciser que l'abréviation HPLC signifie indifféremment chromatographie liquide à haute performance ou à haute pression: Les deux termes désignent la même technique mais l'un est employé par les constructeurs de matériel qu'elle requiert tandis que l'autre l'est par ses utilisateurs.

1. HISTORIQUE

Après les travaux de Mikhaïl Semenovitch TSWETT du début du siècle, c'est dans un premier temps la chromatographie sur colonne qui prend un essor considérable. Ainsi, REICHSTEIN en 1938 montre le principe de l'élution des composés dans une colonne après leur séparation. En 1952, l'utilité des gradients d'élution est montrée puis, vers les années 1960, la chromatographie par perméation sur gel se développe. On peut situer à 1967, grâce aux travaux de HUBER et HUZSMAN, le début de la chromatographie liquide à haute vitesse, plus tard appelée à juste titre chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Rosset et al 1991).

C'est en 1969, après le 5e Symposium International « Advances in Chromatography », que la chromatographie en phase liquide s'est véritablement développée. En fait, dès 1958 Spackman, Stein et Moore analysèrent des acides aminés pour la première fois de manière automatique. Ceci marqua le début de la chromatographie en phase liquide moderne. Giddings oeuvra pour le développement de cette technique (cf. Son ouvrage Dynamics of chromatography), jusqu'à ce que Scott (Oak Ridge National Laboratory) obtienne de très bonnes résolutions en séparant plusieurs centaines de composés différents par échange d'ions sous haute pression. C'est grâce à ce nouveau procédé, et grâce surtout aux nouvelles technologies (notamment le traitement par ordinateur) que la chromatographie en phase liquide sur colonne a atteint l'efficacité de la chromatographie en phase gazeuse. Cette chromatographie en phase liquide sous haute pression, ou haute performance (HPLC) est désormais la seule utilisée en analyse.

2. GENERALITE

Elle peut ne comporter qu'un appareillage simple, (figure 1) constitué d'une colonne de verre remplie de particules de phase stationnaire, le solvant migrant sous le simple effet de la

pesanteur. Toutefois, dans de telles conditions, la résolution obtenue est relativement médiocre.

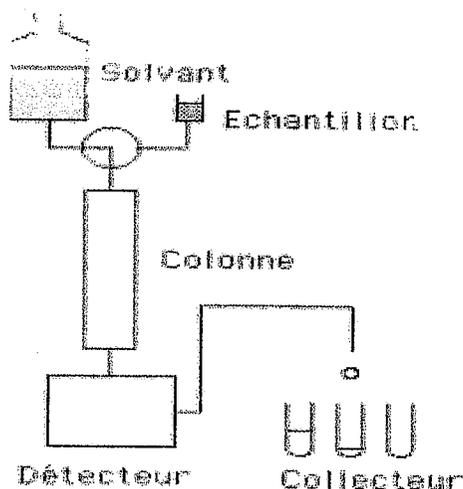


Figure 1: HPLC

Cette chromatographie à basse pression, malgré sa faible efficacité est encore employée dans les méthodes préparatifs du fractionnement des échantillons biologiques complexes, car son très faible coût devient un atout majeur pour ce choix (Kirkland JJ 1973).

La chromatographie en phase liquide à haute pression a permis une véritable révolution de la chromatographie classique grâce à la miniaturisation des colonnes et à l'utilisation de fortes pressions augmentant les débits et l'efficacité de résolution de la colonne par diminution des quantités de produits à analyser (Perry SG et al. 1972).

Catalogue Des Techniques : (figure 2)

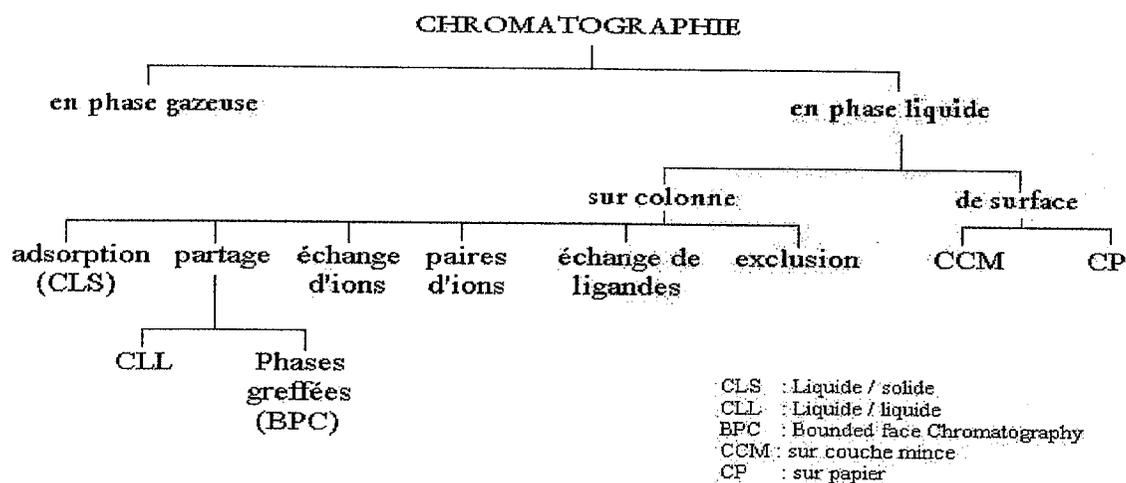


Figure 2: Catalogue des techniques d'après: Rosset et al. 1982

En effet la phase mobile liquide est poussée par un jeu de pompes à haute pression dans la colonne chromatographique renfermant la phase stationnaire solide. Selon l'affinité des composés du mélange injecté pour la phase mobile et stationnaire, une séparation et une récupération des composés peuvent être effectuées.

L'HPLC se caractérise comme une technique à la fois qualitative de séparation, mais aussi quantitative car elle permet la récupération, selon leur temps de rétention dans la colonne, des analytes individualisés.

La chromatographie liquide à haute pression est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne (qui présente les inconvénients que sont la lenteur des séparations, l'absence de détecteurs et la quantité considérable d'échantillon nécessaire), mais met en jeu un matériel plus sophistiqué. Dans cette variante, l'intérieur de la colonne est soumis à une forte pression. Les différents constituants vont être séparés de façon plus efficaces, ce qui permet de travailler avec des colonnes plus petites. Alors qu'une colonne standard fait entre 20cm et 1m de haut, une HPLC peut se contenter de 5cm pour la même efficacité. Cela permet d'utiliser une quantité moindre du milieu poreux ou de travailler avec moins de solvants et donc moins de substance. La HPLC présente un champ d'application très vaste (molécules sensibles à la chaleur ou de hautes masses moléculaires) en raison d'un choix important de phases stationnaires et de l'évolution des détecteurs (Done JN et al. 1974)

3. DOMAINES D'APPLICATION

La chromatographie liquide à haute performance a pour objet plus une analyse quantitative que qualitative car il paraît difficilement envisageable de balayer tout l'intervalle de longueurs d'onde accessible pour détecter n'importe quel produit contenu dans la solution étudiée. Les domaines d'application de la HPLC sont extrêmement nombreux et vastes, mais elle est particulièrement employée en cosmétologie ou en biochimie. Elle permet l'analyse soit de substances thermiquement instables, puisque l'opération s'effectue à température ambiante, soit de substances peu volatiles de masse moléculaire pouvant atteindre 2 000 000, soit encore de substances ionisées. C'est ainsi une méthode « douce » avec les molécules. Les molécules d'intérêt biologique comme les vitamines, les sucres et les acides aminés, peuvent être analysées directement sans passer par la formation de dérivés, et la séparation de protéines et de polymères synthétiques peut être réalisée, même si leur masse est élevée. Ses inconvénients majeurs proviennent du manque de souplesse instantanée d'utilisation

(difficulté de passer d'un composant à l'autre sans une mise au point élaborée) et de la grande délicatesse de la technique (Rosset R et al. 1982).

Quand la CPG n'est pas applicable à des mélanges organiques complexes, en raison de leur masse moléculaire ou de leur polarité trop importantes, la HPLC permet de réaliser de nombreuses identifications ou dosages sans modification de l'échantillon initial.

Ainsi, un nombre important de travaux concernent l'analyse des pigments ou colorants des textiles (Quye A et al. 1996), de patines d'objets divers (Pastore P et al 1991), de tannins (Wallert A et al. 1996), de résines anciennes (Vieillescazes C et al. 1993), ou de liants de peintures (Halpine SM 1992).

4. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

L'échantillon doit être totalement soluble dans la phase mobile qui sera appelé solvant d'élution (solvant ou mélange de solvants). Celui-ci doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges.

Elle peut donc mettre en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage, qui sont les plus courants, que des phénomènes d'adsorption, d'échanges d'ions ou d'exclusion. (Hamilton RJ et al. 1977).

La méthode de séparation qu'elle utilise fait sensiblement appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire. Il est par ailleurs recommandé de faire précéder la colonne d'une précolonne dont le remplacement éventuellement occasionné par un colmatage de l'appareil par une accumulation de molécules de trop grosse taille serait moins onéreux que celui de la colonne elle-même (sa période avoisine en moyenne le millier de manipulations). La grosse différence réside dans la durée d'élution qui est de 100 à 1000 fois plus courte (de 1 à 3 cm³ par minute). Une telle vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée de l'ordre de 200 bars grâce à une pompe qui maintient constant le débit du liquide. De telles vitesses d'élution n'auraient jamais été rendues possibles si on n'avait pas réussi à améliorer l'efficacité des colonnes en uniformisant la granulométrie et en réduisant la grosseur des grains; ces progrès ont entraîné la réduction de l'espace vide entre les grains, d'où une augmentation des interactions entre le soluté et la phase stationnaire. Actuellement les colonnes contiennent des granulés d'environ 5 µm sur lesquels la phase stationnaire est fixée chimiquement; de telles phases sont appelées phases greffées.

La technique se distingue également de la chromatographie classique par l'emploi de détecteurs dont le message est enregistré puis exploité par un ordinateur relié au système. Il

Il permet d'obtenir soit des spectres (pics de différentes longueurs d'onde à un temps donné) ou des chromatogrammes (évolution des pics à une longueur d'onde donnée en fonction du temps). Il est souvent difficile de trouver rapidement les conditions opératoires qui mèneront à une bonne séparation en raison des interactions du soluté avec la phase stationnaire et la phase mobile.

5. INSTRUMENTATION

Dans tous les appareils de HPLC, figure 3, on retrouve un ensemble de modules (organes) reliés entre eux par des tubes de faible diamètre. Une ou plusieurs pompes assurent le débit du solvant d'éluion. En amont de l'injecteur se trouve la ou les colonnes où s'effectuera la séparation puis en bout de chaîne le détecteur (HUBER JFK 1978).

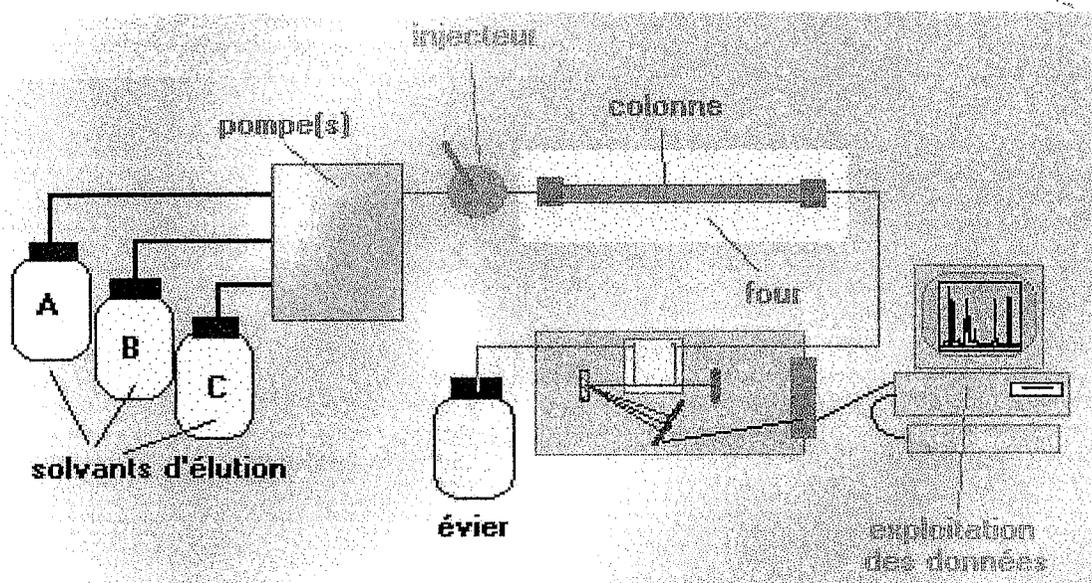


Figure 3 : Système classique de HPLC avec un détecteur à barrettes de diode

5.1 Réservoir

Plusieurs flacons d'éluants d'éluion contenant la phase mobile en quantité suffisante (réservoirs de solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluion (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

On recommande l'emploi de vases clos pour éviter l'évaporation, surtout si l'un des solvants est très volatil et lorsqu'il est nécessaire d'être en présence d'un gaz inerte.

5.2 Pompe

Elle est muni d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min.

Les pompes ont constitué, au moment de la mise au point de la technique, la principale cause de difficulté des utilisateurs. Le débit de liquide qu'elles refoulaient étant fréquemment irrégulier, il en résultait, sur l'enregistrement, une ligne de base instable. Les problèmes semblent être résolus, car certaines pompes fournissent désormais un débit constant jusqu'à des pressions de 240 bars; elles demeurent tout de même la partie la plus délicate de l'appareillage.

5.3. L'injecteur

C'est un système de vannes haute pression permettant à la solution à analyser, amenée par une micro-seringue automatique, de se mélanger à l'éluant rapidement sans perturber la circulation uniforme de la phase mobile dans la colonne.

Le type d'injecteur le plus courant consiste en une vanne à boucle d'échantillonnage. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

On introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu; après rotation de la vanne, la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de colonne.

Il est constitué d'une **vanne haute pression** (manuelle ou non) à plusieurs voies dont le fonctionnement se déroule en deux étapes (figure 4):

1. remplissage de la boucle :

le solvant d'éluant circule librement de la pompe (en 1) à la colonne (en 2). L'injection est réalisée (en 6) dans la boucle. Le surplus de solvant est évacué dans l'effluent, communément appelé l'évier (en 4).

2. injection de l'échantillon :

on bascule la vanne par action d'un levier et le solvant va alors balayer la boucle (de 1 à 2) et entraîner l'échantillon dans la colonne.

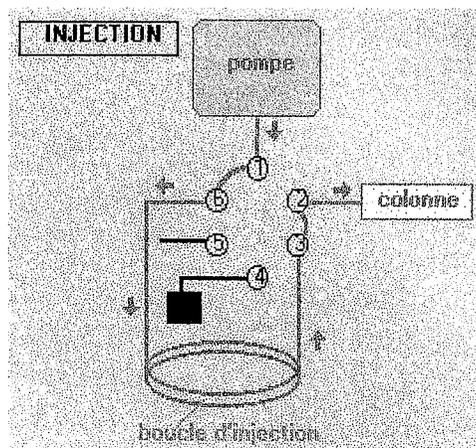
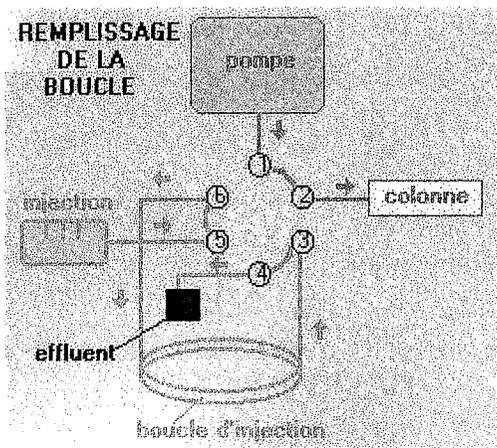


Figure 4 :
1^{re} étape de l'injection avec une vanne six voies 2^e étape de l'injection avec une vanne six voies

5.4. La Colonne

C'est la principale évolution de l'HPLC. Elle a été miniaturisée pour des dimensions optimales de séparation : 25cm de longueur et 4 à 5 mm de diamètre. Elle est protégée par un tube inox et contient la phase stationnaire solide, fonction de la nature des composés à analyser :

La colonne devant recevoir la phase stationnaire est en généralement un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, en acier inoxydable de 3 à 30 cm de longueur et de diamètre compris entre 1 et 5 mm.

Les tubes capillaires employés pour relier la colonne au détecteur doivent être le plus court possible afin de limiter les volumes morts et par conséquent ne pas altérer la qualité de la séparation. Un fabricant a mis au point un dispositif permettant de réduire encore ce volume mort en employant une colonne de matière plastique soumise à une pression radiale (Huber JFK 1978).

PHASE STATIONNAIRE

Les phases stationnaires en HPLC sont très variées. Elles sont constituées de grains sphériques calibrés de diamètre 3 à 5 μm .

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

La phase stationnaire normale:

Elle est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire, présente des sites hydrophiles en surface (chromatographie sur adsorbant). Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne les premiers, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

La phase stationnaire inverse :

Elle est majoritairement composée de silices greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette phase est apolaire, présente des sites et nécessite donc un éluant polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol MeOH ou d'acétonitrile ACN avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier, et les hydrocarbures sont fortement retenus. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

PHASE MOBILE LIQUIDE

Elle est fonction du mélange à séparer. S'il s'agit du mélange d'un produit organique : le cyclohexane et d'un produit apolaire : c'est la chromatographie en phase normale ; ou d'un produit polaire si la phase stationnaire est peu polaire : c'est la chromatographie en phase inversée.

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile.

5.6 Le Détecteur

Les détecteurs font le lien entre le phénomène physico-chimique et sa représentation visuelle qui en permet l'étude. Il n'existe pas de détecteur universel en chromatographie liquide, mais plusieurs détecteurs spécifiques de grande sensibilité.

Les détecteurs les plus usuels sont :

Description du spectrophotomètre UV-visible

Il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. Il opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisé pour des longueurs d'ondes variant de 190-390 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisé à la longueur d'onde non variable de 254 nm.

Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand ;
- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

Principe du détecteur UV (Figure 5) :

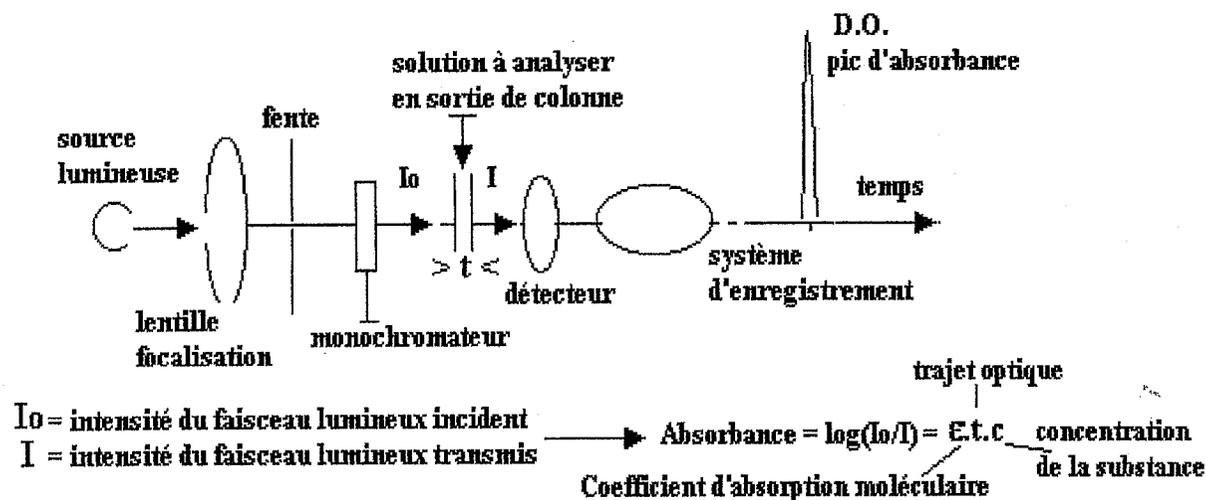


Figure 5 : Principe et lois générales du spectrophotomètre

Le détecteur à absorption dans l'ultraviolet est très sensible et sa réponse varie linéairement avec la concentration de l'échantillon. La détection de certaines molécules s'avère cependant impossible avec ce détecteur mais celles-ci sont en petit nombre car en choisissant bien la longueur d'onde, presque tous les composés sont détectés, car même si l'absorption est très faible, elle peut être amplifiée. D'autre part, les facteurs de réponse varient selon la nature des substances analysées.

Ce procédé de détection est très utilisé car un grand nombre de solutés absorbent dans l'ultraviolet et les phases éluantes sont transparentes jusqu'à des longueurs d'onde de 200 nm. Il existe des spectrophotomètres dont la longueur d'onde est réglée par l'opérateur, des spectrophotomètres programmables en longueur d'onde et en sensibilité dans le temps, et enfin les spectrophotomètres à barrette de diodes.

Le passage de chaque substance séparée se traduit par la sortie de ce qu'on appelle communément un pic, de la forme d'une courbe de Gauss (critère de pureté). C'est l'absorbance ou densité optique (DO) ou extinction.

La surface du pic considéré est proportionnelle à la concentration de la substance qu'il représente. Il est indispensable de traiter de la même façon un pic de substance témoin

chromatographiée dans des conditions identiques. Si la concentration de la substance témoin est connue, une règle de trois fournit le résultat. Cette méthode n'est valable que si les conditions de chromatographie sont parfaitement reproductibles et que les pics sont séparés distinctement les uns des autres. Les fractionnements de bonne qualité impliquent une bonne séparation des pics aussi complète que possible et que l'étalonnage des colonnes à l'aide de substances témoins bien choisies est indispensable. On introduit dans les substances à chromatographier une molécule de même nature servant d'étalon interne. Les appareils électronique et informatique actuels permettent d'effectuer les calculs de surfaces des pics et de fournir directement les pourcentages de surface de chaque pic au cours d'une même séparation chromatographique. C'est une méthode la plus utilisée, générale, précise et reproductible. Elle suppose néanmoins le choix d'un étalon dont le pic ne doit pas chevaucher avec les autres solutés mais avoir une valeur de rétention proche des pics à mesurer et d'amplitude du même ordre de grandeur que ceux à mesurer.

Le Réfractomètre :

Le détecteur à réfractomètre différentiel est basé sur la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent à la sortie de la colonne. Son utilisation est moins répandue que celle du détecteur à UV à cause de sa plus faible sensibilité. De plus, il est très sensible à des variations de température. Il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur. Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une base d'acquisition. D'autres détecteurs tels que ceux à fluorescence et à conductivité électrique existent mais sont limités à la détection de substances très spécifiques.

5.6. Solvants

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour la HPLC ; ils doivent être dégazés et filtrés avant usage. Le dégazage est effectué au moment de la filtration sous vide ou par ultra sons ; il assure une bonne reproductibilité et évite l'apparition d'une oscillation sur la ligne de base. Malgré la haute qualité des solvants, la filtration sur filtre spécial (0,4 μm) est recommandée pour empêcher l'obstruction éventuelle des orifices

III. LA SPECTROFLUORIMETRIE APPLIQUE A LA MESURE DE L'ORAC

1. LES RADICAUX LIBRES

Toutes les cellules de notre organisme ont besoin d'oxygène, en particulier pour produire de l'énergie à partir des glucides, des lipides, et des protéines apportées par notre alimentation. L'oxygène est indispensable à la vie, mais au cours des réactions métaboliques normales, apparaissent, en très faibles quantités, des formes très réactives de l'oxygène, qui peuvent provoquer des dommages et des lésions irréversibles dans l'organisme. Parmi ces dérivés actifs de l'oxygène, beaucoup sont des radicaux libres (RD) caractérisés par le fait qu'ils leur manquent un électron, ce qui les rend très instables et très réactifs. La plupart des effets préjudiciables de l'oxygène pourraient être attribuées à la formation des RD de l'oxygène.

L'oxygène est à l'origine de la plupart des RD formés dans l'organisme. Les RD sont des armes à double tranchant: ils protègent l'organisme contre les micro-organismes et les cellules tumorales mais ils sont aussi à l'origine de l'altération et l'usure des tissus.

Tout atome ou molécule, neutre ou ionisée, comportant au moins un électron célibataire dans une orbitale externe est un radical libre. Les RD sont caractérisés par une grande réactivité chimique et une courte durée de vie.

Le métabolisme cellulaire normal produit en permanence des espèces oxygénées réactives. Par exemple, au cours de la respiration, nécessaire à l'entretien de la vie de notre organisme, chacune de nos cellules réduit l'oxygène en eau. Parfois, une petite partie de cet oxygène échappe à la transformation complète, ce qui aboutit à la production en permanence d'une espèce d'oxygène très réactive: l'anion superoxyde (caractéristique des RD). Il se déclenche ainsi une réaction d'oxydation en chaîne, à partir des diverses réactions chimiques de notre organisme, générant des RD, aboutissant à des micro-lésions des membranes cellulaires ou des structures comme l'ADN.

Certaines agressions comme l'irradiation, ou les substances toxiques (alcool, médicaments, tabac, pollution, radiation UV...) peuvent entraîner une production de RD.

2. LE STRESS OXYDATIF

On appelle stress oxydatif une augmentation de radicaux libres de l'oxygène qui provoque des dommages cellulaires irréversibles (Guetteridge 1993). Les mécanismes d'oxydation sont essentiels pour le fonctionnement cellulaire, mais un dérèglement peut provoquer un stress oxydatif c'est à dire l'apparition de RD très agressifs pour l'organisme et responsable

de nombreuses pathologies. Le stress oxydatif correspond à une perturbation du statut oxydatif intercellulaire (Morel et col. 1999).

Le stress oxydatif dû aux RD entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines de l'ADN ou des lipides.

Le stress oxydatif est largement accepté comme composant critique impliquée dans la plupart des voies pathologiques (cancer, diabète, sida, maladies cardiovasculaire....Ceriello et al. 1998).

3. LE POUVOIR ANTIOXYDANT (ORAC)

Notre travail consiste à déterminer le pouvoir antioxydant total du plasma, c'est à dire sa capacité à absorber les radicaux oxygènes libres (ORAC) ou alors sa capacité de réaction au stress oxydatif, chez les diabétiques par comparaisons avec des sujets sains.

Notre but est donc de quantifier l'ORAC en utilisant une méthode physico-chimique simple et particulièrement intéressante au niveau des sérums de sujets diabétiques où le stress oxydatif est important.

Le principe de cette méthode est l'utilisation d'une sonde fluorescente, l'APC (allophycocyanine) fluorescente, protéine présente dans les cyanobactéries (bactéries photosynthétiques contenant, outre de la chlorophylle, différents pigments) et les algues rouges. Cette protéine perd sa fluorescence lorsqu'elle est agressée par des RD. L'ORAC est alors la capacité du plasma à neutraliser les RD, donc à freiner la perte de fluorescence de l'APC.

La mesure de la fluorescence se fait grâce à un spectrofluorimètre. L'ORAC de chaque échantillon est calculé en mesurant la surface nette de protection sous la courbe cinétique de la perte de fluorescence de l'APC.

4. LA FLUORIMETRIE

La spectroscopie a pour objet d'apporter des renseignements sur les interactions entre la matière et les radiations électromagnétiques. Ces interactions conduisent à des manifestations différentes comme l'absorption ou l'émission de lumière (luminescence).

L'intensité lumineuse est proportionnelle aux nombres de photons.

Selon leur énergie ($h\nu = hc/\lambda$), les photons interagissent avec différents éléments moléculaires ou atomique qui sont résumés dans la figure 1.

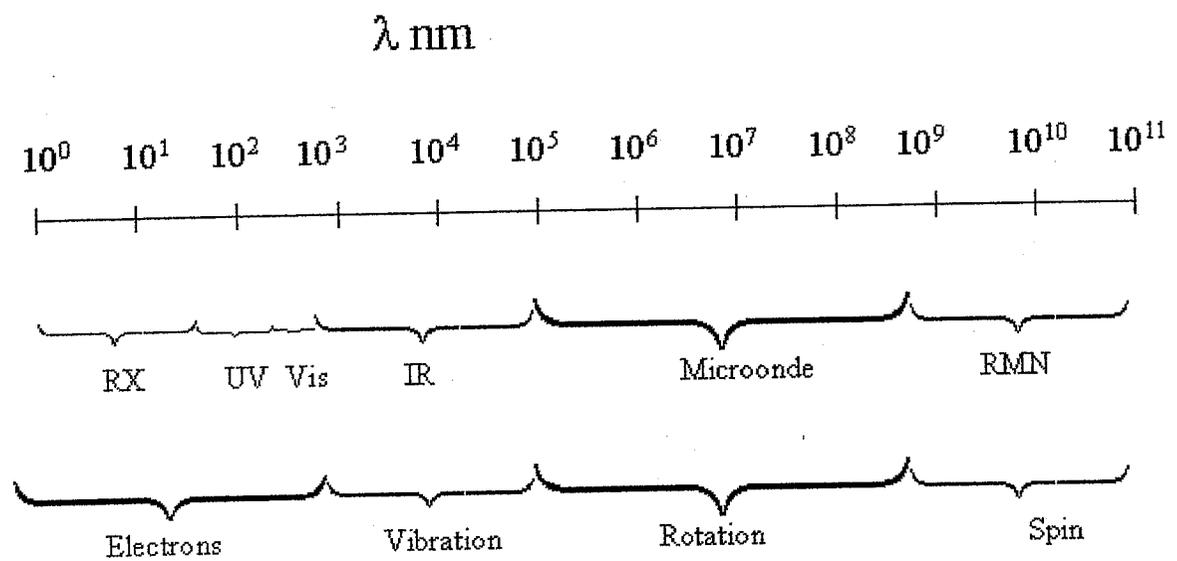


Figure 1: spectre photonique

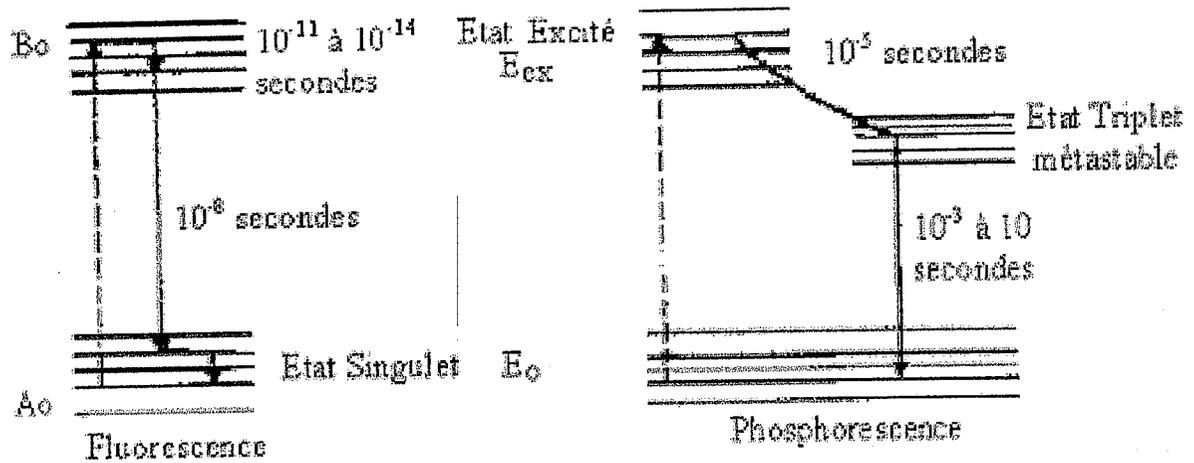


Figure 2 : Phénomènes de fluorescence et de phosphorescence

A l'état normal, une molécule occupe un niveau électronique fondamental E_0 et à l'intérieure de ce niveau E_0 un niveau de vibration A_0 . Lorsque cette molécule est soumise à un apport d'énergie lumineuse suffisant sous forme de rayonnement (X ou UV), elle est activée (absorption d'énergie) et passe à un niveau ou état d'énergie supérieur électronique dit excité E_{ex} , après être passé par un niveau de vibration B_0 instable de courte durée de vie (environ 10^{-15} secondes). Ensuite la molécule revient rapidement à l'état fondamental (de 10^{-14} à 10^{-11} secondes) en cédant de l'énergie au milieu, soit sous forme de lumière (luminescence) soit sous forme de chaleur, étant due à des chocs intermoléculaires. La luminescence est un phénomène qui se traduit soit par la fluorescence à partir de l'état excité soit par phosphorescence à partir d'un état métastable (intermédiaire entre l'état excité et l'état fondamental).

La fluorescence se produit très rapidement tandis que la phosphorescence persiste un peu plus après l'arrêt de l'irradiation de l'excitation. Au cours de ces phénomènes de retour à l'état fondamentale, la perte d'énergie sous forme de chaleur due aux chocs intermoléculaires implique que la radiation émise a toujours une énergie inférieure à celle de la radiation excitatrice. Ainsi, la longueur d'onde λ_f de la fluorescence correspondante à l'émission de lumière visible par une substance est toujours supérieure à celle de la radiation visible ou invisible qui a servi à l'excitation λ , $\lambda_f > \lambda$. Ceci correspond à la loi de Stokes (figure 2).

Toutes les molécules ne fluorescent pas, mais il en existe un grand nombre. On peut susciter la fluorescence de certains composés, car leur structure moléculaire diffère de celle de la plupart des composés à base carbonique, qui ont des liaisons normaux carbone-hydrogène. La plupart des composés fluorescents renferment des noyaux aromatiques et sont à base de pétrole ou d'hydrocarbure.

Quelques composés présents dans la nature émettent une fluorescence, et c'est le cas notamment de la chlorophylle contenue dans les feuilles des plantes.

Les glaucophytes forment un petit groupe d'algues dont l'origine est encore mystérieuse. L'analyse de leurs séquences d'ADNr codés indiquent qu'ils ont des ancêtres avec les algues rouges vertes/plantes. Ces algues sont caractérisées par un plaste particulier, la cyanelle, une cyanobactérie, qui outre la chlorophylle a comporte des pigments surnuméraires bleus/verts tel que le phycoérythrine, le phycocyanine et l'allophycocyanine. Ces pigments sont des hétéroprotéines avec une partie non protéique responsable de la fonction fluorescente de la molécule après absorption de photons correspondant à l'ensemble des radiations visibles du rayonnement solaire.

Mesure du temps de vie de fluorescence

La fluorescence a une durée de vie qui suit, en fonction du temps, une loi exponentielle (figure 3). Il est possible pour mesurer ce paramètre d'utiliser un spectrofluorimètre ou un fluorimètre. Entre ces deux types d'appareil, le spectrofluorimètre a la possibilité d'explorer tout le domaine spectral (UV et visible) et d'enregistrer les spectres d'excitation et de fluorescence en fonction des longueurs d'onde. Les simples fluorimètres utilisent des filtres colorés ou interférentiels et permettent seulement de travailler à longueur d'onde fixe d'excitation ou de fluorescence.

5. LE SPECTROFLUORIMETRE

Ce procédé utilise le phénomène de fluorescence naturelle pour l'analyse: certains composés organiques absorbent des radiations dans l'ultraviolet et réémettent à une longueur d'onde supérieure. La réponse est linéaire en fonction de la concentration aux faibles valeurs de celle-ci. C'est pourquoi on utilise cette technique pour l'étude de traces (les quantités minimales détectables peuvent être de quelques femtomoles). On peut encore abaisser ce seuil en diminuant le bruit de fond. Pour cela, il est possible de substituer un laser à la source lumineuse classique, ou alors d'utiliser une excitation chimique à la place de l'excitation lumineuse (on parle alors de chimiluminescence). La fluorimétrie est très sensible mais aussi très sélective (peu de molécules sont naturellement fluorescentes). Grâce à des techniques de dérivation pré- ou post colonne, il est néanmoins possible de modifier les molécules afin de les rendre fluorescentes

Un spectrofluorimètre comprend (figure 4):

- Une source lumineuse grâce en générale à une lampe arc au xénon-mercure qui émet un spectre d'intensité continu de 200 à 800 nm environ.
- Des monochromateurs à prisme ou à réseau qui permet d'isoler des bandes passantes étroites et d'analyser les spectres par rotation de prismes ou de réseaux. Cette rotation est effectuée par un moteur synchronisé avec l'enregistreur permet ainsi directement l'inscription graphique du spectre.
- Les cuves, pour contenir les échantillons à analyser, en quartz poli sur les 4 faces (prix élevé), ou en milieux synthétiques
- Un détecteur qui permet d'obtenir un signal d'intensité proportionnelle à la fluorescence, relié à un enregistreur

MATERIEL ET METHODES

I. Les échantillons biologiques

Les échantillons de sang proviennent de:

- patients diabétiques insulino-dépendants (DID, ou type 1) et non insulino-dépendants (DNID, ou type 2) recrutés au service de médecine interne du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen
- sujets sains volontaires, exempts de toute pathologie

Les prélèvements de sang se font sur la veine du pli du coude à jeun.

1. Une quantité de sang prélevé est récupérée dans des tubes à EDTA (anticoagulant) :

Certains de ces échantillons de sang prélevés sur EDTA servent à l'isolement des **lymphocytes**. Les autres sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 minutes puis après prélèvement du **plasma**, le culot (dépôt accumulé au fond du tube) est mesuré puis utilisé pour l'isolement des **membranes des globules rouges**.

2. L'autre partie est recueillie dans des tubes secs :

Après coagulation du sang prélevé sur tubes secs, et centrifugation 3000 tr/min pendant 15 min, le **sérum** est récupéré et est conservé avec une solution NaN_3 à 0,2% et de Na_2EDTA à 10%, à raison de 10 $\mu\text{l/ml}$ en vue des différents dosages.

Le sérum est ainsi utilisé pour l'isolement des **lipoprotéines**, le dosage des vitamines et la détermination de l'ORAC

II. Les Méthodes utilisées :

II.1. Séparation des lipoprotéines par ultracentrifugation

II.1.1. Isolement des lipoprotéines de densité < 1,21g/ml

La densité du sérum est ajustée à 1,21g/ml, par addition de KBr sec (0,322g/ml de sérum), selon la technique de Havel RJ et al. 1955.

Les lipoprotéines totales sont isolées à partir de 2ml de sérum, par ultracentrifugation de flottaison à 122.000g, pendant 48h, à 15°C, dans une ultracentrifugeuse Beckman de type L8-55, équipée d'un rotor 50Ti.

Pour cela, le sérum alourdi est placé au fond d'un tube en polyallomer à paroi rigide, avec 4 ml de solution KBr/NaCl de densité égale à 1,21. Cette première ultracentrifugation permet d'obtenir les lipoprotéines totales purifiées, avec seulement quelques traces d'albumines et de globulines.

II.1.2. Isolement des fractions VLDL, LDL et HDL à partir des lipoprotéines totales ($d < 1,21 \text{g/ml}$)

Les différentes fractions des lipoprotéines sont séparées par ultracentrifugation sur gradient de densité, selon la technique de Redgrave TG et al. (1975) modifiée. Dans un tube à centrifuger en polyallomer de 13,5ml de volume, un gradient discontinu est formé de la façon indiquée sur la figure 1.

A l'aide d'une seringue en verre de 5ml, munie d'un embout de la longueur du tube, des solutions salines de KBr et de NaCl de différentes densités sont déposés au fond du tube, en commençant par 2ml d'une solution de densité 1,005g/ml, puis en dessous de celle-ci, 1ml d'une solution de densité 1,150g/ml, puis, 2ml d'une solution de densité 1,21g/ml, et enfin, 2,5ml de lipoprotéines totales alourdis à la densité 1,24g/ml par addition de solution NaCl/KBr de densité 1,346g/ml. Cette opération doit se faire avec beaucoup de soins afin de respecter les paliers de gradient.

Les tubes sont ensuite placés dans un rotor Beckman type SW41, et sont centrifugés 24h à 172000g à 15°C, dans l'ultracentrifugeuse Beckman L8-55

Après centrifugation, et après avoir prélevé avec une pipette automatique les VLDL surnageantes visibles sous forme d'un anneau lactescent à la surface du tube, les autres lipoprotéines sont prélevées en continu. Le système de récupération utilisé est schématisé sur la figure 2: Durant cette opération, les pics correspondants aux fractions LDL et HDL sont identifiés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 280nm (figure 3).

Les différentes fractions de lipoprotéines sont ensuite dialysées contre du NaCl 0,15M, pH7,4, contenant 0,04% de Na₂ EDTA, sous agitation constante, pendant 24h à 4°C.

Les différentes lipoprotéines sont remises aux biologistes pour être analysés (dosage cholestérol, triglycéride ...)

II.1.3. Isolement des membranes des globules rouges

Le culot obtenu après centrifugation des échantillons de sang prélevé sur EDTA, est lavé 3 fois de suite avec une solution tampon isotonique à pH 7.6. Une hémolyse des globules rouges est effectuée par la suite avec une solution tampon hypotonique pH 7.8. Après centrifugation à 10000tr/mn à 4°C, et lavage avec l'eau distillée, les membranes sont récupérées sous forme de culot.

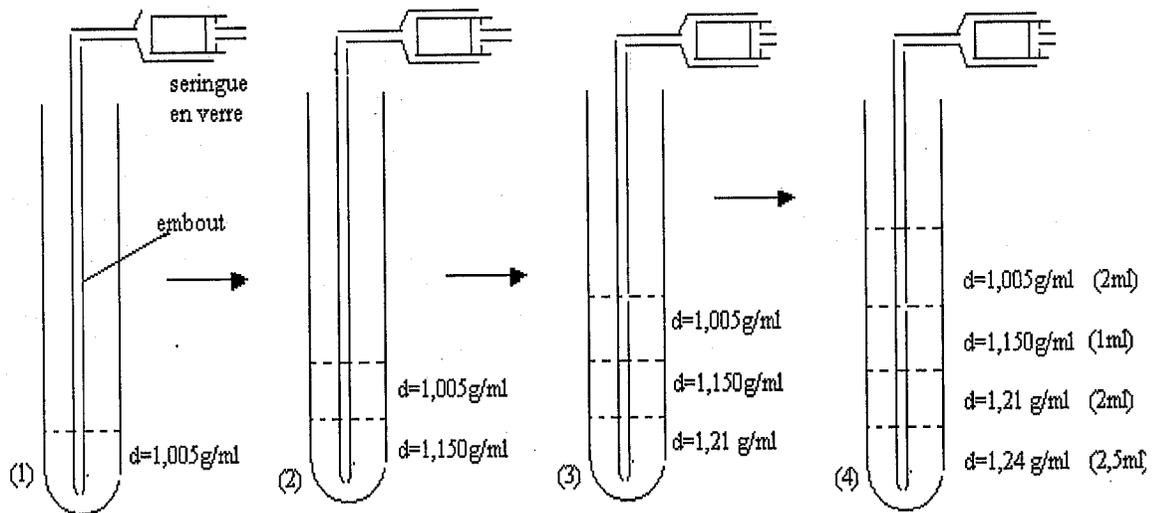


Figure 1: Formation du gradient continu

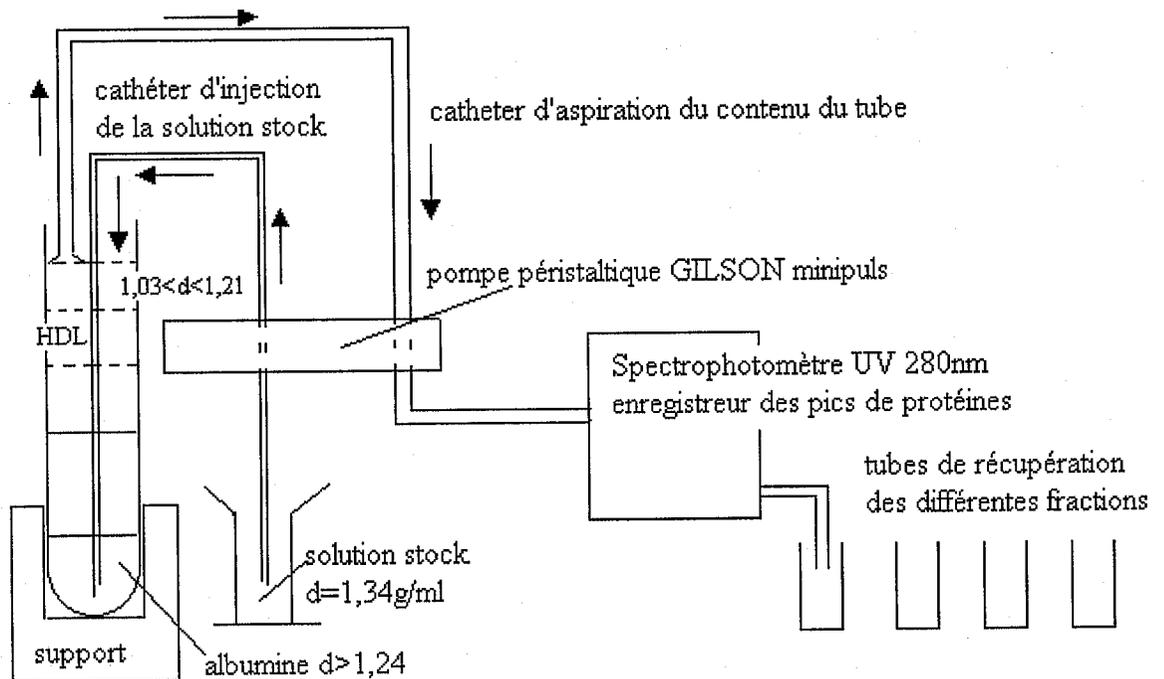


Figure 2 : Système de récupération des lipoprotéines après séparation par ultracentrifugation par gradient de densités (Les VLDL ayant déjà été prélevées)

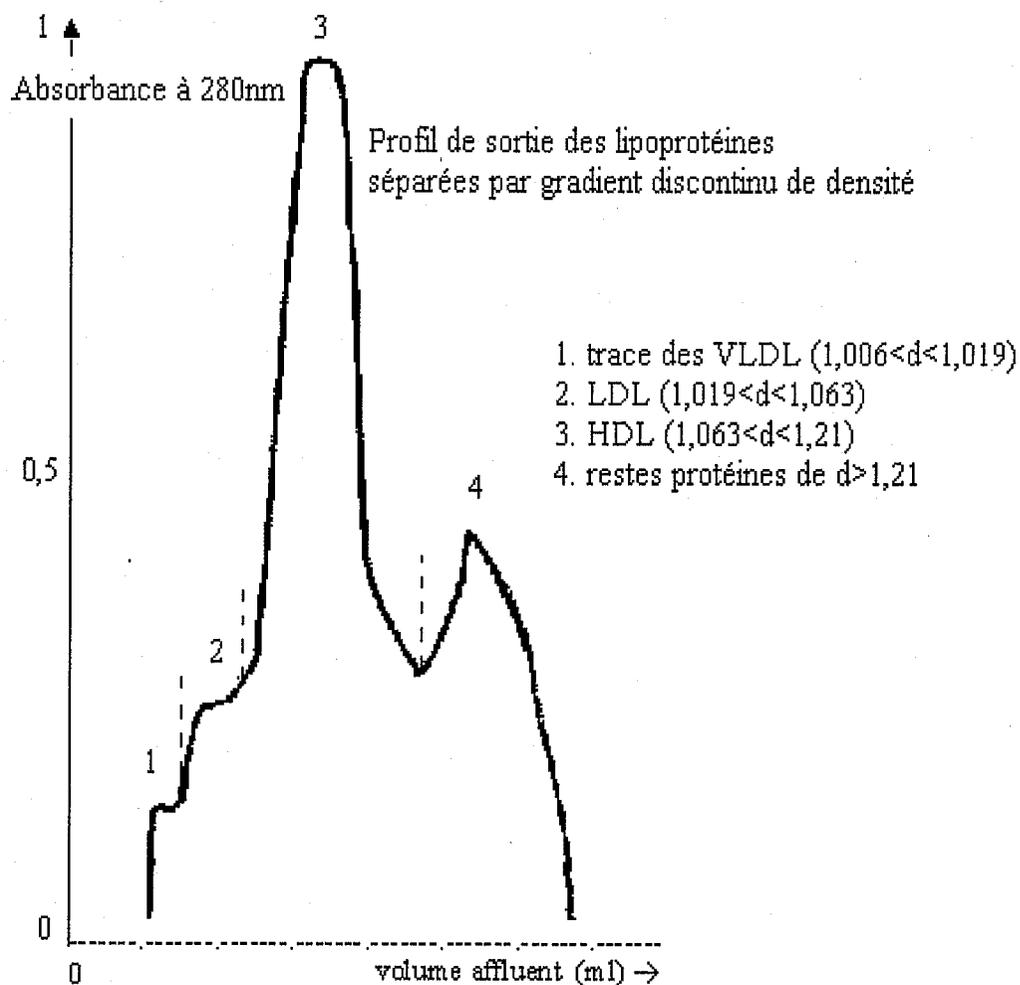


Figure 3: Profil de sortie des lipoprotéines séparées par gradient discontinu de densité

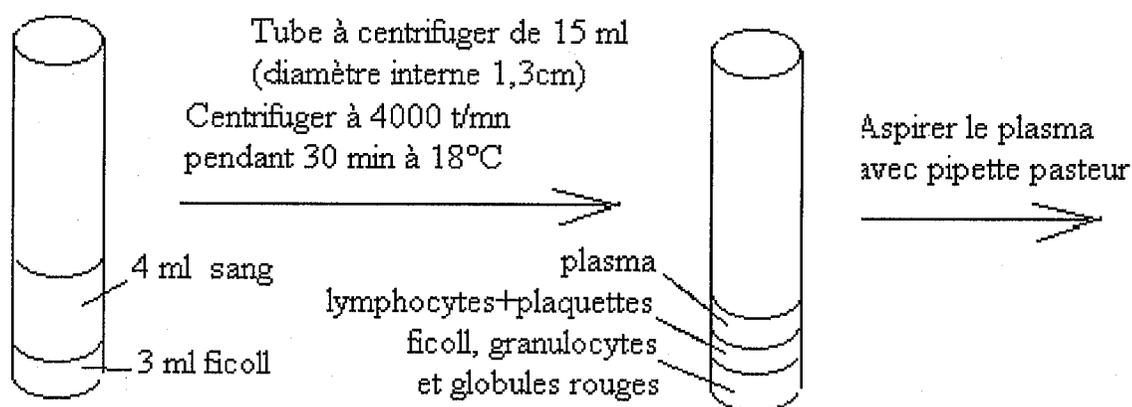


Figure 4: Isolement des lymphocytes grâce au ficoll

II.1.4. Isolement des lymphocytes

L'isolement des lymphocytes se fait grâce au ficoll, dont la densité est supérieure à celle des lymphocytes, ce qui permet à ces derniers de s'isoler en forme d'anneau. Après une centrifugation, il est facile de les récupérer à l'interface entre le plasma et le ficoll. Après l'élimination du plasma par aspiration douce, l'anneau qui contient les cellules sanguines mononucléaires est aspiré à son tour en évitant de prélever le ficoll. (figure 4)

La grande recommandation est d'éviter de mélanger le sang au ficoll au début de la manipulation, afin d'avoir une séparation nette des deux phases.

Remarques : - Il faut respecter les rapports en volume (ficoll/sang; 3/4, V/V) sinon on risque une contamination avec les globules rouges. - Le plasma peut être utilisé pour les dosages.

Après cela, les lymphocytes sont lavés avec une solution saline pour éliminer les contaminants (plaquettes, plasma, ficoll...)

Pour le lavage, on procède de la façon suivante:

L'anneau contenant les lymphocytes est transféré dans un tube à centrifuger propre à l'aide d'une pipette pasteur. 6ml de solution saline équilibrée composée à son tour d'un mélange de deux solutions qui sont :

Solution A : D-glucose anhydre 0,1% (concentration 1g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $5 \times 10^{-5}\text{M}$ (concentration 0,0074g/l), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $9,8 \times 10^{-4}\text{M}$ (concentration 0,1992g/l), KCl $5,4 \times 10^{-3}\text{M}$ (concentration 0,4026g/l), Tris 0,145M (concentration 17,765g/l), pH 7,6

Solution B : NaCl 0,14M (concentration 8,19g/l)

1 volume de solution A / 9volume de solution B sont ajoutés

Après mélange et centrifugation à 100g pendant 10 min à 18°C, le surnageant est enlevé.

L'opération est recommencée 2 fois, et les lymphocytes sont prêts à l'emploi.

II.2. Détermination de la composition en acides gras des lipides membranaires par chromatographie gazeuse (CPG)

L'extraction des lipides membranaires des globules rouges et des lymphocytes se fait par la méthode de Blight and Dyer 1959 grâce à un mélange méthanol/chloroforme/NaCl 2M (1/1/0,9;V/V/V).

La séparation des phospholipides, composant phospholipidique majeur des membranes, se fait par chromatographie sur couche mince (CCM):

L'extrait lipidique est déposé sur les plaques de gel de silice (G 60, Merck, Allemagne). La migration se fait grâce à un mélange d'hexane, d'éther diéthylique, et d'acide acétique

(90/30/1; V/V/V). Après migration, la révélation se fait grâce aux vapeurs d'iode. Les phospholipides qui demeurent au niveau du dépôt, sont grattés dans un tube en verre soviél. La composition des acides gras des phospholipides est déterminée par la chromatographie CPG: Après addition d'une quantité connue de standard interne (acide héptadécanoïque: 17:0, C₁₇H₃₄O₂ dilué dans du benzène à 2mg/ml), les AG sont saponifiés grâce à l'addition de NaOH méthanolique, puis sont méthylés par le bromotrifluoromethanol (BF₃). La séparation des différents AG est réalisée par la suite par CPG (colonne capillaire en pyrex de 39m de longueur et 0,3 mm de diamètre interne, remplie avec du carbowax 20M, Applied Sciences Labs, State College, PA). Le chromatographe est équipé d'un injecteur de type ROS et d'un détecteur à ionisation de flamme relié à un intégrateur-calculateur Enica 21 (Delsi instruments, France). L'identification des AG est réalisée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des standards d'AG (Elysiam, USA). La surface des pics d'AG est proportionnelle à leur quantité; elle est calculée à l'aide d'un intégrateur.

II.3. Dosage des vitamines A et E par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les vitamines A(rétinol) et E(α tocophérol) sériques sont analysés par HPLC en phase inverse selon la méthode de Zaman Z et al. 1993. Cette méthode permet une analyse quantitative basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration des vitamines A ou E présente dans le sérum, par comparaison au pic de l'étalon interne, Tocol (Lara Spiral, Couternon, France), introduit dans l'échantillon avant l'injection dans le chromatographe.

La phase stationnaire inverse est composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbones (colonne C18; 200mmx4,6mm; Lara Spiral). La phase mobile est constituée par le mélange méthanol/eau (98/2, V/V), délivrée à un débit constant, 1ml/min grâce à une pompe (Waters 501 HPLC Pomp).

Après précipitation des protéines par l'éthanol et addition de l'étalon interne (5 μ g de tocol pour 200 μ l de plasma), les vitamines A et E sont extraites du sérum par l'hexane.

Par la suite, l'hexane est évaporé sous vide. Le résidu est repris dans le méthanol. Les dosages des vitamines A et E sont réalisés par HPLC équipé d'un détecteur à absorption UV qui permet de détecter le pic correspondant à la vitamine E à 292nm et celui de la vitamine A à 325nm.

II.4. Détermination du pouvoir antioxydant total (ORAC) par fluorimétrie

Notre but est de quantifier la capacité d'absorption des radicaux oxygènes (ORAC) du plasma c'est à dire de déterminer le pouvoir antioxydant total du sérum.

L'ORAC est déterminé par une méthode physico-chimique simple selon le protocole Cao et al. 1993. C'est une méthode particulièrement intéressante au niveau de sérums de sujets diabétiques où le stress oxydatif est important.

Le principe de cette méthode est l'utilisation d'une sonde fluorescente, l'APC (allophycocyanine) fluorescente, protéine présente dans les cyanobactéries et les algues rouges. Cette protéine perd sa fluorescence lorsqu'elle est agressée par des radicaux libres. L'ORAC est alors la capacité du plasma à neutraliser les RD, donc à freiner la perte de fluorescence de l'APC.

Cette sonde est très sensible aux radicaux hydroxyyles qui sont générés par H_2O_2 et Cu^{2+} dans le milieu d'incubation..

Le milieu réactionnel contient 37.5 nM d'APC, 9.10^{-6} M Cu^{2+} et 0,3% H_2O_2 dans un tampon phosphate 0.075M, Ph=7. Ce milieu correspond au blanc de la réaction.

20 μ l de plasma ou de Trolox ($C_{14}H_{18}O_4$: analogue de la vitamine E, 1 μ M) sont ajoutés au milieu réactionnel qui correspond dans ce cas à l'essai ou au standard, respectivement.

La fluorescence de l'APC à l'émission 651 nm et à l'excitation 598 nm, est mesurée toutes les 5 minutes à 37°C jusqu'à disparition totale de la fluorescence (pratiquement 1 heure après) par un spectrofluorimètre (SFM25 Kontran Instrument). On obtient des courbes cinétique de perte de fluorescence de chaque échantillon par rapport aux courbes blanc du milieu réactionnelle et Trolox du milieu de référence.

L'utilisation du Trolox sert à protéger cette sonde. Ainsi la courbe de dégradation de la sonde (émission de fluorescence) en fonction du temps sera moins rapide donc décalée par rapport à celle du blanc. Ainsi une unité ORAC correspond à ce décalage de la courbe soit à la protection ORAC.

La courbe de décroissance du sérum permet donc de déterminer le pouvoir antioxydant (donc protecteur) total du sérum, et sera mentionné en unité ORAC.

l'ORAC est déterminé chez 4 types de sérums :

- des sujets atteints de diabète type I
- des sujets atteints de diabète type II
- des sujets diabétiques et hypertendus
- des sujets témoins sans pathologies

4 cuves sont préparées pour lancer l'opération de lecture systématique de la fluorescence sur le spectrofluorimètre toutes les 5 minutes pendant 65 minutes, pour établir les courbes cinétiques

- cuve 1 ou blanc: la sonde est mise dans un tampon, puis ajout de H_2O_2 et (Cu^{2+}, SO_4^{2-}) comme générateur de RD → on observe une perte rapide de fluorescence.
- cuve 2 : même solution + le Trolox (analogue hydrosoluble de la vitamine E) → on observe une perte moins rapide de la fluorescence. Cette expérience permet d'établir la courbe Trolox unité ORAC (norme). on dit que la sonde sert à protéger la sonde.
- cuves 3 et 4 : mêmes solutions que cuve 1 + sérums (échantillons diabétique puis témoin respectivement) → on observe également une protection (action du pouvoir antioxydant sur les RD), c'est à dire une décroissance moins rapide de la courbe.

L'ORAC de chaque échantillon est calculé en mesurant la surface S de protection nette sous les courbes cinétiques de la perte de fluorescence de l'APC.

Ainsi :
$$ORAC_{\text{échantillon}} = (S_{\text{échantillon}} - S_{\text{blanc}}) / (S_{\text{trolox}} - S_{\text{blanc}})$$

Où S = Aire calculé entre la courbe de perte de fluorescence et l'axe des temps.

L'ORAC de chaque échantillon est ainsi calculé par rapport à l'ORAC du Trolox de référence. ($ORAC_{\text{trolox}} = 1$).

II.5. Mesure de la fluidité par RPE (résonance paramagnétique électronique)

II.5.1. Mesure de la fluidité des membranes microsomaux par RPE

5.1.1. Préparation des microsomes hépatiques

Après sacrifice des rats, le foie est prélevé, rincé à l'aide d'une solution de chlorure de sodium à 0,15M, séché sur papier filtre puis pesé. Une partie aliquote du foie (3.5g) est broyée et homogénéisée dans un tampon phosphate 0.05M (di-sodium hydrogenophosphate, 0.0034M et potassium dihydrogénophosphate, 0.016M), pH7.4. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 10000xg pendant 30min à l'aide d'une centrifugeuse J21 (Beckman, Palo Alto), réfrigérée à 4°C. Le culot de centrifugation est composé de débris et noyaux cellulaires ainsi que des mitochondries. Le surnageant contient les microsomes et le cytosol. Le surnageant est prélevé puis ultracentrifugé à 105000xg pendant 1h (ultracentrifugeuse L5-65 et rotor 60TI, Beckman), à 4°C. Cette ultracentrifugation permet l'obtention d'un culot microsomal.

Pour les mesures de fluidité, le culot microsomal est remis en suspension dans du tampon phosphate 0.05M, pH7.4 puis est lavé à 105000xg pendant 1h, puis ensuite repris dans un potter Elvehjem par 1ml de tampon phosphate 0.05M, pH7.4.

5.1.2. Application de la RPE à l'étude de la fluidité des membranes microsomales

Pour notre étude, nous avons utilisé les analogues d'acides gras, les acides doxyl stériques : l'acide 5 doxyl stérique (5-DS), l'acide 10 doxyl stérique (10-DS) l'acide 12 doxyl stérique (12-DS) et l'acide 16 doxyl stérique (16-DS). Ces acides gras paramagnétiques se comportent de manière identique à des acides gras diamagnétiques. Dans une membranes biologique, ces acides gras sont orienté perpendiculairement à la surface de la membrane de sorte que le groupement polaire soit en contact avec le milieu aqueux, et la chaîne hydrocarbonée en contact avec les chaînes d'acides gras phospholipides membranaires environnants (Hubbell et Mc Connell 1969). Ainsi , le 5-DS rapporte les mouvements moléculaires à la surface de la membrane, alors que le 10-DS et le 12-DS rapportent les mouvements moléculaires au cœur de la membrane. Etant donné la présence d'un groupement carboxylique ionisé, la position de la sonde paramagnétique dans la membrane est influencée par le pH du milieu (Barrat et Laggner 1974)

La fluidité des membranes microsomales est déterminée à partir des spectres de RPE, par le calcul d'un paramètre d'ordre S des sondes paramagnétiques d'acides 5-DS et 10-DS incorporés dans la membrane microsomale. Les acides gras paramagnétiques sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

La quantité de sonde ajoutée au système biologique est déterminée afin d'avoir un rapport massique sonde/protéines microsomales de 1/1000, de façon à éviter d'éventuelles perturbations du système biologique par la sonde paramagnétique. L'incorporation de la sonde dans la membrane microsomale se fait de la façon suivante: un volume adéquat (μl) d'une solution mère d'acide 5-DS à 10.34mg/ml dans l'éthanol absolu, diluée au $1/100^{\text{ème}}$ dans un tampon phosphate 0.005M, pH7.4 est ajouté à un volume complémentaire de la suspension de membrane microsomales, afin d'obtenir un volume final de 60 μl . Le milieu est agité au Vortex pendant 30 secondes avant d'être transféré dans un tube capillaire en quartz, qui est ensuite placé dans la cavité arrière d'une double cavité Bruker (Wissembourg, France) pour la mesure de fluidité. L'incorporation du 10-DS se fait de la même façon à partir d'une solution mère à 6.23mg/ml dans l'éthanol absolu, diluée au $1/100^{\text{ème}}$ dans du tampon phosphate 0.005M, pH7.4.

Deux mesures indépendantes sont effectuées par échantillon, à trois températures différentes: 25, 37 et 45°C. Une attente de 5 min est effectuée entre chaque changement de température.

Les conditions d'enregistrement des spectres de RPE : Les spectres sont obtenus à l'aide d'un spectromètre de RPE ESP 300^E Bruker (Wissembourg, France), équipé d'une unité de température variable. Un spectre de RPE est le résultat de l'accumulation de 10 balayages du

champ magnétique de 100G. L'amplitude de la modulation du signal est de 1G, pour un temps de conversion et une constante de temps de 81.92ms. La fréquence des micro-ondes est de 9.62Ghz et leur puissance de 10mW. L'enregistrement du spectre est réalisé avec un gain de 1.10^5 .

II.5.2. Mesure des la fluidité des lipoprotéines par RPE

Les LDL, lipoprotéines de basse densité sont choisies car elles représentent la fraction lipoprotéine la plus importante chez l'homme. Les LDL sont isolées à partir du sérum par ultracentrifugation.

Les acides gras paramagnétiques 5-DS, 10D-S et 12 D-S sont conservés à 4°C sous forme d'une solution mère concentrée dans l'éthanol absolu. La quantité final d'acides gras paramagnétiques dans le milieu d'incubation des lipoprotéines est déterminée de façon à maintenir le rapport acides gras paramagnétiques/cholesterol total de 1/500 afin d'éviter des modifications de la structure des lipoprotéines. Ainsi, 0.01mmole/l de 5-DS, 10-DS ou 12D-S sont ajoutés aux fractions de lipoprotéines LDL par dissolution d'une solution de l'acide gras paramagnétique dans le milieu. Le mélange est agité vigoureusement, puis est transféré dans une cellule plate en quartz (Bruker, Wissembourg). L'utilisation de cette cellule permet de faire la mesure sur un volume de 1 ml, ou plus, d'échantillon. La cellule plate est placée dans une cavité de résonance simple TM 110 (Bruker) d'un spectromètre Bruker ESP 300^E.

Dans nos conditions expérimentales: Les conditions d'enregistrement des spectres de RPE: Les spectres sont enregistrés à 37°C dans les conditions suivantes: amplitude de la modulation 1G, puissance et fréquence des radiations micro-ondes de 10mW et 0.62GHz respectivement. Un spectre de RPE correspond à l'accumulation de 10 balayages du champ magnétique H est effectué sur 100 Gauss (G) en 81.63ms, entre 3360G et 3460G.

Mesure du paramètre d'ordre S

$$S = (T_{//} - T_{\perp}) / (T_{zz} - T_{xx}) \times (a_n / a'_n)$$

$$\text{Avec } a_n = 1/3(T_{xx} + T_{yy} + T_{zz}) = 14.1G ; a'_n = 1/3(T_{//} + T_{\perp})$$

$T_{//}$ et T_{\perp} représentent la moitié de la distance du premier extremum jusqu'au dernier minimum, et la moitié de la distance du premier minimum au dernier extremum, respectivement.

T_{xx} , T_{yy} et T_{zz} sont des composantes du tenseur hyperfin T déterminé à partir des acides gras paramagnétiques orientés dans un cristal (Schindler et Seelig 1973).

$T_{zz}-T_{xx}$ est égale à 250.G. Le paramètre d'ordre S permet donc d'exprimer la fluidité du domaine environnant la sonde paramagnétique. S varie de 1 à 0, S=1 correspondant à un environnement extrêmement rigide, S=0 correspondant à un environnement extrêmement fluide

III. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes entre les diabétiques et les témoins est réalisée par le test "t" de Student.

Tous les calculs sont réalisés à l'aide d'un programme statistique informatisé STATISTICA

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Composition en acides gras des phospholipides membranaires déterminée par CPG:

Les acides gras sont les composants importants des lipides et des membranes dont découlent la plupart de leurs propriétés métaboliques. Une altération du métabolisme des acides gras, reflétée par la composition en AG des lipides sériques et des membranes cellulaires, entraîne des modifications pathologiques touchant plusieurs aspects de la fonction cellulaire. Ainsi, la détermination de la composition en AG de l'organisme a un intérêt particulier dans la connaissance pathologique visant un but thérapeutique ou prophylactique. La chromatographie en phase gazeuse permet la séparation et l'identification des AG par leurs temps de rétention par rapport à des étalons purs et offre donc un moyen sûr et sensible pour la détermination de la composition en AG des membranes de l'organisme.

I.1. Composition en AG des phospholipides (PL) des membranes de globules rouges

L'importance des PL membranaires dans les processus physiologiques et pathologiques a considérablement accru l'intérêt de leur étude. Leur composition en AG influence la fluidité membranaire (Watt, 1989).

Les membranes des globules rouges, cellules sanguines très abondantes, peuvent être facilement isolées et reflètent en général la composition en AG de toutes les membranes de l'organisme.

Les conditions expérimentales de la CPG utilisées dans notre travail permettent une bonne séparation des AG membranaires qui se traduit par une séparation distincte des pics correspondants à chacun des AG. Par la suite, l'identification des AG est réalisée par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de standards d'AG (figure 1). Cette méthode permet aussi une analyse quantitative basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration en AG. Dans notre étude, l'analyse par CPG des membranes de sujets témoins, ainsi que des membranes de patients diabétiques donne un profil chromatographique représenté dans la figure 2. L'exploitation des résultats obtenus par CPG montre des modifications de la composition en AG des membranes de globules rouges chez les diabétiques comparés aux témoins (figure 3).

Ainsi grâce à la CPG, des modifications de la composition des membranes sont mises en évidence et sont exploitées par les biologistes et les médecins pour une meilleure compréhension des pathologies humaines comme le diabète.

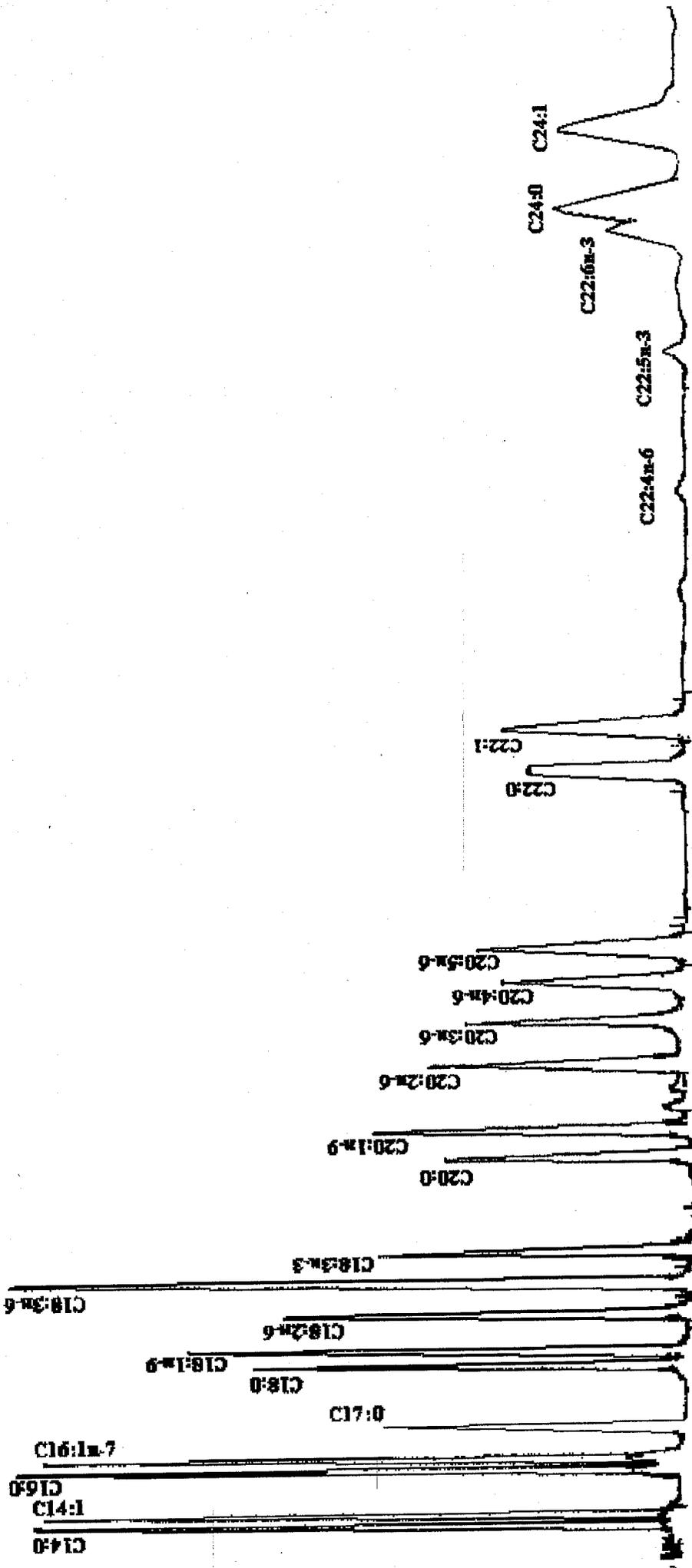


Figure 1: Chromatogramme CPG, Standard d'acides gras

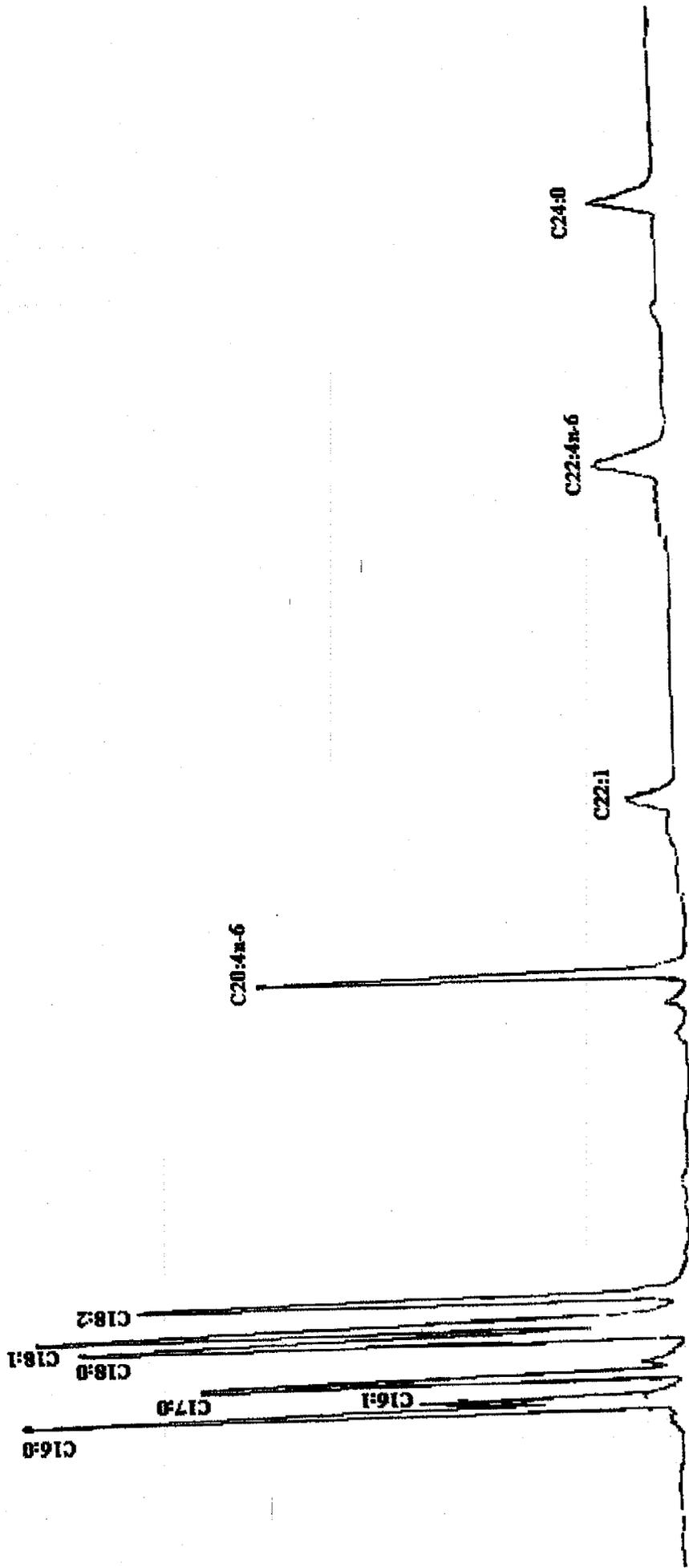


Figure 2: Chromatogramme CPG, Composition en AG

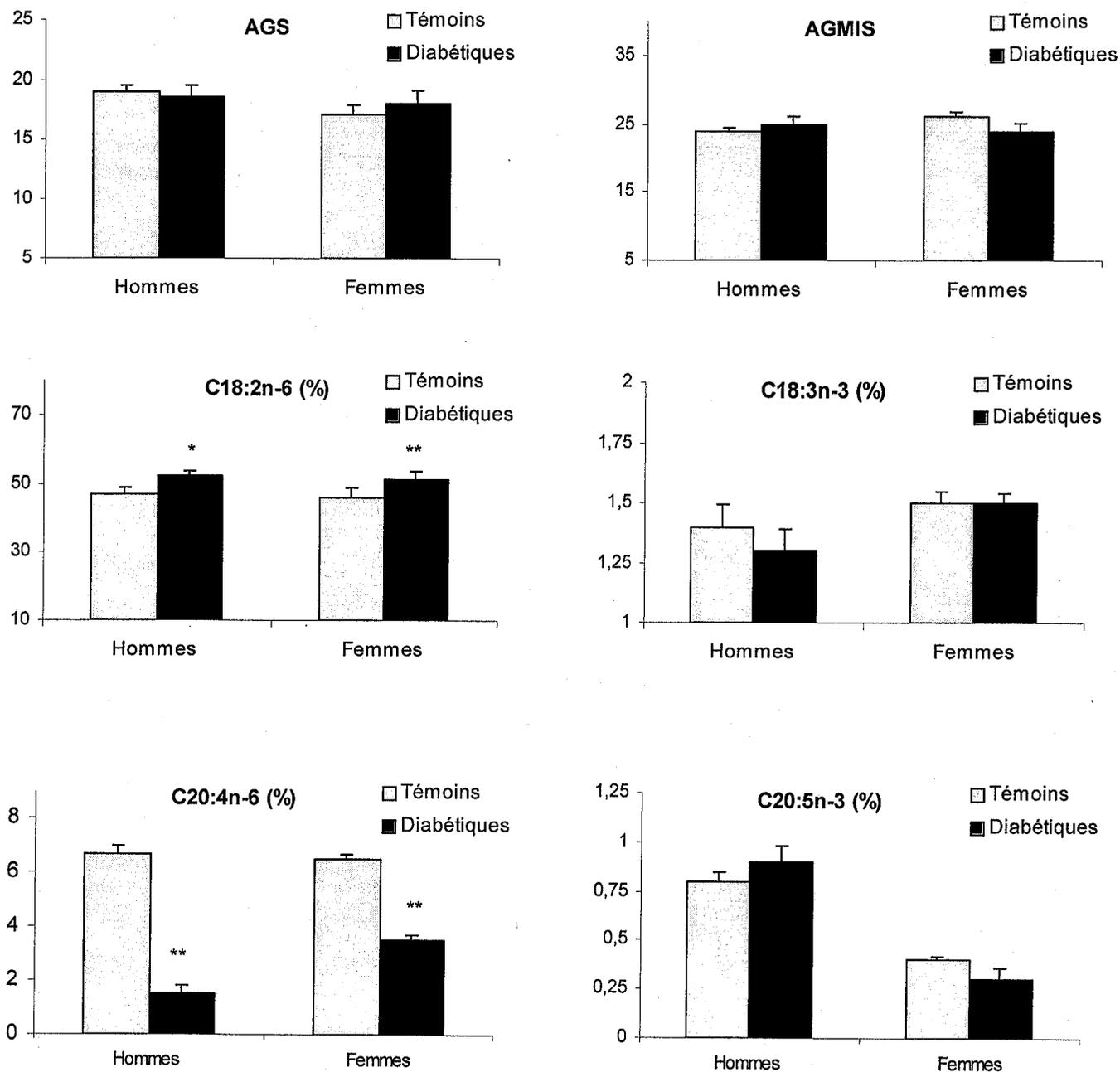


Figure 3 : Principaux AG des PL des membranes des globules rouges chez les Témoins et les Diabétiques (populations : hommes et femmes)

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard (ES)

AGS : acides gras saturés;

AGMIS : acides gras monoinsaturés

La comparaison des moyennes entre témoins et les diabétiques est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance, $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$

I.2. Composition en AG des membranes des lymphocytes

Les lymphocytes, une autre population de cellules sanguines jouent un rôle important dans l'immunité et sont particulièrement impliqués dans le diabète. La détermination de la composition en AG des membranes de ces cellules est nécessaire pour bien comprendre leur fonction.

Nous avons utilisé les mêmes conditions expérimentales de CPG que pour les membranes de globules rouges. L'exploitation des résultats, obtenus grâce aux chromatogrammes des membranes de lymphocytes, montre aussi des modifications de la composition en AG des membranes des lymphocytes des diabétiques comparés aux témoins (figure 4).

II. Teneurs sériques en vitamines A et E analysées par HPLC

Un nombre d'études épidémiologiques indiquent qu'une alimentation riche en vitamines est associée avec réduction du risque de développer des accidents cardio-vasculaires ou différents types de cancer (Hankin et al., 1984; Willet et al., 1984; Christen et al., 2000). Sur la base de ces données, une attention de plus en plus grande est accordée aux vitamines antioxydantes capables de prévenir l'apparition de ces maladies, particulièrement les vitamines A et E. Il est donc nécessaire de développer une méthode rapide et sûre pour analyser ces vitamines dans les fluides biologiques. La HPLC est actuellement la méthode de choix, la plus précise pour quantifier les vitamines sériques.

En effet, dans notre travail, les conditions expérimentales de la HPLC permettent une bonne séparation et la quantification simultanée des vitamines A et E du sérum. Le détecteur utilisé est un dispositif spectrophotométrique UV programmable mesurant la densité optique à 292nm pour la détection de la vitamine E et 325nm pour la détection de la vitamine A. L'utilisation du tocol comme étalon interne permet une analyse quantitative précise. Les tracés chromatographiques obtenus par HPLC sont du type représenté dans la figure 1. Nos résultats montrent que les teneurs sériques en vitamines A et E chez les diabétiques sont significativement diminuées comparées aux valeurs des témoins (figure 2).

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication internationale ci-jointe.

Ainsi la méthode HPLC apparaît comme un moyen adéquat pour l'estimation des variations des teneurs en vitamines en cas de pathologies. Elle est utilisée par plusieurs auteurs pour la détermination quantitative des vitamines (Stacewicz-Spapunzakis et al., 1987; Paulo et al., 1999; Bieri et al., 1985)

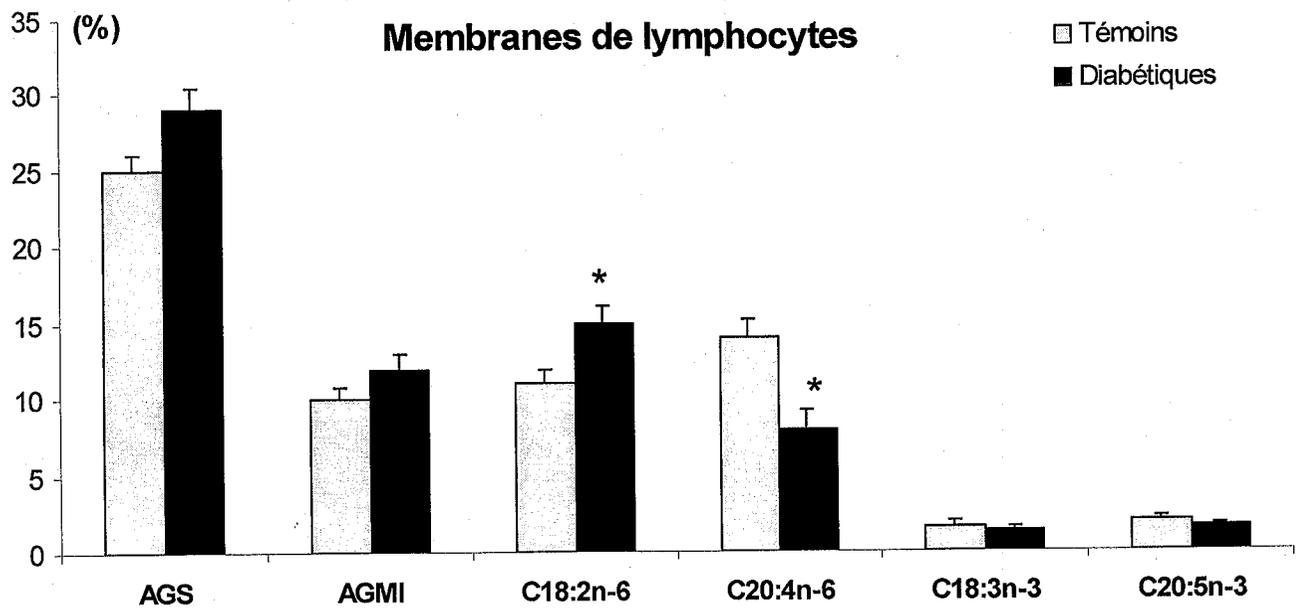


Figure 4: Composition en AG des membranes de lymphocytes chez les Témoins et les Diabétiques

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard (ES)

AGS : acides gras saturés;

AGMIS : acides gras monoinsaturés

La comparaison des moyennes entre témoins et les diabétiques est réalisée par le test "t" de student, après analyse de variance, $p^* < 0.05$

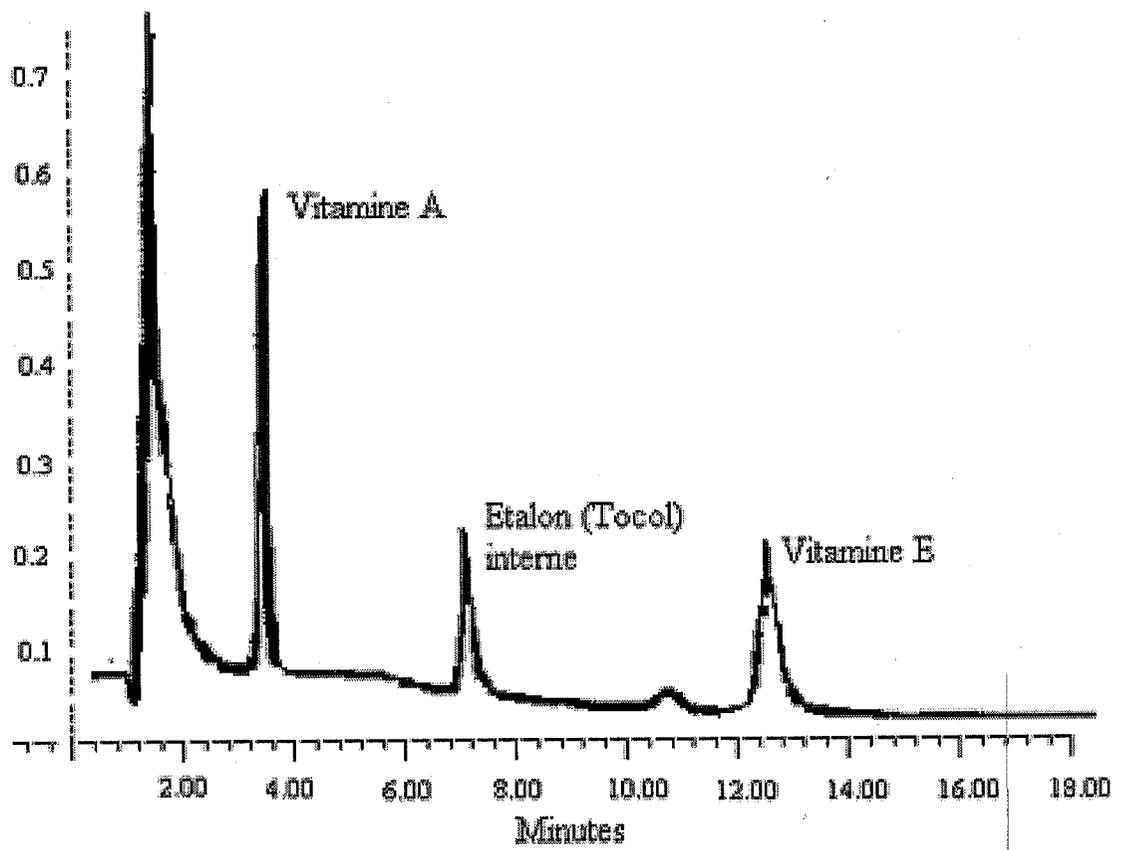


Figure 1 : Chromatogramme HPLC

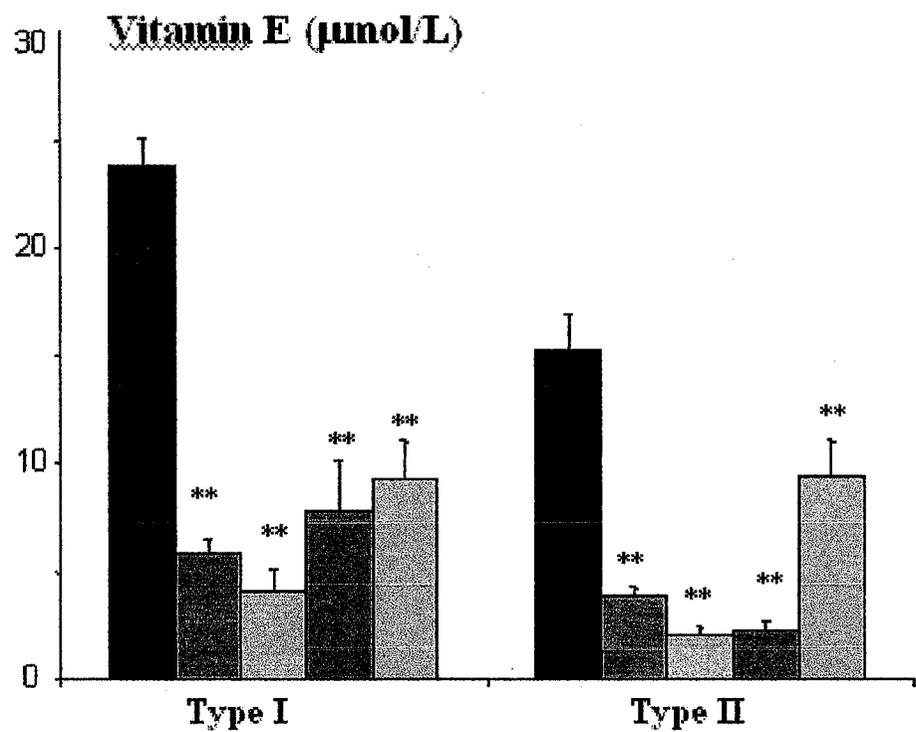
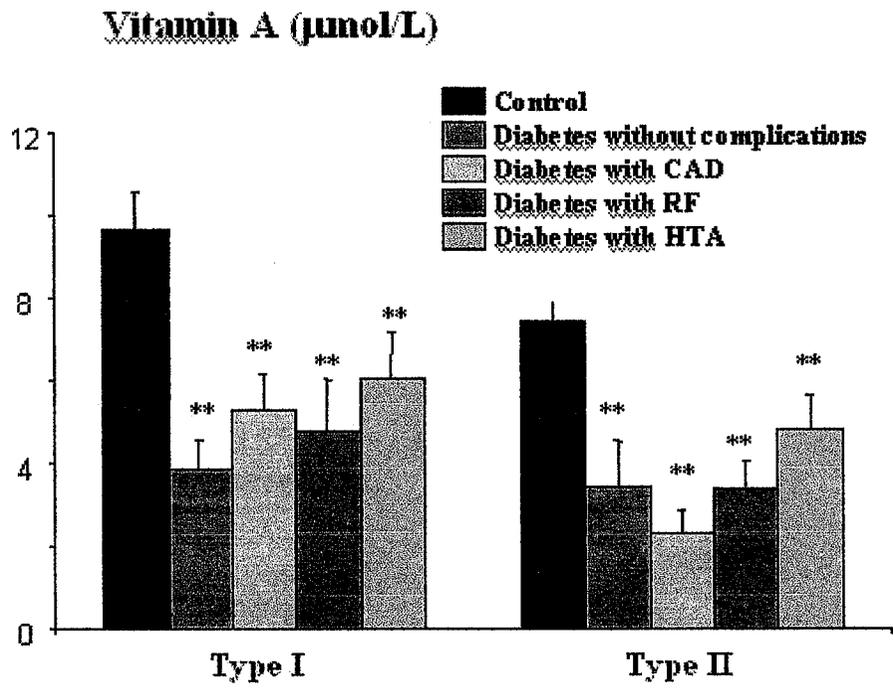


Figure 2: Comparaison entre sujets diabétique et sujets saints des concentrations en vitamines dans les sérums .

III. Pouvoir antioxydant total (ORAC) déterminé par fluorimétrie

Le métabolisme cellulaire normal produit en permanence des espèces oxygénées réactive. Ces mécanismes d'oxydation sont essentiels pour le fonctionnement cellulaire, mais un dérèglement peut provoquer un stress oxydatif c'est à dire l'apparition de radicaux libres (RD) très agressifs pour l'organisme (Fontaine E., 2002). En effet le stress oxydatif largement accepté comme étant critique de plusieurs pathologies comme maladies cardio-vasculaires , cancers et diabète. Normalement l'organisme possède des moyens de défense contre les RD. Ce système antioxydant est constitué par les vitamines A, E et C, les enzymes érythrocytaires antioxydantes et d'autres molécules organiques comme le transferrine, ferritine, céruloplassmine, l'albumine. Lorsque ce système antioxydant est dépassé, le stress oxydatif apparaît (Demple B et al., 1991; Will JC et al. 1996). Il y a donc un grand besoin de développer une technique sûre pour la mesure globale du statut antioxydant de l'organisme.

Mise au point méthodologique

La méthode choisie est basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente l'allophycocyanine (APC) sensible au stress oxydatif généré par H_2O_2 et Cu^{2+} (générateur de RD).

L'utilisation du Trolox, analogue hydrosoluble de la vitamine E sert à protéger la sonde qui est mise en présence de H_2O_2 et Cu^{2+} . Ceci se traduit par une perte rapide de la fluorescence (blanc). Si la sonde est mise avec H_2O_2 et Cu^{2+} , et en plus le Trolox, il y a une certaine protection (figures 5).

Ainsi, la perte de fluorescence est moins rapide au cours du temps. Il y a donc un décalage de la courbe en fonction du temps (30 à 60 min). La présence du sérum d'un sujet témoins dans le milieu d'incubation induit aussi la protection de la sonde, car dans le sérum, il y a plusieurs antioxydants comme les vitamines A, E et C, albumine, bilirubine, enzymes...etc.

La courbe obtenue en présence du sérum témoin se rapproche de celle du Trolox. En présence d'un sérum d'un sujet diabétique, la protection de la sonde est moins importante que celle du témoin. Nous remarquons qu'en présence d'un sérum témoin, la perte de 50% de la fluorescence de l'APC se fait après environ 40 min, alors qu'en présence d'un sérum diabétique, la perte de 50% de fluorescence est notée après 15 à 20 min. Ceci traduit un pouvoir antioxydant total chez les diabétiques plus faible que chez les témoins.

La figure 6 montre les valeurs ORAC chez les diabétiques et chez les témoins.

La méthode fluorimétrique utilisée dans notre travail permet d'explorer le statut antioxydant global de l'organisme et donc d'apprécier l'existence d'un stress oxydatif en cas de pathologies.

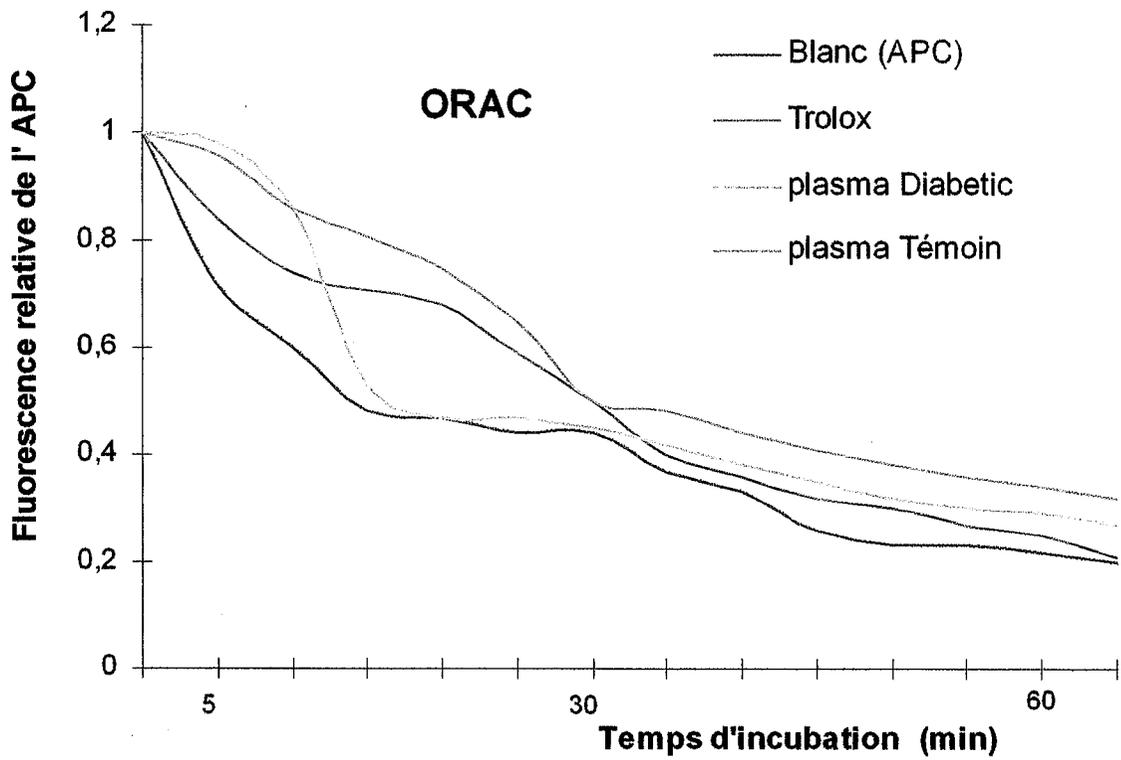


Figure 5

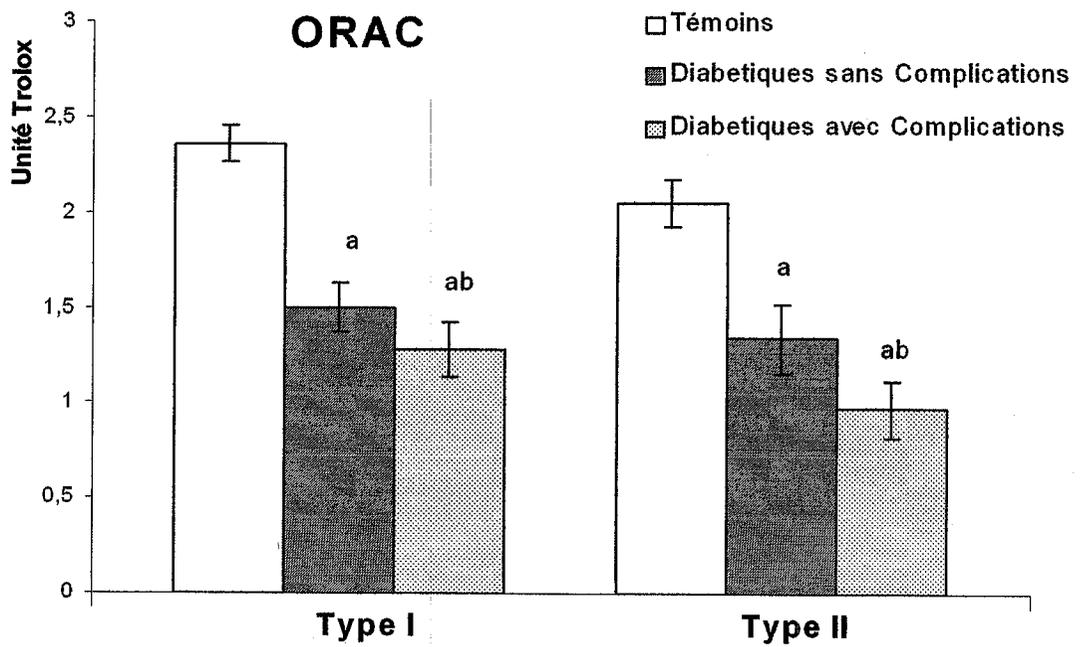


Figure 6

IV. Fluidité des membranes et des lipoprotéines déterminée par la RPE

1. Fluidité des membranes

Les mouvements des acides gras paramagnétiques incorporés à un édifice lipidique (membrane) sont lents car restreints par leur environnement lipidique. Cette condition permet le calcul d'un paramètre d'ordre S:

Le paramètre d'ordre S est calculé à partir des spectres RPE selon la formule citée dans le paragraphe précédent (matériel et méthode)

Un exemple de spectre RPE est donné dans la figure 1. De plus les spectres obtenus pour les 5-DS, 10-DS et 12-DS incorporés dans des membranes microsomales hépatiques d'un rat témoin sont présentés figure 2. Ces spectres sont représentatifs de mouvements lents. Les mouvements sont de moins en moins lents lorsque le radical nitroxyde est déplacé du carbone 5 vers le carbone 12. Le paramètre d'ordre S diminue de 0.601 à 0.396 respectivement pour le 5-DS et 10-DS, à 37°C, indiquant que la fluidité augmente au cœur de la membrane. Cette progression de valeur du paramètre d'ordre correspond à un gradient de fluidité membranaire (Hubbell et McConnell 1969; Gaffney 1975).

Dans une membrane biologique, la chaîne des AG a un mouvement définissant un cône de rotation. L'amplitude du mouvement est plus importante à l'extrémité CH₃ terminal de la chaîne et plus faible à proximité du groupement polaire de la chaîne. De ce fait, le paramètre d'ordre S diminue lorsque l'amplitude des mouvements augmente.

Dans la pratique, plus S diminue et plus la fluidité membranaire augmente.

L'utilisation des 2 AG paramagnétiques 5-DS et 10-DS permet de déterminer la fluidité en surface de la membrane (avec le 5-DS) et au cœur de la membrane (avec le 10-DS).

La RPE dans notre travail nous a permis de déterminer et de comparer la fluidité des membranes des rats témoins et des rats diabétiques.

Ainsi, le paramètre S du 5-DS incorporé aux membranes microsomales des rats diabétiques est significativement plus élevé que celui mesuré pour les membranes microsomales des rats témoins (figure 3). De plus, S du 10-DS mesuré pour les membranes des rats diabétiques est aussi significativement augmenté comparé à celui déterminé pour les membranes des rats témoins figure 3

Ces résultats montrent une diminution de la fluidité mesurée en surface et au cœur des membranes chez les rats diabétiques comparés aux témoins.

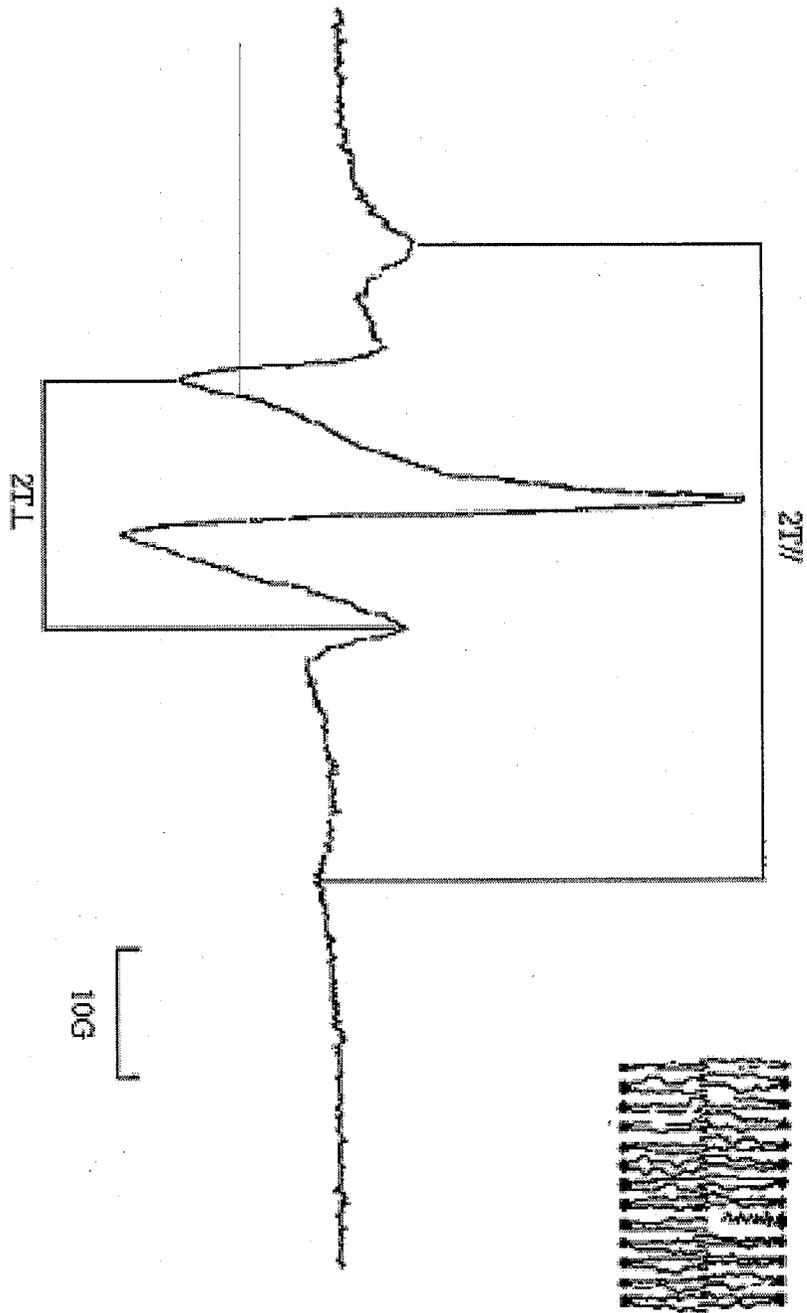


Figure 1: Spectre RPE et détermination des paramètres $2T_{//}$ et $2T_{\perp}$
 Spectre de l'acide 5 doxyl stéarique incorporé dans la membrane microsomale d'un rat normale

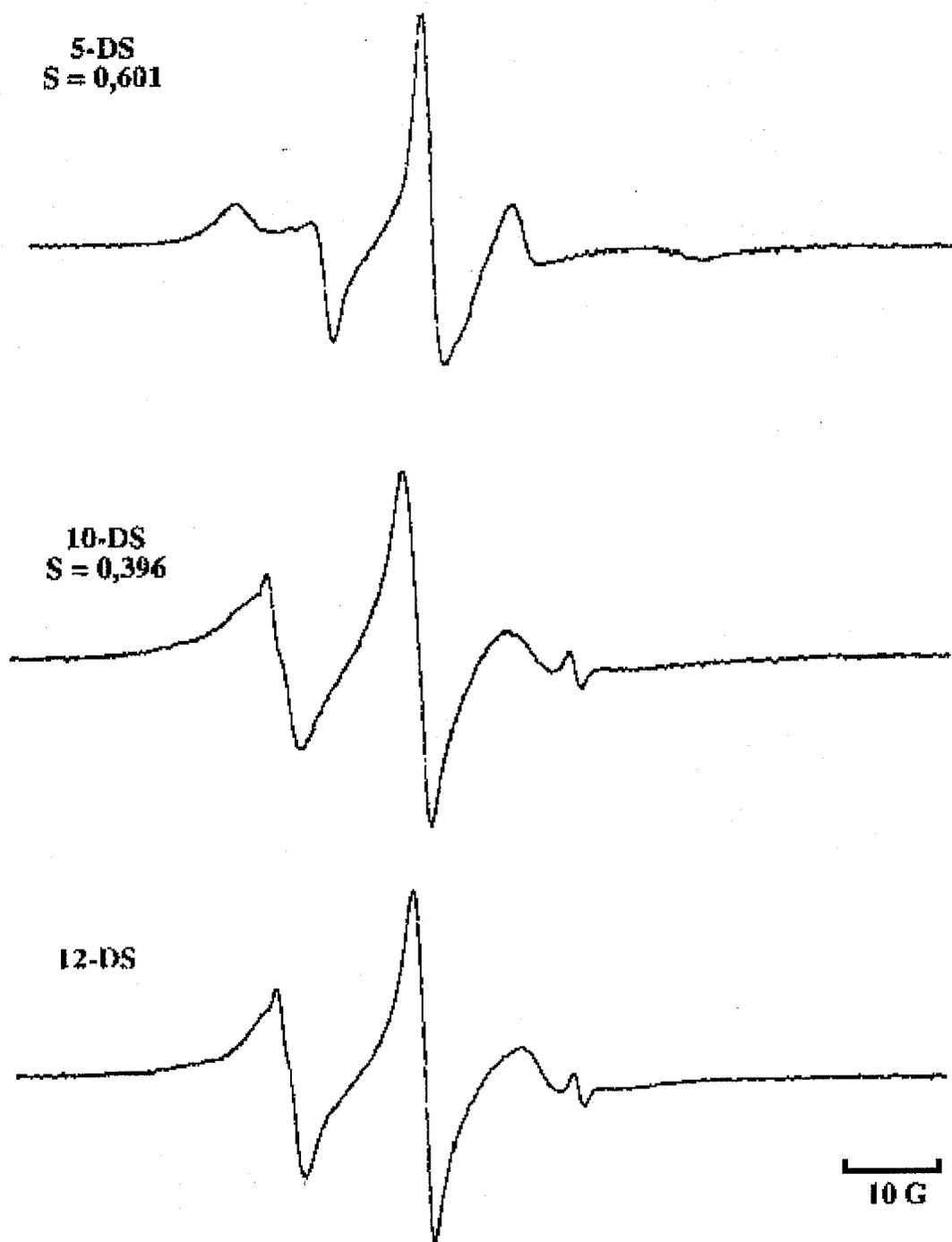


Figure 2: Spectres des acides 5 doxyl stéarique 5-DS, 10 doxyl stéarique 10-DS et 12 doxyl stéarique 12-DS incorporés dans une membrane microsomale hépatique d'un rat témoin. S : paramètre d'ordre. Enregistrement effectué à 37°C

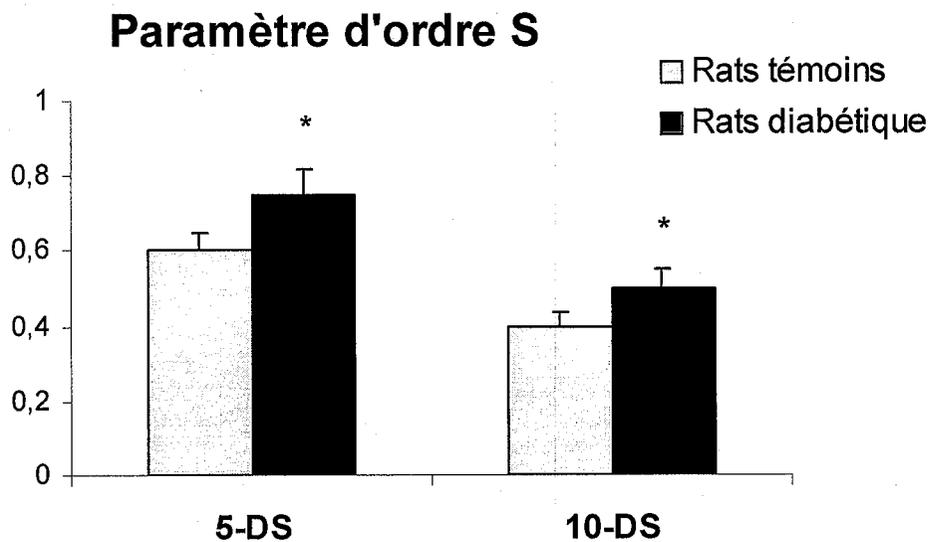


Figure 3 : Paramètre d'ordre S de l'acide 5 doxyl stéarique (5-DS) et de l'acide 10 doxyl stéarique (10-DS) incorporés dans les membranes microsomaux hépatiques des rats témoins et diabétiques.

Le paramètre d'ordre S est déterminé à 37°C

Les valeurs représentent les moyennes \pm ES pour 4 rats dans chaque lot.

* $P < 0,01$ selon le test de Student

La composition en AG est fortement impliquée dans la fluidité des membranes (Stubbs et Smith 1984). Les modifications des teneurs en AG monoinsaturés et polyinsaturés contribueraient dont, en partie, à l'altération de la fluidité des membranes microsomaux observées, dans notre étude, chez le rat diabétique.

Les teneurs en cholestérol total des membranes, connu comme étant un modulateur puissant de la fluidité membranaire (Brenner, 1990) peuvent aussi participer à l'altération de la fluidité membranaire.

2. Fluidité des lipoprotéines LDL

Les spectres de RPE obtenus pour les différents AG paramagnétiques incorporés dans des LDL sont présentés figure 4. Afin d'éclaircir les représentations, la localisation des sondes paramagnétiques est figurée sur une coupe schématique de LDL. D'après cette coupe schématique, le 5-DS est présumé refléter la mobilité des molécules situées dans le domaine polaire de la lipoprotéine, c'est à dire à l'interface lipides/eau; alors que le 10-DS et le 12-DS sont présumés refléter les mouvements moléculaires du domaine apolaire de la monocouche, c'est à dire à proximité des chaînes hydrocarbonées des phospholipides. Dans ces conditions, S permet d'évaluer la fluidité de la surface c'est à dire de la monocouche composée de phospholipides et d'apolipoprotéines.

En effet, les lipoprotéines sont composés d'un noyau central constitué de lipides hydrophobes comme le cholestérol estérifié et les triglycérides, et de constituants de surface plus hydrophiles comme le cholestérol libre, les phospholipides et les apoprotéines (Puchois et al., 1985) Figure 5

En présence de LDL, les spectres des différentes sondes sont représentatifs de mouvements moléculaires lents, ou restreints par l'environnement, indiquant que la sonde est incorporée à la lipoprotéine figure 4. Bien que l'allure des spectres ne varie pas de façon importante, des différences sont toutefois observables. Deux populations de sondes sont présentes: une population caractérisée par des mouvements rapides (défini par M sur le spectre) correspondant à une proportion de sondes non incorporées dans la particule, et une population caractérisée par des mouvements lents (défini par I sur le spectre) et correspondant à une proportion de sondes incorporés à la particule. Le paramètre d'ordre S est donc calculé sur la population I. S varie sensiblement selon la position du radical nitroxyde. S diminue, ou la fluidité augmente, lorsque le radical nitroxyde est déplacé du carbone 5 vers le carbone 10 puis le carbone 12 de la chaîne.

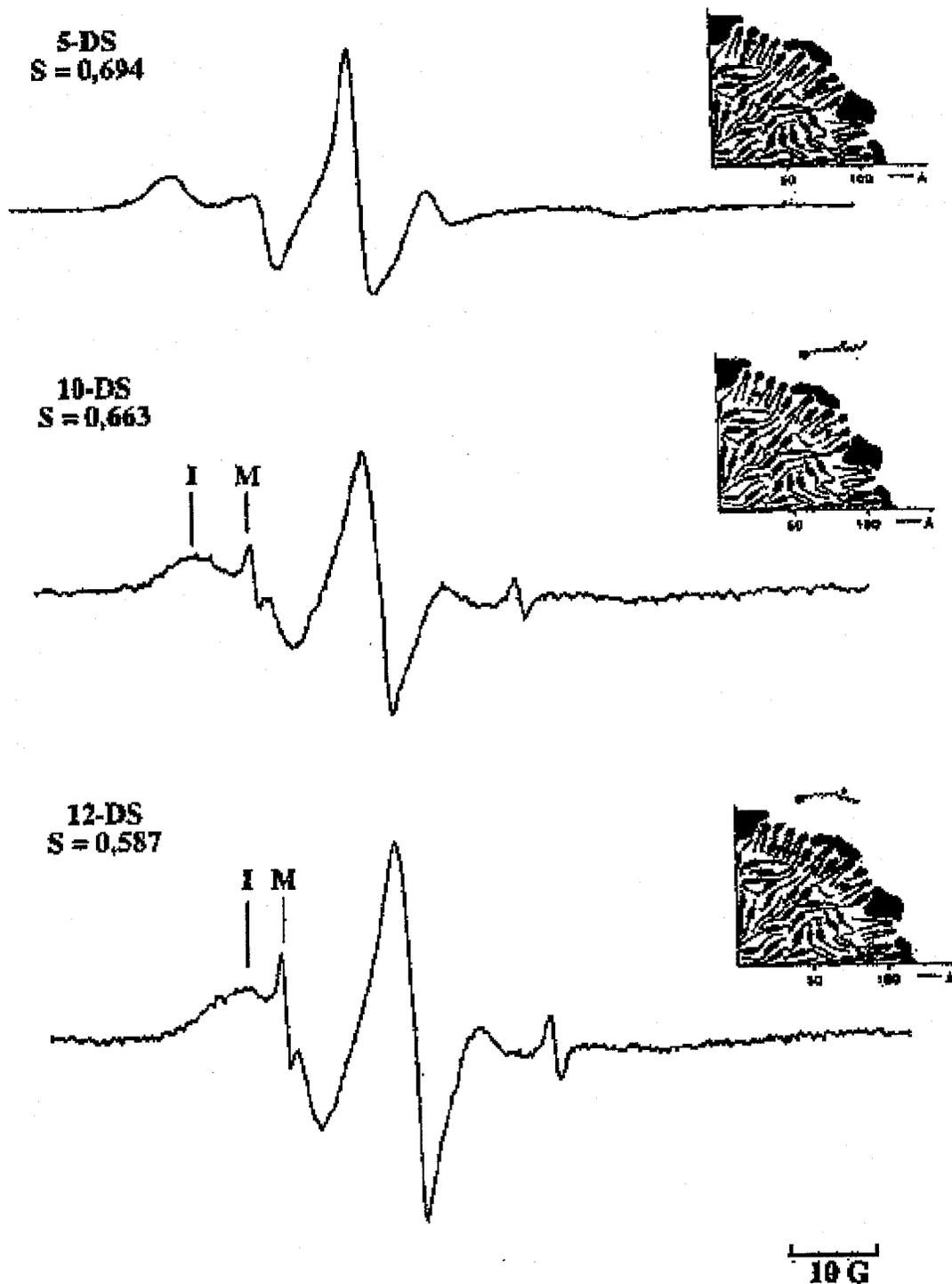


Figure 4: Spectre des acides doxyl stéarique 5-DS , 10 doxyl stéarique 10-DS et doxyl stéarique 12-DS dans une LDL
 Coupe schématique d'une LDL d'après Laggner et Kostner 1978
 S: paramètre d'ordre, I: Immobilisé, M: Mobile

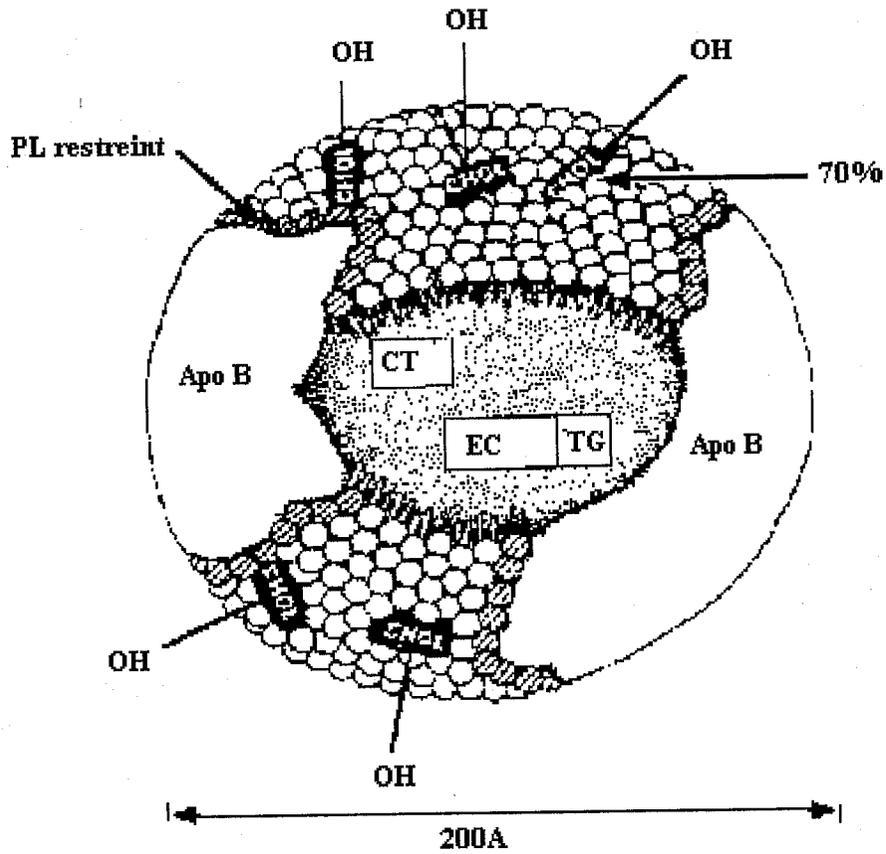


Figure 5 : Structure d'une lipoprotéine de basse densité
d'après Lund-Katz et Phillips (1986)

CT: cholestérol; EC: esters de cholestérol; TG: triglycérides; Apo: apoprotéines

CONCLUSION

La détermination et l'analyse des paramètres physiques (et chimiques) associés aux constituants de l'organisme, comme les lipides et les protéines, représentent un des meilleurs moyens possible et disponibles pour mettre en évidence les changements dans le fonctionnement cellulaire associé à différentes pathologies.

Leurs quantifications et la mesure précise de leurs concentrations apportent de précieux renseignements qui peuvent être exploités par les biologistes et les médecins dans des buts thérapeutiques.

Les méthodes physico-chimiques utilisées dans notre travail (Ultracentrifugation, CPG, HPLC, RPE, Fluorimétrie) donnent des résultats tout à fait exploitables, et nous permet de confirmer que ce sont des moyens parfaitement applicables aux échantillons biologiques. Il est donc logique de voir que les analyses quantitatives et qualitatives des composants biologiques par les méthodes physicochimiques sont sujettes à un important développement depuis ces dernières années. Ainsi, de nouvelles méthodes basées sur des techniques récentes apportés par les connaissances et découvertes de la physiques, comme le laser, l'imagerie 3D..., sont mises au point pour permettre l'exploration complète du fonctionnement de l'organisme humain.

Nous avons pu réaliser ce travail, grâce à une recherche bibliographique précise autour des méthodes utilisés, et grâce aux moyens matériels dont nous avons pu disposer avec la collaboration du laboratoire de Dijon.

GLOSSAIRE

ACIDES AMINES

Les acides aminés constituent l'unité structurale des protéines. Dans tous les organismes, les protéines sont composées d'une vingtaine d'acides aminés seulement, toujours les mêmes.

Chaque protéine est caractérisée par le nombre d'acides aminés qui la constituent et par la séquence très précise, rigoureusement définie, des acides aminés réunis l'un à l'autre.

ACIDES GRAS

Les acides gras sont les constituants des lipides. Ils constituent un élément majeur de notre alimentation, représentent souvent plus de 30% de l'apport énergétique total de notre ration. Ils sont utilisés par l'organisme entre autre comme source principale d'énergie pour la plupart de nos cellules (37.7kJ par gramme, comparé au glucose : 16.7), et comme stockage de l'énergie (420Mj = consommation énergétique pendant plus de 40jours). C'est une grande famille de molécules présentant des propriétés physico-chimiques communes, sont formés d'une longue chaîne hydrocarbonée qui porte un groupe carboxylique à une extrémité et un groupe méthyle à l'autre: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{...-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$.

Les différents acides gras se caractérisent: - par la longueur de la chaîne carbonée, c'est à dire du nombre d'atomes de carbones (de 4 à 24); - et par l'existence éventuelle d'une ou de plusieurs doubles liaisons (entre carbones voisins) qui conduit à distinguer les acides gras saturés (aucune double liaison) des monoinsaturés (une double liaison) et des polyinsaturés (2 ou plusieurs doubles liaisons).

Cette molécule a une très faible affinité pour l'eau (caractère hydrophobe), qui lui permet de traverser la membrane plasmique (structure essentiellement phospholipidique) donc lipophiles. Les AG participent à l'élaboration de structures moléculaires comme les membranes biologiques ou bien les lipoprotéines.

ASCORBIQUE

L'acide ascorbique est la vitamine C.

CAROTENE

Le bêta-carotène est une provitamine A.

CATABOLISME

Ensemble des réactions par lesquelles l'organisme dégrade les nutriments ingérés pour en tirer les matériaux nécessaires aux synthèses, et de l'énergie.

CELLULE

Tous les êtres vivants sont constitués de cellules (exemple bactéries), c'est à dire d'unités structurales fondamentales limitées par une membrane, contenant une information génétique et capable de vivre de façon autonome quand elle est dans un environnement favorable. Les cellules obéissent aux lois de la physique et de la chimie. En vertu du deuxième principe de la thermodynamique, dans tout système isolé la quantité de désordre ne fait qu'augmenter. Or les êtres vivants sont parfaitement ordonnés. L'observation montre qu'un ordre doit être maintenu pour permettre aux cellules de croître et subsister : ceci n'est thermodynamiquement possible que par un apport continu d'énergie que les êtres vivants sont capables de puiser dans leur environnement.

CHLOROPHYLLE

Pigment qui colore en vert la plupart des feuilles des végétaux et absorbe la lumière utilisée par la photosynthèse, mécanisme de transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. La chlorophylle absorbe les rayonnements violets et orange-rouge du spectre solaire et réfléchit la lumière verte et jaune (d'où sa couleur). La chlorophylle est masquée chez certaines feuilles par d'autres pigments.

Au centre de la molécule de chlorophylle se trouve un atome unique de magnésium entouré d'une ceinture de porphyrines (contenant essentiellement du carbone et de l'hydrogène, mais aussi de l'azote). Cette structure évoque celle des composants actifs de l'hémoglobine dans le sang. Une longue chaîne d'atomes de carbone et d'hydrogène part du noyau central et fixe la molécule de chlorophylle sur la membrane interne du chloroplaste à l'intérieur duquel s'accomplit la photosynthèse. La molécule de chlorophylle absorbant un photon libère une certaine quantité d'énergie et déclenche une série complexe de réactions chimiques dans les chloroplastes, aboutissant au stockage de l'énergie sous forme de liens chimiques.

Il existe plusieurs sortes de chlorophylles qui diffèrent par leur structure moléculaire et leur mode d'absorption des ondes lumineuses. La chlorophylle a représente 75 p. 100 de la chlorophylle des plantes vertes. On la trouve également chez les algues bleu-vert. La

chlorophylle b reste un pigment accessoire présent chez les plantes vertes et d'autres organismes photosynthétiques. Elle absorbe une radiation de longueur d'onde différente et transfère l'énergie reçue vers la chlorophylle a. D'autres variétés de chlorophylle se retrouvent chez certaines algues (chlorophylle c et d) et bactéries (bactériochlorophylle).

CHOLESTEROL

Le cholestérol présent dans l'organisme est en partie apporté par l'alimentation et en partie synthétisé par l'organisme lui-même. Le cholestérol a des fonctions biologiques très importantes : il participe à la constitution des membranes cellulaires....Son métabolisme cellulaire et sanguin est étroitement associé à celui des lipides.

Un taux anormalement élevé de cholestérol dans le sang, est corrélé à un accroissement du risque d'infarctus par athérosclérose des vaisseaux du cœur.

DIABETE

Le diabète sucré est une maladie métabolique largement répandue (près de 4% de la population mondiale actuelle est touchée, Perlemuter et al. 1995), caractérisé par une hyperglycémie (teneur en glucose dans le sang supérieure à 1.2g/l).

Le diabète représente aujourd'hui l'une des 5 premières causes de mortalité dans de nombreux pays : 4 millions de morts par an, soit 9% de la mortalité totale (Santé+ mensuel d'information médicale n°4 oct. 2003). Plus de 75% des risques attribuables au diabète résultent de l'obésité, et certains scientifiques parlent désormais de diabésité.

On distingue le diabète insulino dépendant de type 1 marqué par une carence en insuline (qui est normalement sécrétée par des cellules spéciales du pancréas) et atteint surtout les individus jeunes, et le diabète non insulino dépendant de type 2 marqué par une résistance des cellules à l'action de l'insuline et survient surtout chez les individus obèses.

Maladie du métabolisme et de la surnutrition, le diabète dominant dans les pays riches, se développe aussi dans les sociétés dites sous développées. En Algérie on compte environ 60.000 diabétiques dont 5000 à 10.000 enfants de moins de 15 ans qui doivent subir chaque jour une ou plusieurs piqûres d'insuline, et par contre on évalue à 500.000 le nombre de personnes atteintes de diabète de type II nécessitant des mesures diabétiques et médicamenteuses et qui apparaît au cours de la maturité (Révolution Africaine n°1243 25 dec.1987).

ENERGIE (besoin)

A plus ou moins long terme, l'énergie utilisée par les cellules provient du soleil. Le soleil émet un rayonnement électromagnétique qui contient une certaine quantité d'énergie utilisable. Les plantes sont capables de transformer l'énergie lumineuse du soleil en énergie

chimique. C'est le mécanisme de la photosynthèse au cours de laquelle sont synthétisées les macromolécules organiques, en générale les glucides avec dégagement d'oxygène. Les animaux tirent leur énergie du prélèvement de ces molécules combustible. Un organisme vivant a besoin de recevoir de l'énergie ainsi que de matériaux nécessaires au renouvellement permanent de ses constituants grâce à l'alimentation.

Pour vivre notre organisme a besoin d'oxygène, nécessaire au processus de consommation d'énergie, grâce à la respiration. Les molécules combustibles sont brûlées par les cellules au cours de la respiration cellulaire. Au cours de ces réactions l'énergie provenant de la dégradation est stockée transitoirement dans l'ATP (adénosine triphosphate: molécules énergétiques utilisables par la cellule), sorte de réserve d'énergie circulante utilisable par tous les êtres vivant pour n'importe qu'elle besoin..

L'énergie fournie par la combustion fractionnée des aliments, permet le fonctionnement de nos muscles (tel que les muscles de notre cœur, les muscles respiratoires, de l'estomac, de l'intestin etc...), et nous permet de marcher, courir, effectuer un travail professionnelle ... Toutes les cellules de notre organisme consomment de l'énergie pour maintenir constante leur composition et assurer leur fonctionnement. En particulier, nous avons besoin d'énergie pour effectuer toutes les réactions de synthèse qui permettent de fabriquer les molécules dont l'organisme a besoin pour vivre (par exemple la synthèse des protéines : constituants essentiels de tous les organismes vivant, constitués d'acides aminés disposés en chaînes reliés entre eux par des liaisons peptidiques). Notre organisme brûle les glucides (glucose), les protéines et les lipides (acides gras) contenus dans nos aliments, en une suite de réaction chimiques qui libère progressivement de l'énergie.

Le cœur et le foie utilisent principalement comme source d'énergie les acides gras (constituants des lipides), le cerveau et les muscles utilisent le glucose (sucre à 6 carbones très répandu dans la nature soit à l'état libre soit combiné avec le fructose pour constitué le saccharose extrait de la canne à sucre ou de la betterave).

Notre organisme, à partir des glucides, à partir des acides gras (constituée d'une chaîne carbonée, de 4 à 24 atomes de carbone, qui porte un groupe carboxylique à une extrémité et un groupe méthyle à l'autre) provenant des lipides et à partir de certains acides aminés (unité structurale des protéines) provenant des protéines, sait fabriquer des molécules particulières, très riches en énergie, facilement utilisable par les cellules de notre corps.

ENZYME

Une enzyme est une protéine qui catalyse une réaction chimique biologique bien déterminée.

GLYCEMIE

Concentration du glucose dans le plasma sanguin, la glycémie est un indicateur très important du taux de sucre (glucose) dans le sang. D'une valeur moyenne normale autour de 0,8g/litre, il y a diabète quand la glycémie à jeun est $\geq 1.26\text{g/l}$.

La régulation du métabolisme du glucose est assurée avant par l'insuline.

INSULINE

L'insuline est une hormone, dont la principale action est d'abaisser la concentration du glucose dans le sang en augmentant la pénétration du glucose dans les cellules (régulation et stockage du sucre dans l'organisme). Le traitement du diabète sucré de type 1 nécessite des injections quotidiennes d'insuline pendant toute la vie.

LIPIDES

Les lipides sont des assemblages moléculaires complexes dont les 2 unités de base sont les acides gras et le glycérol. Les lipides sont des esters d'acides gras. Les lipides alimentaires sont, dans leur très grande majorité, composés d'un trialcool, le glycérol et de 3 acides gras.

Principaux constituants des matières grasses (le beurre en contient 83% et les huiles 99%), ils fournissent une grande quantité d'énergie sous un faible volume. Les lipides permettent de stocker des protéides et des glucides sous forme de réserve en cas de besoin. Les lipides maintiennent la température corporelle et apportent les acides gras essentiels non synthétisés par l'organisme nécessaires à la croissance.

LIPOPROTEINES

Dans le plasma sanguin (milieu liquidien du sang), les lipides sont transportés par des édifices macromoléculaires dénommés lipoprotéines (associations moléculaires de protéines et de lipides). Les lipoprotéines sont généralement présentées sous forme de grosses particules globulaires (association moléculaires de protéines et de lipides). Elles sont généralement décrites comme des structures sphériques contenant un noyau central (région hydrophobe, cœur de lipides neutres : esters de cholestérol EC, et triglycérides TG), et une enveloppe externe polaire (région hydrophile, monocouche de phospholipides (PL), de cholestérol libre (CL) et de protéines en contact avec le milieu aqueux assurant sa stabilité dans le plasma). Cette disposition permet le transport des lipides qui sont hydrophobes dans le sang qui est un milieu aqueux. Les lipoprotéines qui circulent dans le plasma humain peuvent être classés selon le critère de leur densité : par ordre croissant, citons les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de basse densité (LPL) puis les lipoprotéines de haute densité (HDL) : celle-ci

portent le cholestérol et le conduisent au foie. Les lipoprotéines sont les principales responsables du transport du cholestérol.

Le cholestérol présent dans l'organisme est en partie apporté par l'alimentation et en partie synthétisé par l'organisme lui-même. Le cholestérol a des fonctions biologiques très importantes : il participe à la constitution des membranes cellulaires, il est précurseur des acides biliaires, des hormones stéroïdes et de la synthèse endogène de la vitamine D. Son métabolisme cellulaire et sanguin est étroitement associé à celui des lipides. Un taux anormalement élevé de cholestérol dans le sang, surtout s'il s'agit du cholestérol lié aux lipoprotéines de faible densité (LDL), est corrélé à un accroissement du risque d'infarctus par athérosclérose des vaisseaux du cœur.)

Cependant, chaque lipoprotéine a une fonction précise et une implication différente dans le métabolisme du cholestérol. Une partie des LDL (riche en cholestérol) approvisionne les tissus périphériques en cholestérol en fonction de leur besoin, l'autre partie des LDL est captée par le foie pour y être dégradée. Au contraire, le rôle des HDL consiste à ramener le cholestérol excédentaire des tissus au foie. Après captation, le cholestérol libre contenu dans les HDL est ensuite estérifié par lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT). Les EC sont ainsi transportés vers le foie directement par les HDL ou, après leur transfert induit par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), indirectement par les LDL et VLDL.

D'autre part, l'importance de la partie protéique des lipoprotéines, les apolipoprotéines, dans le transport des lipides, les interactions lipoprotéines-récepteur ainsi que dans la régulation de l'activité des enzymes (ce sont des protéines qui catalysent une réaction biochimique) impliquées dans le métabolisme des particules lipoprotéiques, a été récemment reconnue.

LYMPHOCYTES

Cellules de petite taille, à noyau non segmenté, présentes dans le sang, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes. Les lymphocytes jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de l'immunité (défense de l'organisme).

MEMBRANE CELLULAIRE

La membrane biologique constitue une enveloppe mince et continue séparant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire, a de multiples fonctions : définir, maintenir l'intégrité de la cellule, contrôler les mouvements d'entrée et de sortie des substances dans la cellule...

Le modèle membranaire en mosaïque fluide a été proposé en 1972 par Singer et Nicolson. Il est défini comme un modèle de mosaïque fluide où les lipides sont organisés en une bicouche faite de phospholipides et de cholestérol, dans laquelle les protéines globulaires intrinsèques

ou extrinsèques flottent telles des icebergs dans une mer d'huile. Beaucoup de protéines traversent la bicouche et sont des protéines transmembranaires.

PHOSPHOLIPIDES

Classe de lipides contenant de l'acide phosphorique dans leur molécule

PLASMA SANGUIN

Milieu liquidien du sang. Les cellules sanguines: hématies, leucocytes, plaquettes sanguines sont en suspension dans le plasma.

PROTEINES

Constituants essentiels de tous les organismes vivants, les protéines sont constitués d'acides aminés disposés en chaîne et reliés entre eux par des liaisons peptidiques. L'organisme humain contient environ 60.000 protéines différentes.

RADICAUX LIBRES

Les RD sont des particules issues de molécules oxygénées qui ont perdu un électron. Ils entrent immédiatement en réaction avec la molécule oxygénée la plus proche pour lui arracher l'électron qui leur manque pour devenir une molécule normale. Les RD sont utiles puisqu'ils font partie des moyens de défense de notre organisme contre les agressions microbiennes, mais l'accumulation de dommages causés par leur excès lors d'état de stress (vieillesse, problèmes de vision, maladies cardiovasculaires, athérosclérose, désordre immunitaire, diabète, certains cancers...) est bien prouvée.

SANG

Le sang est un tissu aussi vital pour l'organisme que le cœur ou le cerveau. Il se compose d'une partie fluide, le plasma et de nombreuses cellules très différentes les unes des autres tant morphologiquement que fonctionnellement.

Le sang circule dans un système de vaisseaux long et ramifié. Cette trame vasculaire permet aux cellules sanguines d'atteindre tous les organes du corps afin, par exemple, de les oxygéner, de les alimenter ou de les défendre contre les infections.

Alors que le sérum sanguin est obtenu directement par centrifugation d'un prélèvement de sang, le plasma sanguin (sérum + fibrinogène) est obtenu par centrifugation d'un prélèvement de sang avec anticoagulant (tube avec EDTA ou héparine ou citrate). Le plasma contient des molécules très diverses: facteur de coagulation, cholestérol, glucose, antigènes, immunoglobulines... Le sang véhicule de nombreuses molécules qui ont été ingérées ou métabolisées dans les différents organes du corps.

Les cellules du sang se répartissent en 3 catégories: les globules rouges (ou hématies jouent un rôle d'oxygénation des tissus), les globules blancs (ou leucocytes participent à la défense

BIBLIOGRAPHIE

- Ahluwalia A, De Rossi D, Giusto G, Chen O, Papper V, Likhtenshtein GI (2002) A fluorescent-photochrom method for the quantitative characterization of solid phase antibody orientation. *Anal Biochem.* 15;305(2):121-34
- Ahuja S (2000) *Chiral Separations by Chromatography.* Bibl. sc. QD 117 C5 A287
- Arpino A, Prévôt A, Serpinet J, Tranchant J, Vergnol A, Wittier P (1995) *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse.* Ed Masson, Paris
- Baker PT (1992) Human population biology: a viable transdisciplinary science. *Hum Biol.* 54(2):203-20
- Beesley TE et al. (1998) *Chiral Chromatography.* Bibl. sc. QD 79 C4 B415
- Berlin E, Judd JT, Marshall MW et Kliman PG (1987) Dietary linoleate increases fluidity and influences chemical composition of plasma low density lipoprotein in adult men. *Atherosclerosis.* 66:215-225
- Berliner LJ (1976) *Spin labeling Theory and applications, vol.1 et (1979) Academic Press, vol.2*
- Bieri JG, Brown ED & Smith JC (1985) Determination of individual carotenoids in human plasma by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr.* 8:473-84
- Bernard et Schneider (1996) *La chromatographie.* Lycée J Rostand Strasbourg. UPBM Marseille
- Bittner B, Isel H, Mountfield RJ (2000) The use of electron paramagnetic resonance spectroscopy in early preformulation experiments: the impact of different experimental formulations on the release of a lipophilic spin probe into gastric juice. *European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics.* 51:159-162
- Bleton J, Coupry C, Sansoulet J (1996) Approche d'étude des encres anciennes- studies in conservation. 41: 95-108
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37:911
- Bounias (1983) *L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince.* Masson
- Braithwaite and Smith (1985) *Chromatographic Methods.* 4ème éd. Chapman and Hall
- CaO G, Alesio HM, Cutler RG (1992) Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidant, free. *Rad-Biol.* 14:303-311

- Cao G, Alessio HM and Cutler RG (1992) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. 14:303-311
- Casoli A, Mirti P, Palla G (1995) Characterization of medieval proteinaceous painting media using gas chromatography and gas chromatography- mass spectrometry - *Fresenius' j Anal Chem*. 352 (3-4): 372-379
- Ceriello A et Giugliano D (1998) Oxidative stress and diabetic complications . In international. *Text book of diabetes* 1453-1468
- Chavanne, Beaudoin, Jullien, Flamand (1991) *Chimie organique expérimentale*. Ed. Belin
- Christen WG, Gaziano JM, Hennekens CH (2000) Design of physicians' Health Study II-A randomized trail of Beta-carotene, vitamin C and E, and multivitami,s, in prevention of cancer, cardiovascular disease and eye disease, and revieww of results of completed trials. *Ann Epidemiol*.10:125-134
- Colinart S (1987) Ch. iv - matériaux constitutifs- in : sculptures en cire de l'ancienne Egypte à l'art abstrait, Ed : ministère de la culture et de la communication - Editions de la réunion des musées nationaux, Paris. 29-57.
- Connan J, Deschesne (1996) Le bitume à suse-collection du musée du louvre - Réunion des musées nationaux et Elf aquitaine production. Paris et pau
- Cserhati T et al. 1994 *Chromatographic Determination of Molecular Interactions : Applications in Biochemistry, Chemistry and Biophysics*. Bibl. sc. QD 117 C5 C958
- Dachet C, Motta C, Neufcour D et Jacotot B (1990) Fluidity changes and chemical composition of lipoproteins in type Iia hyperlipoproteinemia. *Biochim Biophys Acta*. 1046:64-72
- Dachet C, Motta C, Neufcour D et Jacotot B (1991) Modification of chemical and physical properties of lipoproteins by probucol in type Iia hyperlipoproteinemia. *J Clin Biochim Nutr*. 10:51-63
- De Graeve, Berthou et Prost (1986) *Méthodes chromatographiques couplés à la spectrométrie de masse*. Masson
- Delange RJ, Glazer AN (1989) Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: A screen for biologically relevant protective agents. *Anal Biochem*.177:300-306
- Demple B, Cuevas CF (1991) The control of oxidative stress responses, oxidative dstress and insulin action in non-dependant (type 2) diabetic patients. *Metabolism Cell*.67:837-839
- Done IN, Knox JH et Loheac J (1974) *Applications of high speed liquid chromatography*, Wiley-interscience. New-york

- Douste-Blazy et Mendy F (1988) *Biologie des lipides chez l'homme. Techniques et documentation*, p314
- Engelhardt H (1979) *High performance liquid chromatography*, Springer-verlag, Berlin
- Fintaine E (2002) Production et élimination des radicaux libres oxygénés. *J Diabétologie*.16:1-4
- Finter NB (1987) Human cells as a source of interferous for clinical use. *J Inter Res.* 7:497-500
- Foren S, Kordel J (1996) Biomolecular structure and dynamics-experiment and theory. *J pharm Biomed Anal.* 14(3):233-6
- Foster JR (2002) One hundred years of virology:a chief's perspective. *Commun Dis Public Health.* 5(1):78-86
- Gardais, Gorin, Prévot, Serpinet, Tranchant et Untz (1982) *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse - 3ème éd., Masson*
- Glazer AN (1988) Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine. *Faseb J.*2:2487-2491
- Gould GW (2001) Symposium in 'nutritional effects of new processing technologies'. New processing technologie: an overview. *Proc Nutr Soc.* 60(4):463-74
- Guetteridge JM (1993) Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequences. *Free radic Res Commun* 19:141-158
- Grunberger D, Haimovitz R et Shinitzky M (1982) Resolution of plasma membrane lipid fluidity in intact cells labelled with diphenylhexatriene. *Biochim Biophys Acta* 688:764-774
- Halpine SM (1992) Amino acid analysis of proteinaceous media from cosimo tura's 'the Annunciation with Saint Francis and Saint Louis of Toulouse' - *Studies in conservation.* 37(1):22-38
- Hamilton RJ et Sewell PA (1977) *Introduction to high performance liquid chromatography*, Chapman et hall, Londres
- Hankin JH, Kolonel LN & Hinds MW (1984) Dietary history methods for epidemiological studies:application in a case-control study for vitamin A and lung cancer. *J Nat Cancer Inst.*73:1417-22
- Havel RJ, Eder HA And Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in huan serum. *J Clin Invest.* 35:1345-1353
- Holtzman JL (1984) *Spin labeling in pharmacology*, Academic Press
- Honig B, Nicholls A (1995) Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science.* 26;268(5214):1144-9

- Horvath C (1980) High performance liquid chromatography, Tomes i et ii, Academic press, New-york
- Hubbell WL et Mc Connell HM (1969) Orientation and motion of amphiphilic spin labels in membranes. Proc Natl Acad Sci USA 64: 20-27
- Huber JFK (1978) Instrumentation for high performance liquid chromatography. volume 13 de Journal of chromatography library, Elsevier Amsterdam
- Ingeborg R, Kupke and Wörz-Zeugner S (1986) Sequential microultracentrifugation of lipoproteins in 100 µl of serum. Journal of Lipid Research. 27:988-995
- Jinno K (1996) Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition. Bibl sc QD 79 C4 C557
- John Chapman M, Goldstein S, Lagrange D and Michel Laplaud P (1981) A density gradient untracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. Journal of Lipid Research. 22:339-356
- Kirchhausen T, Untracht SH, Fless GM et Scanu AM (1979) Atherogenic diets and neutral-lipid organization in plasma low density lipoproteins. Atherosclerosis 33:59-70
- Kirkland JJ (1973) Chromatographie en phase liquide, pratique et applications modernes. gauthier-villars. Paris
- Kitano H (2002) Looking beyond the details:a rise in system-oriented approaches in genetics and molecular biology. Curr Genet. 41(1):1-10
- Knox JH (1980) High performance liquid chromatography. edinburgh university press, Edinburgh
- Kuhn R, Lederer E (1931) Ber Dtsch Chem Ges 64:1349
- Kuhn R, Winterstein A, Lederer E (1931) Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 197:141
- Lagger P et Kostner GM (1978) Thermotropic changes in the surface structure of lipoprotein B from human-plasma low density lipoproteins. A spin-label study. Eur J Biochem 84:227-232
- Laguës M (1990) L'Actualité Chimique. (1) p.17
- Lamotte A et Rocca JL (1975) Comment aborder la chromatographie liquide, Touzart et Matignon. Paris
- Martin AJP, Syngé RLM (1941) A new form of chromatogram employing two liquide phases.1. a theory of chromatography. 2. application of the microdetermination of the higher monoaminoacids in proteins, Biochemistry Journal. 35: 1358-1368

- März W, Siekmeier R, Scharnagl H, Seiffert UB and Gross W (1993) Fast lipoprotein chromatography: New method of analysis for plasma lipoproteins. *Clin Chem.* 39/11:2276-2281
- Mejanelle P, Bleton J, Goursaud S, Tchapla A (1996) Analyse de baumes de momification d'egypte ancienne par chromatographie gazeuse capillaire - spectrométrie de masse - *Analysis Magazine*, août-septembre. 24 (7): m16-m20
- Morel Y et Barouki R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342:481-496
- Narce M, Gresti J and Bezard J (1988) Method for evaluating the bioconversion of radioactive polyunsaturated fatty acids by use of reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography.* 448:249-264
- Nasal A, Siluk D, Kaliszan R (2003) Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr Med Chem.* 10(5):381-426
- Pastore P, Magno F, Volpin S, Biscontin G (1991) Chromatographic determination of oxalate ion in patinas covering ancient materials - *Ann. Chim. Rome.* 81(5-6):233-241
- Paulo MG, Marques HM, Morais JA, Almeida AJ (1999) An isocratic LC method for simultaneous determination of vitamins A, C, E and beta-carotene. *J Pharm Biomed Anal.* 21(2):399-406
- Pefferkorn E (1999) *Interfacial Phenomena in Chromatography.* Bibl. sc. QD 79 C4 I61
- Perlemuter L et Collin G (1995) *Diabète et maladies métaboliques*, 2^{ème} édition Masson Paris. 17-112
- Perry SG, Amos R et Brener PI (1972) *Practical liquid chromatography*, plenum press. new-york
- Poole CF et al. (1991) *Chromatography Today.* Bibl. sc. QD 79 C4 P822c
- Pownall HJ, Shepherd J, Mantulin WW, Sklar LA et Gotto AM (1980) Effect of saturated and polyunsaturated fat diets on composition and structure of human low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 36:299-314
- Protocole de validation de techniques (1985), Commission "validation de techniques" de la société Française de Biologie Clinique. *Inform Scientif Biol.* 11
- Provdor, T. et al. (1996) *Chromatographic Characterization of Polymers : Hyphenated and Multidimensional Techniques.* Bibl sc QD 1 A244 247
- Pryde A et Gilbert MT (1979) *Applications of high performance liquid chromatography*, John Wiley and sons, New-york

- Quye A, Wouters J, Boon JJ (1996) A preliminary study of light-ageing effect on the analysis of natural flavanoid-dye wools by photodiode array hplc and by direct temperature mass spectrometry - in : "Comitee for conservation, icom", Edimbourg, septembre v2: 704-713
- Rajcsanyi M et E (1975) High speed liquid chromatography. volume 6 de chromatographic science marcel dekker new-york
- Redgrave TG, Robert CCK And West CE (1975) Separation of plasma lipoproteins by density gradient ultracentrifugation. Anal Biochem. 65:42-49
- Regert M, Rolando C (1996) Archéologie des résidus organiques - de la chimie analytique à l'archéologie : un état de la question - Techné. 3: 118-128
- Richardin P, Copy S, Chahine C, Saltron F, Bonnassies (1996) Termes s. - gc and gc/ms characterization of degradation amino acids in naturally and artificially aged leathers - Journal of the American leather chemists association (Jalca). 91 (1): 2-17
- Root DE, Kelley BP, Stockwell BR (2002) Global analysis of large-scale chemical and biological experiments. Curr Opin Drug Discov Devel. 5(3):355-60
- Rouessac F, Rouessac A (2000) Analyse chimique méthode et techniques instrumentales modernes. Ed. Masson Bibl. sc. QD 75.2 R854
- Rosset R, Caude M et J (1982) A manuel pratique de chromatographie en phase liquide , Masson (1978) Chromatographie en phase liquide et chromatographie sur couche mince à haute résolution, journée de chromatographie, Paris. (1979) In monographies des périodiques Masson, série sciences n°1, Masson
- Rosset R, Caude M, Jardy (1991) A Chromatographies en phase liquide et supercritique - Ed : Masson, Paris
- Savidan (1963) La chromatographie - Dunod
- Schmalzriedt S, Jenne M, Mauch K, Reuss M (2003) Integration of physiology and fluid dynamics. Adv biochem Eng Biotechnol. 80:19-68
- Schreier, Polnaszek CF, Smith ICP (1978) Spin labels in membranes: problems in practice. Biochim Biophys Acta 515:375-436
- Scott RPW (1976) Contemporary liquid chromatography. volume 11 de techniques of chemistry, John Wiley, New-york
- Shepherd J, Packard CJ, Grundy SM, Yeshurun D, Gotto AM et Taunton OD (1980) Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoproteins in man. J Lipid Res 21:91-99
- Slepchenko BM, Schaff JC, Carson JH, Loew LM (2002) Computational cell biology : spatiotemporal simulation of cellular events. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 31:423-41

- Sola R, Motta C, Maille M, Bargallo MT, Boisnier C, Richard JL et Jacotot B (1993) Dietary monounsaturated fatty acids enhances cholesterol efflux from human fibroblast. Relation to fluidity, phospholipid fatty acid composition, overall composition, and size of HDL3. *Arterioscler Thromb* 13:958-966
- Stacewicz-Sapuntzakis M, Phyllis EB, Walker Kikendall J & Burgess M (1987) Simultaneous determination of serum retinol and various carotenoids: their distribution in middle-age men and women. *Journal of Micronutrient Analysis*.3:27-45
- Taal AR, Small DM, Atkinson D et Rudel LL (1978) Studies on the structure of low density lipoproteins isolated from macaca fascicularis fed an atherogenic diet. *J Clin Invest*. 62:1354:1363
- Twett M (1906) Les chromophylles dans le monde végétal et animal, *Ber Dtsch Chem Ges* 24:316
- Vassault A (1991) Procédures d'assurance de qualité dans le traitement des analyses: critères d'évaluation. *Biologie-Lariboisière-Paris*
- Vieillescazes C, Coen J (1993) Caractérisation de quelques résines utilisées en Egypte ancienne - studies in conservation. 38:255-264
- Wallert A (1996) Tannins of the parchment of the dead sea scrolls - in : "Comitee for conservation, icom", Edimbourg, septembre v2:560-564
- Walsh SJ (2004) Recent advances in forensic genetics. *Expert Rev Mol Diagn*. 4(1):31-40
- Watt A. (1989) Membrane and dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 1:691-700
- Will JC, Byers T (1996) Doses diabetes mellitus increase the requirement for vitamin A, C and E. *New Rev*.54:193-202
- Willet WC, Polk BF, Underwood BA, Stamfer MJ, Pressel S, Rosner B, Taylor JO, Schneider K. & Hames CG (1984) Relation of serum vitamins A and E and carotenoids to the risk of cancer. *New Eng J Med*.310:430-4
- Wood DJ, Minor PD (1990) Use of human diploid cells in vaccine production. *Biologicals*. 18:143-146
- Zaman Z, Fielden P, Frost PG (1993) Simultaneous determination of vitamins A and E and caretonoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin Chem (Washington DC)*.39:2229-2234
- Zschornig O, Machill H, Panasenko OM, Volnova TV, Arnold K, Azizova OA (1993) Influence of polar polymers on the apoprotein region of human serum lipoproteins: an electron paramagnetic resonance (EPR) study. *Gen Physiol Biophys*. 12(2): 113-24

PUBLICATION

Antioxidant Status and Levels of Different Vitamins Determined by High Performance Liquid Chromatography in Diabetic Subjects with Multiple Complications

S. MERZOUK¹, A. HICHAMI², S. MADANI², H. MERZOUK³,
A. Y. BERROUIGUET⁴, J. PROST², K. MOUTAIROU⁵, N. CHABANE-SARI¹
AND N. A. KHAN²

¹ *Département de Physique, Faculté des Sciences, BP 119,
Université de Tlemcen, Tlemcen, Algérie*

² *UPRES 2422, Lipides et Nutrition, UFR Sciences de la Vie,
Université de Bourgogne, Dijon, France*

³ *Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP 119,
Université de Tlemcen, Tlemcen, Algérie*

⁴ *Service de Diabétologie,
Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen, Tlemcen, Algérie*

⁵ *FAST, Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Bénin*

Key words: Antioxidant status — Diabetes — Vitamin A — Vitamin E — Vitamin C

Abbreviations: CAD, coronary artery disease; CAT, catalase; DWC, diabetes without complications; GSH-Px, glutathione peroxidase; HDL-C, HDL-cholesterol; HPLC, high performance liquid chromatography; HTA, hypertension; LDL-C, LDL-cholesterol; RF, renal failure; SOD, superoxide dismutase.

Abstract. Plasma vitamin A, C and E levels and erythrocyte antioxidant enzyme activities were investigated in type I and type II diabetic subjects with and without complications, i.e., hypertension, coronary artery disease and renal failure. Reverse phase HPLC was used to quantify vitamin A and E levels. We observed that the vitamin C levels were not significantly different between control and diabetic subjects. However, vitamin A and E levels were significantly lower in type I and type II diabetic subjects compared to controls. Superoxide dismutase (SOD) activity was significantly lower in type II, but not in type I, diabetic patients compared

Correspondence to: Prof. Naim A. Khan, Ph.D., D.Sc., UPRES 2422, Lipides et Nutrition, UFR Sciences de la Vie, 6 Boulevard Gabriel, Université de Bourgogne, Dijon 21000, France. E-mail: Naim.Khan@u-bourgogne.fr

to controls. Interestingly, glutathione reductase and peroxidase activities were diminished in type I, but not in type II, diabetic subjects as compared to controls. Catalase activity was lower in both types of diabetic patients in comparison with their respective controls. Altogether these results suggest that diabetes mellitus may be associated with altered antioxidant status regardless to various complications.

Introduction

Diabetes mellitus is a chronic disease characterized by an absolute or relative deficiency of insulin and/or by insulin resistance. All forms of diabetes, both inherited and acquired, are characterized by hyperglycaemia, development of specific microvascular pathology and accelerated atherosclerosis responsible for coronary artery disease (Ruderman et al. 1992). There has been currently great interest in the potential contribution of increased oxidative stress to the development of complications in diabetes mellitus (Sinclair 1993; Baynes and Thorpe 1999). An increase in oxidative stress may occur due to an increase in the production of free radicals. These reactive oxygen species are capable of chemically altering all major classes of biomolecules (e.g., lipids, proteins and nucleic acids) by changing their structure and function (Therond et al. 2000), thus leading to cell damage in diabetes (Sinclair 1993). The biological effects of free radicals are normally controlled *in vivo* by a wide range of antioxidants such as vitamin A, C and E, glutathione and antioxidant enzymes. Vitamin E, the main liposoluble antioxidant in human beings, scavenges peroxy-radicals, produced during lipid peroxidation (Therond et al. 2000). Reduced glutathione and vitamin C regenerate vitamin E (Therond et al. 2000). Vitamin A and C have also the ability to react directly with reactive oxygen species. Among antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) catalyzes dismutation of the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) into H_2O_2 , and glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) both detoxify H_2O_2 and convert lipid hydroperoxides to nontoxic alcohols (Guemouri et al. 1991; Therond et al. 2000). Since oxidative stress seems to play a key role in the pathology of diabetes mellitus, several methods have been developed to assess the antioxidant status such as the determination of circulating vitamins and antioxidant enzymes (Guemouri et al. 1991; Maxwell et al. 1997a; Courderot-Masuyer et al. 2000; Therond et al. 2000; Aydin et al. 2001). However, the investigators have not come to a consensus due to contradictory results reported in this pathology (Jones et al. 1988; Courderot-Masuyer et al. 2000; Aydin et al. 2001; Pieri et al. 2001). In addition, the implication of oxidative status in diabetes mellitus with its major complications such as hypertension (HTA), renal failure (RF) and coronary artery disease (CAD) is not well known. It was, therefore, thought worthwhile to undertake a study in order to evaluate erythrocyte antioxidant enzyme activities (SOD, GSH-Px, CAT) and the levels of vitamin A, C and E in diabetes mellitus associated or not with these complications.

Materials and Methods

Subjects

A total of 40 type I and 42 type II diabetic patients were recruited from the Department of Diabetics, University Hospital of Tlemcen (Algeria). Medical records were screened by specialist physicians. The diabetic type I or type II patients were divided into four groups: group I consisted of diabetic patients without complications (DWC); group II consisted of patients with coronary artery disease (CAD), diagnosed by clinical symptoms of angina pectoris, electrocardiogram examination or documented myocardial infarction; group III consisted of patients with hypertension (HTA), defined as a blood pressure $\geq 140/90$ mm Hg; group IV consisted of patients with renal failure (RF), evaluated by significant renal impairment such as abnormal creatinine or macroalbuminuria.

All diabetic patients received insulin (for type I diabetes), or oral hypoglycemic agents like sulphonylureas or metformin (for type II diabetes). In addition, diabetic patients with HTA or with RF were treated by angiotensin converting enzyme inhibitors. Diabetic patients with CAD were treated by calcium antagonists. No patients received lipid lowering medications.

Two groups of control subjects were selected. Controls and diabetic subjects were matched with respect to age and body mass index (BMI) as determined by the weight and height of patients. All individuals were non smokers. None had taken vitamin supplements. The characteristics of patients are given in Table 1. The study was approved by the ethical committee of the Tlemcen-University Hospital and informed written consent was obtained by all the subjects.

Blood samples

Fasting venous blood samples were collected in heparinized tubes. Blood samples were centrifuged to obtain the plasma for immediate analysis of glucose, glycosylated hemoglobin (Hb A1C) and lipids. Aliquots of plasma were frozen at -20°C for further determinations of vitamins and total antioxidant capacity. After removal of plasma, erythrocytes were washed three times with two volumes of isotonic saline. Erythrocytes were lysed with cold distilled water (1/4), stored in refrigerator at 4°C for 15 min and the cell debris was removed by centrifugation ($2000 \times g$ for 15 min). Erythrocyte lysates were assayed for antioxidant enzyme activities.

Lipoprotein isolation

Plasma lipoprotein fractions (LDL, $d < 1.063 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$; HDL, $d < 1.21 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) were separated by sequential ultracentrifugation in a beckman ultracentrifuge (Model L5-65, 65 Ti rotor), using sodium bromide for density adjustment, according to Havel et al. (1955). LDL and HDL fractions were dialyzed against 0.15 mol/l NaCl and 1 mmol/l disodium EDTA, pH 7.4, at 4°C in spectra/por 2 dialysis tubing (spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA).

Table 1. Different groups of diabetic and control subjects

	Control subjects		Diabetic subjects											
	C1	C2	Type I				Type II							
			DWC	CAD	HTA	RF	DWC	CAD	HTA	RF				
Number	10	10	12	8	10	10	10	10	10	10	12	12	10	10
M/F ratio	5/5	5/5	6/6	5/3	5/5	6/4	5/5	5/5	5/5	5/5	6/6	6/6	5/5	5/5
Age (years)	28.0 ± 1.0	56.0 ± 1.2	30.0 ± 1.0	28.0 ± 2.0	29.0 ± 1.0	30.0 ± 1.0	30.0 ± 1.0	28.0 ± 1.0	28.0 ± 1.0	28.0 ± 1.0	56.0 ± 1.3	56.0 ± 1.3	56.0 ± 1.2	56.0 ± 1.2
BMI (kg/m ²)	21.2 ± 1.8	25.3 ± 1.3	22.2 ± 1.5	22.6 ± 1.8	22.5 ± 1.6	20.1 ± 1.7	20.1 ± 1.7	22.6 ± 1.8	22.6 ± 1.8	22.6 ± 1.8	24.8 ± 2.0	24.8 ± 2.0	22.9 ± 2.0	22.9 ± 2.0
Duration of disease (years)	-	-	8.2 ± 0.5	10.0 ± 1.0	9.1 ± 1.0	12.0 ± 1.0	12.0 ± 1.0	10.0 ± 1.0	10.0 ± 1.0	10.0 ± 1.0	8.5 ± 0.9	12.0 ± 1.4	12.7 ± 1.2	12.7 ± 1.2
Fasting glucose (mmol/l)	4.9 ± 0.1	5.2 ± 0.2	9.0 ± 0.8*	12.7 ± 1.1*	10 ± 0.8*	10.8 ± 1.1*	10.8 ± 1.1*	12.7 ± 1.1*	12.7 ± 1.1*	10.8 ± 0.5*	9.0 ± 0.8*	9.0 ± 0.8*	9.4 ± 0.7*	9.4 ± 0.7*
Hb A1C (%)	5.0 ± 0.2	5.4 ± 0.3	7.4 ± 0.5*	9.9 ± 0.3*	9.1 ± 0.4*	10.2 ± 0.3*	10.2 ± 0.3*	9.9 ± 0.3*	9.9 ± 0.3*	10.7 ± 0.6*	10.0 ± 0.5*	10.0 ± 0.5*	9.7 ± 0.7*	9.7 ± 0.7*
Total cholesterol (mmol/l)	5.7 ± 0.4	5.4 ± 0.5	5.4 ± 0.6	5.5 ± 0.4	6.0 ± 0.6	7.2 ± 0.3*	7.2 ± 0.3*	5.5 ± 0.4	5.5 ± 0.4	6.1 ± 0.6	6.1 ± 0.4	6.1 ± 0.4	6.69 ± 0.3*	6.69 ± 0.3*
Triglycerides (mmol/l)	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.0 ± 0.4*	2.3 ± 0.3*	2.3 ± 0.3*	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.4*	2.8 ± 0.4*	2.8 ± 0.4*	2.4 ± 0.3*	2.4 ± 0.3*
LDL-C (mmol/l)	3.6 ± 0.2	3.8 ± 0.5	3.5 ± 0.3	3.6 ± 0.3	4.1 ± 0.5	5.2 ± 0.3*	5.2 ± 0.3*	3.6 ± 0.3	3.6 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.5	5.3 ± 0.4*	5.3 ± 0.4*
HDL-C (mmol/l)	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.5	1.1 ± 0.2*	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.5 ± 0.4	1.1 ± 0.2*	1.1 ± 0.2*	1.1 ± 0.1*	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.4
SBP (mm Hg)	127 ± 3	132 ± 4	128 ± 3	130 ± 3	176 ± 4*	128 ± 2	128 ± 2	130 ± 3	130 ± 3	132 ± 3	180 ± 5*	180 ± 5*	136 ± 2	136 ± 2
DBP (mm Hg)	81 ± 2	87 ± 3	84 ± 2	86 ± 2	98 ± 3*	84 ± 2	84 ± 2	86 ± 2	86 ± 2	85 ± 3	96 ± 3*	96 ± 3*	88 ± 2	88 ± 2

BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; DBP, diastolic blood pressure; DWC, diabetes without complications; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; HTA, hypertension; LDL-C, low density lipoprotein-cholesterol; RF, renal failure; SBP, systolic blood pressure; * $p < 0.05$, diabetic subjects versus controls. C1 and C2 represent, respectively, the control groups belonging to type I and type II diabetic groups.

Determinations of hemoglobin and plasmatic levels of lipoprotein

Glycosylated hemoglobin levels (Hb A1C) were determined by isolab column chromatography (Kaplan et al. 1982). Plasma glucose was determined by glucose oxidase method using a glucose analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Plasma triglyceride and total cholesterol, LDL- and HDL-cholesterol (LDL-C and HDL-C) contents were determined by using enzymatic methods, according to the instructions furnished with the kit (Boehringer, Mannheim, Germany).

Determination of plasmatic levels of vitamin A and E by high performance liquid chromatography

Plasma α -tocopherol (vitamin E) and retinol (vitamin A) were determined by reverse phase HPLC (Zaman et al. 1993). This method was used to quantify in a single chromatographic run with an internal standard, Tocol (Lara Spiral, Couternon, France), added for estimation of recovery. The stationary phase was constituted by greffed silica (C18 column, HP ODS Hypersil C18; 200 mm \times 4.6 mm; Lara Spiral, maintenance temperature of analytical column, 35°C). The mobile phase was a mixture of methanol/water (98/2, v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Vitamins were extracted by hexane, dried under nitrogen and resuspended in methanol. The HPLC peaks were detected by an UV detector at 292 nm for vitamin E and 325 nm for vitamin A. Representative chromatograms were obtained by injecting standard solutions. In order to evaluate the daily performance of the HPLC system, the external standard was injected every day in the beginning, middle and at the end of the chromatographic system.

Determinations of plasmatic levels of vitamin C

Vitamin C levels were determined in plasma using the method of Roe and Kuether (1943). After protein precipitation with 10% trichloroacetic acid and centrifugation, the supernatant (500 μ l) was mixed with 100 μ l sulfuric acid (9 N) containing 30 mg/ml dinitrophenylhydrazine, 4 mg/ml thiourea and 0.5 mg/ml copper sulfate and incubated at 37°C for 3 h. Following the addition of 750 μ l of 65% (v/v) sulfuric acid, the absorbency was recorded at 520 nm.

Determinations of erythrocyte antioxidant enzyme activities

Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activity was measured by spectrophotometric analysis of the rate of hydrogen peroxide decomposition at 240 nm (Aebi 1974). Enzyme activity was expressed as U/g Hb. Glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) was assessed by the method of Paglia and Valentine (1967), using cumene hydroperoxide as substrate. One unit of glutathione peroxidase activity is defined as the amount of enzyme which gives a 90% decrease in glutathione concentration *per min* at a 1 mmol/l starting glutathione concentration. Glutathione reductase (GSSG-Red, EC 1.6.4.2) activity was determined by measuring the rate of NADPH oxidation in the presence of oxidized glutathione (Goldberg and Spooner 1992). The unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which oxidized 1 mmol of

NADPH/min. Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activity was measured by the NADPH oxidation procedure (Elstner et al. 1983) and expressed as units of SOD *per g Hb*.

Statistical analysis

Values are means \pm S.E.M. Statistical analysis of the data was carried out using *Statistica* (version 4.1, Statsoft, Tulsa, OK). Data were evaluated by analysis of variance. Mann-Whitney U-test was employed for the comparison between patients and control groups.

Results

Hb A1C, plasma glucose, cholesterol and triglyceride concentrations, and LDL-C and HDL-C levels

Significant differences were found between diabetic and control subjects for plasma glucose and Hb A1C levels which were high in all diabetic patients regardless to complications (Table 1). However, the highest glucose concentrations were apparent in diabetes mellitus (type I and II) associated with CAD. Plasma total and LDL-C concentrations were not significantly altered in diabetic patients having CAD and HTA, except those associated with RF who exhibited higher levels than controls. HDL-C amounts were lower only in type I, and II diabetes mellitus with CAD compared to control and other diabetic patients. Plasma triglyceride levels were significantly increased in all type II and type I diabetic patients, having HTA and RF.

Plasma vitamin A, C and E concentrations

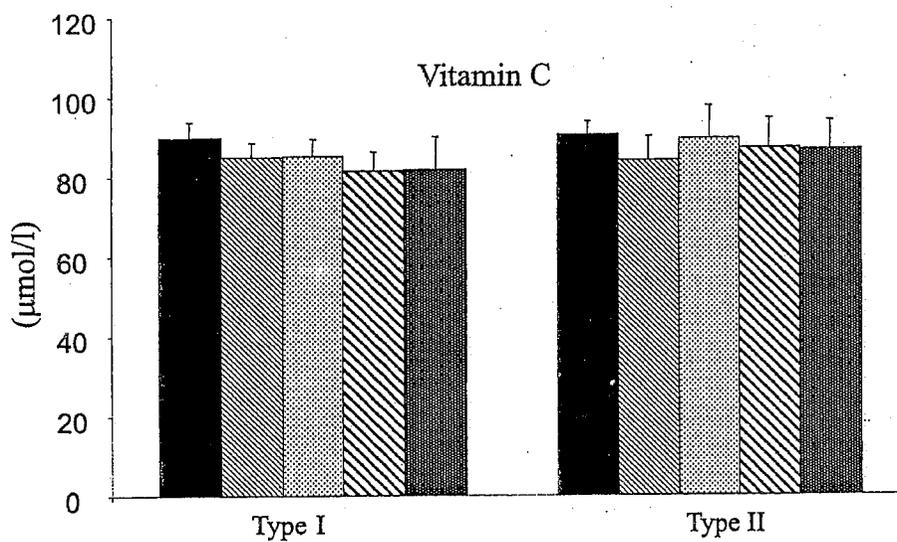
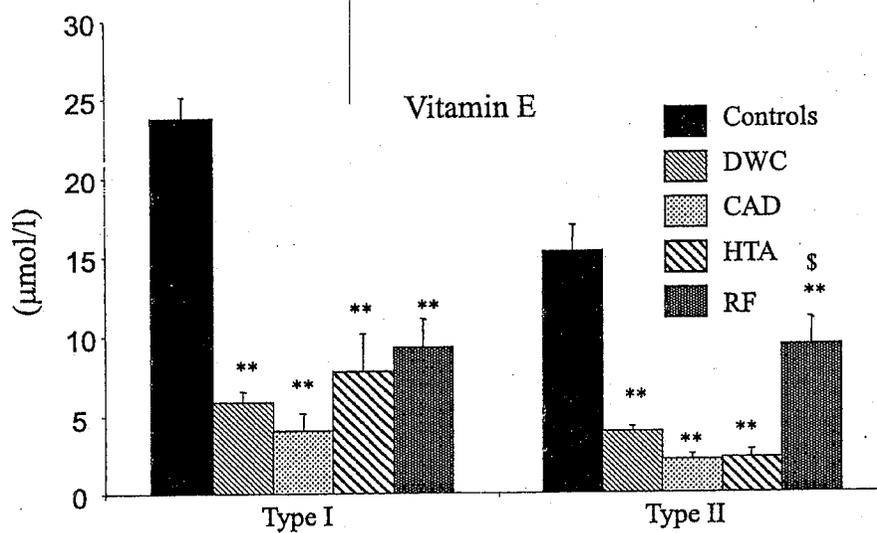
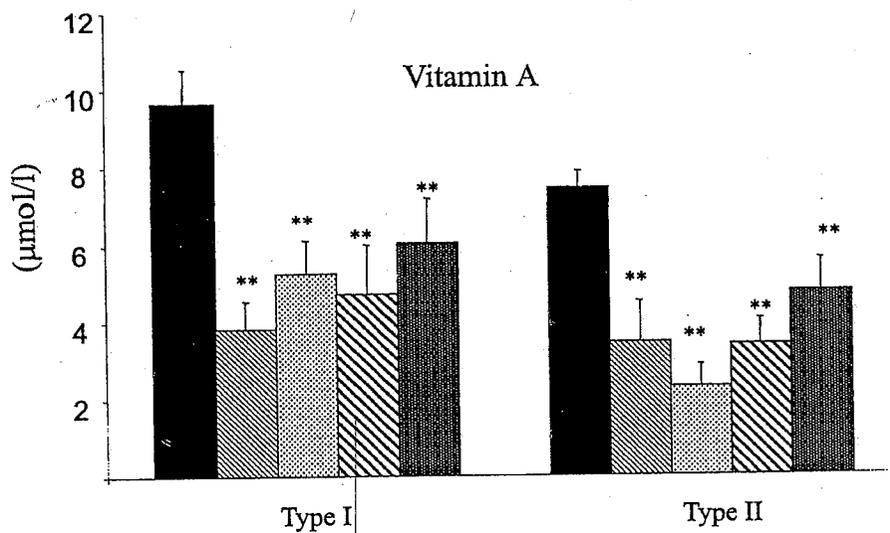
While vitamin C levels did not differ between the diabetic and control groups, vitamin A and E levels were significantly lower in all diabetic groups compared to controls (Figure 1).

Erythrocyte antioxidant enzyme activities

SOD activity was significantly lower in all groups of type II diabetes mellitus when compared with controls. However, no significant difference was observed between type I diabetic groups and their controls (Figure 2).

Catalase activity was lower in both types of diabetic patients compared with their respective controls (Figure 2). On the contrary, glutathione reductase and peroxidase activities were diminished in all type I, but not in type II, diabetic patients as compared to controls (Figure 3).

Figure 1. Plasma vitamin A, C and E concentrations in diabetic and control subjects. The levels of different vitamins were determined as described in Materials and Methods. Values are means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed by employing the Mann-Whitney U-test. ** $p < 0.001$, diabetic *vs.* control subjects; \$ $p < 0.05$ significant compared to DWC, CAD, HTA and RF patients.



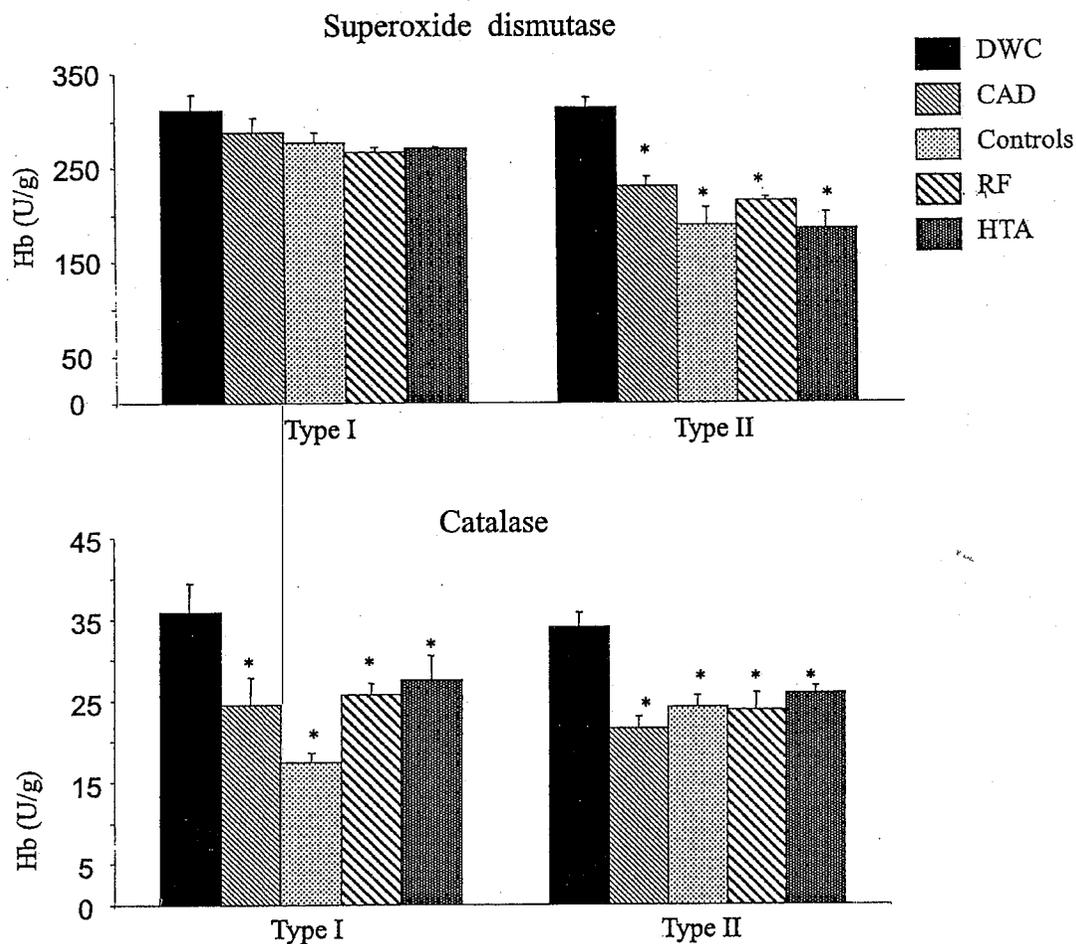


Figure 2. Superoxide dismutase and catalase enzyme activities in diabetic and control subjects. The enzyme activities were determined as described in Materials and Methods section. Values are means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed by employing the Mann-Whitney U-test. * $p < 0.05$, diabetic vs. control subjects.

Discussion

Since there are contradictory results on the antioxidant status in diabetic patients, we conducted the present study on type I and type II diabetes mellitus with or without complications like hypertension (HTA), coronary artery diseases (CAD) and renal failure (RF). We observed that abnormalities in lipid and lipoprotein in the diabetic population were associated with high fasting glucose and Hb A1C levels. Hypertriglyceridemia was observed in all type II diabetic and only in type I diabetic subjects with HTA and RF. Total and LDL-C concentrations were increased in diabetes mellitus with RF. HDL-C levels were decreased only in diabetic patients with CAD. Hyperglycemia is the most common feature in type II diabetes (Elstner et al. 1983). In fact, overproduction of VLDL with increased secretion of triglycerides or decreased lipoprotein lipase-mediated hydrolysis of VLDL triglyc-

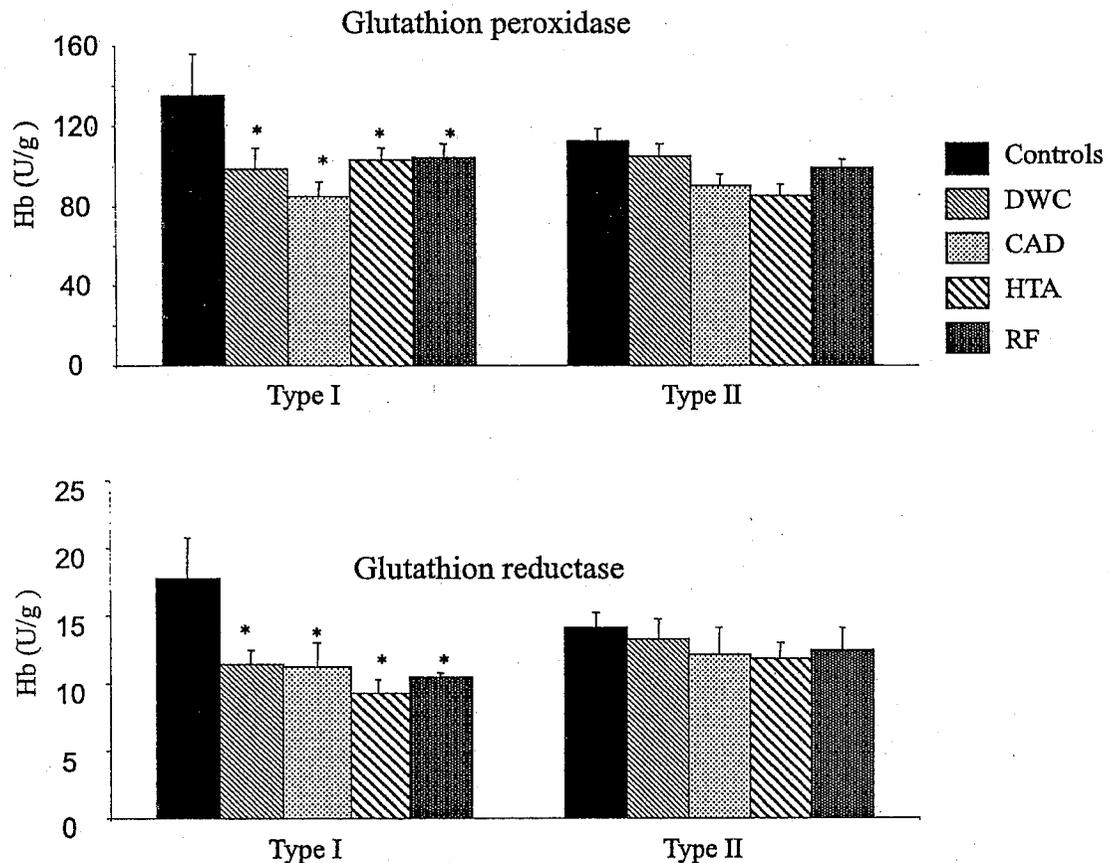


Figure 3. Glutathione reductase and peroxidase enzyme activities in diabetic and control subjects. The enzyme activities were determined as described in Materials and Methods section. Values are means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed by employing the Mann-Whitney U-test. * $p < 0.05$, diabetic *vs.* control subjects.

erides might contribute to elevated triglyceride levels in type II diabetes (Taskinen 1997). In addition, patients with high blood pressure tend to be hypertriglyceridemic (MacMahon et al. 1985). Thus, it is not surprising that all our type II and only type I diabetic subjects with HTA possessed high triglyceride levels. On the other hand, diabetes mellitus with renal complications is known to be associated with elevated plasma triglyceride, cholesterol and LDL-C levels (Jensen et al. 1988; Mattock et al. 1988). In the nephrotic syndrome, hyperlipidemia is assumed to be caused by increased hepatic lipoprotein synthesis in response to hypoalbuminaemia, low plasma oncotic pressure and renal protein leakage (Short and Durrington 1990). In our study, lipoprotein changes in type I and type II diabetics with RF are in agreement with several reports that have demonstrated that abnormalities in lipids are associated with diabetic nephropathy (Jensen et al. 1988; Mattock et al. 1988). Our data showed that type I and type II diabetic subjects with CAD had low HDL-C levels while LDL-C concentrations were normal. In general, consideration of metabolic risk factors for CAD has focused on the role of LDL-C. However,

it is becoming increasingly apparent that CAD can occur in the absence of hypercholesterolemia (Laws and Reaven 1990). In addition, low HDL-C is identified as the increasing risk factor of CAD in diabetes mellitus (Ginsberg 1991; Reaven and Laws 1994). In our study, plasma cholesterol, triglyceride, LDL-C and HDL-C levels were not different in type I diabetes, without complications, compared to control subjects, and this observation is in agreement to previous study (Dullaart 1995).

As far as the vitamins are concerned, we found no alteration in the levels of vitamin C, whereas the levels of vitamin A and E were lower in type I and type II diabetes mellitus with or without complications than control subjects. There have been conflicting reports regarding the plasma vitamin concentrations in diabetes mellitus. Makimattila et al. (1999) reported that plasma vitamin C and E in type II diabetic patients were not significantly different from those in control groups, while vitamin A levels were significantly decreased. On the other hand, Sundarm et al. (1996) reported low levels of vitamin E and C in diabetic patients. In our study, low levels of vitamin A and E could reflect their high utilisation rate, suggesting that these vitamins may be used to reduce oxidative stress in diabetic patients. It is well reported that oxidative stress is induced by both the increases in free radicals and disturbance of the free radical scavenging system in diabetes mellitus (Sinclair 1993; Therond et al. 2000). Alternatively, it is also possible that reduced vitamin A and E concentrations reflect low intake, which resulted in decreased antioxidant defence system in diabetic subjects. On the other hand, high levels of vitamin E were observed in type II diabetic subjects with RF. Increased levels of vitamin E may be related to the well known high serum lipid concentrations in these patients (Bonfont-Rousselot et al. 1997). Taken together, our data provide convincing evidence for altered plasma antioxidants concentrations in diabetic patients, irrespective to their complications. The inverse correlation between Hb A1C and vitamin A and E levels was consistent with the idea that chronic hyperglycemia may increase oxidative stress (Hunt et al. 1990). Vitamin A and E supplementation would provide good metabolic control and benefits in the reduction of diabetes-induced complications. Gokkusu et al. (2001) indicated that vitamin E administration significantly reduced fasting glucose and increased C-peptide and insulin levels in type I diabetic subjects. In addition, vitamin E treatment lowers urinary albumin excretion rate (AER) in type II diabetic patients with micro/macroalbuminuria (Gaede et al. 2001). On the other hand, Zobali et al. (2002) showed that vasomotor activity depends on the prevention and/or inhibition of peroxidative stress which is achieved by combined treatment with vitamin A plus insulin in streptozotocin induced-diabetic rats.

In our study, diabetic subjects showed altered erythrocyte antioxidant enzyme activities. SOD activity was reduced in all the type II, but not type I, diabetic subjects regardless their complications. In contrast, glutathione reductase and peroxidase activities were diminished in type I diabetes but unchanged in type II diabetes, whatever complications were prevalent. Moreover, catalase activity was lower in all diabetic patients compared to controls. Our findings agree with the ob-

servations of Sekeroglu et al. (2000) who have reported decreased erythrocyte SOD activity in type II diabetic patients. Uzel et al. (1987) and Kedziora-Kornatowska et al. (1998) have also shown low SOD and catalase activities in type II diabetics compared to controls. In contrast, Aydin et al. (2001) noticed that SOD activity is elevated while glutathione peroxidase and catalase activities are normal in erythrocytes of type II diabetics. Ruiz et al. (1999) indicated that whereas erythrocyte glutathione peroxidase activity in type I diabetic subjects was decreased, there was no difference in SOD activity compared to control values. The reason why erythrocyte antioxidant enzyme activities were reported so differently in previous studies might be related to the treatment of diabetics related complications and the duration of disease.

Nonetheless, as observed in our study, the poor glycemic control in diabetic subjects is associated with the diminution of protective antioxidant enzyme activities (Maxwell et al. 1997b). Low anti-oxidant enzyme activities render cells vulnerable to oxygen radical attack, and thus increased diabetic complications. These alterations could not be ascribed to associated complications, but seemed to be related to the glycemic control in these diabetic patients. However, the diminution in antioxidant defences may contribute to the development of complications in diabetes mellitus. Therefore, antioxidant status might be used as marker in the management of glycemic control and the development of diabetic complications.

Acknowledgements. This work was supported by the French Foreign Office (International Research Extension Grants 01 MDU 531) and by a financial support from the Algerian Health Investigation Office (ANDRS, No. 02/15/02/00 001).

References

- Aebi H. (1974): Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. H. U. Bergmeyer), 2nd ed., Vol. 2, pp. 673—684, Verlag Chemie GmbH, Weinheim
- Aydin A., Orhan H., Sayal A., Ozata M., Sahin G., Isimer A. (2001): Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin. Biochem.* **34**, 65—70
- Baynes J. W., Thorpe S. R. (1999): Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* **48**, 1—9
- Bonnefont-Rousselot D., Jaudon M. C., Issad B., Cacoub P., Congy F., Jardel C., Delattre J., Jacobs C. (1997): Antioxidant status of elderly chronic renal patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**, 1399—1405
- Courderot-Masuyer C., Lahet J. J., Verges B., Brun J. M., Rochette L. (2000): Ascorbyl free radical release in diabetic patients. *Cell. Mol. Biol. (Paris)* **46**, 1397—1401
- Dullaart R. P. (1995): Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Neth. J. Med.* **46**, 44—54
- Elstner E. F., Youngman R. J., Obwald W. (1983): Superoxide dismutase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. H. B. Bergmeyer), 3rd ed., Vol. 3, pp. 293—302
- Geade P., Poulsen H. E., Parving H. H., Pedersen O. (2001): Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabet. Med.* **18**, 756—760

- Ginsberg H. N. (1991): Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states: relationship to atherogenesis. *Diabetes Care* **14**, 839—855
- Gokkusu C., Palanduz S., Ademoglu E., Tamer S. (2001): Oxidant and antioxidant systems in NIDDM patients: influence of vitamin E supplementation. *Endocr. Res.* **27**, 377—386
- Goldberg D. M., Spooner R. J. (1992): Glutathione reductase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Ed. H. B. Bergmeyer), 3rd ed., Vol. 3, pp. 258—26
- Guemouri L., Artur Y., Herbeth B. (1991): Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin. Chem. (Washington D. C.)* **37**, 1932—1937
- Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H. (1955): The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**, 1345—1353
- Hunt J. V., Smith C. C., Wolff S. P. (1990): Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* **39**, 1420—1424
- Jensen T., Stender J., Deckert T. (1988): Abnormalities in plasma concentrations of lipoproteins and fibrinogen in type 1 diabetic patients with increased urinary albumin excretion. *Diabetologia* **31**, 142—145
- Jones A. W., Winkless J. W., Jennigs P. E., Florkowski C. M., Lunec C., Barnett A. H. (1988): Serum antioxidant activity in diabetes mellitus. *Diab. Res.* **7**, 89—92
- Kaplan L. A., Cline D., Gartside P., Burnstein S., Sperling M., Stein E. A. (1982): Hemoglobin A1 in hemolysates from healthy and insulin-dependent diabetic children as determined with a temperature-controlled mini column assay. *Clin. Chem. (Washington D. C.)* **28**, 13—18
- Kedziora-Kornatowska K. Z., Luciak M., Blaszczyk J., Pawlak W. (1998): Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **13**, 2829—2832
- Laws A., Reaven G. M. (1990): Coronary heart disease in the absence of hypercholesterolemia. *J. Int. Med. Res.* **228**, 415—417
- MacMahon S. W., MacDonald G. J., Blacket R. B. (1985): Plasma lipoprotein levels in treated and untreated hypertensive men and women. The National Heart Foundation of Australia Risk Factor Prevalence Study. *Arteriosclerosis* **5**, 391—396
- Makimattila S., Liu M. L., Vakkilainen J., Schlenzka A., Lahdenpera, S., Syvanne M., Mantysaari M., Summanen P., Bergholm R., Taskinen M. R., Yki-Jarvinen H. (1999): Impaired Endothelium-dependent vasodilatation in type II diabetes. *Diabetes Care.* **22**, 973—981
- Mattock M. B., Keen H., Viberti G. C., El-Gohari M. R., Murrells T. J., Scott G. S., Wing J. R., Jackson P. G. (1988): Coronary heart disease and urinary albumin excretion rate in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* **31**, 82—87
- Maxwell S. R., Thomason H., Sandler D., Leguen C., Baxter M. A., Thorpe G. H., Jones A. F., Barnett A. H. (1997a): Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**, 484—490
- Maxwell S. R., Thomason H., Sandler D., Leguen C., Baxter M. A., Thorpe G. H., Jones A. F., Barnett A. H. (1997b): Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann. Clin. Biochem.* **34**, 638—644
- Paglia D. E., Valentine W. N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158—169

- Pieri C., Testa R., Marra M., Bonfigli A. R., Manfrini S., Testa I. (2001): Age-dependent changes of serum oxygen radical scavenger capacity and haemoglobin glycosylation in non-insulin-dependent diabetic patients. *Gerontology (Basel)* **47**, 88—92
- Reaven G. M., Laws A. (1994): Insulin resistance, compensatory hyperinsulinaemia and coronary heart disease. *Diabetologia* **37**, 948—952
- Roe J. H., Kuether C. A. (1943): The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* **147**, 399—407
- Ruderman N. B., Williamson J. R., Drownlee M. (1992): Glucose in diabetic vascular disease. *FASEB J.* **6**, 2905—2914
- Ruiz C., Alegria A., Barbera R., Farre R., Lagarde M. J. (1999): Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type I diabetes mellitus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **59**, 99—105
- Sekeroglu M. R., Sahin H., Dulger H., Algun E. (2000): The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Biochem.* **33**, 669—674
- Short C. D., Durrington P. N. (1990): Hyperlipidaemia and renal disease. *Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.* **4**, 777—806
- Sinclair A. J. (1993): Free radical mechanisms and vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* **2**, 7—10
- Sundarm R. K., Bhaskar A., Viljayalingam S., Viswanathan M., Mohan R., Shanmugasundram K. R. (1996): Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci.* **90**, 255—260
- Taskinen, M. R. 1997. Triglyceride is the major atherogenic lipid in NIDDM. *Diabetes/Metab. Rev.* **13**, 93—98
- Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Davit-Spraul A., Conti M., Legrand A. (2000): Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **3**, 373—384
- Uzel N., Sivas A., Uysal M., Oz H. (1987): Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* **19**, 89—90
- Zaman Z., Fielden P., Frost P. G. (1993): Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin. Chem. (Washington D. C.)* **39**, 2229—2234
- Zobali F., Besler T., Ari N., Karasu C. (2002): Hydrogen peroxide-induced inhibition of vasomotor activity: evaluation of single and combined treatments with vitamin A and insulin in streptozotocin-diabetic rats. *Int. J. Exp. Diabetes Res.* **3**, 119—130

General Physiology and Biophysics

An International Journal

General Physiology and Biophysics appears quarterly and is devoted to the publication of original research papers concerned with general physiology, biophysics and biochemistry at the cellular and molecular level. The coverage of the journal includes:

- membrane physiology and biophysics (ion channels, receptors, transporters, protein-lipid interactions, surface phenomena, model membranes),
- intercellular and intracellular signalling (neurotransmission, endocrine regulations, messengers, secretory mechanisms, regulatory proteins, calcium signalling pathways, nitric oxide),
- excitability and contractility (neurophysiology, smooth, cardiac and skeletal muscle physiology, excitation-contraction coupling, cellular motility),
- biophysical analysis of cellular function (bioenergetics, volume regulation, thermodynamics, mathematical models),
- metabolic regulations (enzymology, ATPases, plant and microbial metabolism),
- cellular aspects of pharmacology, toxicology and pathology (receptor-drug interaction, the action of drugs and toxins on signalling and regulatory functions, free radicals, lipid peroxidation, ischemic preconditioning, calcium paradox),
- accounts of advances in relevant techniques and methodology.

Minireviews should not exceed 15 pages. *Review* articles will generally be published by invitation only. Theoretical contributions are acceptable as long as they formulate testable hypotheses. *Short communications* will be published as quickly as possible. *Letters to the Editor* with comments on findings published in the journal will be accepted. The language of the journal is English.

Editors

Prof. Viktor Bauer, Institute of Experimental Pharmacology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 16 Bratislava 4, Slovakia. Tel.: +421 2 5477 3586; Fax: +421 2 5477 5928; E-mail: exfabawv@savba.sk
(Pharmacology; Pharmacokinetics; Toxicology; Smooth muscles; Autonomic neurotransmission)

Dr. Jean-Marc Dubois, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette Cedex, France. Tel.: +33 0 169 823 645; Fax: +33 0 169 829 466; E-mail: jmdubois@nbcn.cnrs-gif.fr
(Electrophysiology; Pharmacology; Ion channels; Sodium channels; Potassium channels; Volume regulation; Neuronal cells)

Dr. Vladimír Farkaš, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava 4, Slovakia. Tel.: +421 2 5941 0216 (0295); Fax: +421 2 5941 0222; E-mail: chemvfar@savba.sk
(Plant and microbial metabolism; Cell walls and surface phenomena; Bioenergetics; Intracellular signalling)

Dr. Miloslav Greksák, Institute of Animal Biochemistry and Genetics SAS, Moyzesova 61, 900 28 Ivánka pri Dunaji, Slovakia. Tel.: +421-2-4594-3151; Fax: +421-2-4594-3932; E-mail: ubgzgrek@savba.sk <mailto:ubgzgrek@savba.sk>
(Bioenergetics; Cellular metabolism; Enzymology; Mitochondria, biogenesis, function; Animal physiology and biochemistry; Archaea, metabolism, energetics)

Prof. Tibor Hianik, Department of Biophysics and Chemical Physics, Comenius University, Mlynská dolina F1, 842 15 Bratislava 4, Slovakia. *Tel.:* +421 2 6542 6774; *Fax:* +421 2 6542 5882; *E-mail:* hianik@fmph.uniba.sk

(Biomembranes; Model membranes; Structure, dynamics, function; Protein-lipid interactions; Ionic transport; Thermodynamics; Transmembrane signalling and transduction; Cell surface interactions; Membrane fusion; Biosensors)

Prof. Eilhard Koppenhöfer, H. G. Creutzfeldt-Institut, Rathmannsdorfer Weg 22, 24109 Kiel, Germany. *Tel.:* +49 173 2155451; *Fax:* +49 431 528508; *E-mail:* e.koppenhoefer@web.de

(Excitable membranes; Neuro-pharmacology; Electrophysiological methodology)

Prof. Bernd Nilius, Katholieke Universiteit Leuven, Laboratorium voor Fysiologie, Campus Gasthuisberg, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium. *Tel.:* +32 16 345 937; *Fax:* +32 16 345 991; *E-mail:* Bernd.Nilius@med.kuleuven.ac.be

(Electrophysiology; Excitable cells; Non-excitable cells; Ion channels; Calcium channels; Chloride channels; CFTR; Potassium channels; Ca²⁺-signalling; Endothelium; Myocardial cells; Volume regulation; Nitric oxide)

Dr. Karol Ondriaš, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 5, 833 34 Bratislava 37, Slovakia. *Tel.:* +421 2 5477 4102; *Fax:* +421 2 5477 3666; *E-mail:* umfgonds@kramare.savba.sk

(Biophysical properties of biological membranes; Lipid peroxidation; Free radicals; Calcium signalling; Membrane channels; Excitation contraction coupling)

Prof. Ján Slezák, Institute for Heart Research, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 33 Bratislava 4, Slovakia. *Tel.:* +421 2 5249 4210; *Fax:* +421 2 5477 6637; *E-mail:* usrdslez@savba.sk

(Cardiomyocytes; Ischemia; Ischemic preconditioning; Ultrastructure; Histochemistry; Cytochemistry; Nitric oxide; Oxygen free radicals; Calcium paradox; Necrosis)

Dr. Vladimír Štrbák, Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 3, 833 06 Bratislava 37, Slovakia. *Tel.:* +421 2 5477 2709; *Fax:* +421 2 5477 4247; *E-mail:* vladimir.strbak@savba.sk

(Endocrine system; Metabolism; Cell volume; Osmotic stimuli; Secretory mechanisms; Neurosecretion)

Dr. Ľudovít Varečka, Department of Biochemistry and Microbiology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava 1, Slovakia. *Tel.:* +421 2 5932 5514; *Fax:* +421 2 393 198; *E-mail:* varel@chelin.chtf.stuba.sk

(Membrane structure and properties; Transport processes across cell membranes; Signalling pathways; Ca²⁺ homeostasis; Animal and microbial cells; Molecular biology of transport and signalling processes)

Dr. Attila Ziegelhoffer, Institute for Heart Research, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 33 Bratislava 4, Slovakia. *Tel.:* +421 2 5477 2458; *Fax:* +421 2 5477 6637; *E-mail:* usrdzigy@savba.sk

(Metabolism and metabolic regulations; Membranes; Enzymology; Ionic transport; ATPases; Heart and skeletal muscle cells)

Coordinating Editor

Dr. Branislav Uhrík, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 5, 833 34 Bratislava 37, Slovakia. *Tel.:* +421 2 5477 2111; *Fax:* +421 2 5477 3666; *E-mail:* umfguhrk@savba.sk

Managing Editor

Dr. Albert Breier, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 5, 833 34 Bratislava 37, Slovakia. *Tel.:* +421 2 5477 5266; *Fax:* +421 2 5477 3666; *E-mail:* Albert.Breier@savba.sk

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

A. General

Manuscripts should be submitted in printed form in triplicate (complete with figures and tables) and on a 3.5 inch disk in MS-DOS format to one of the **Editors** (see above) or to the **Editorial Office, General Physiology and Biophysics, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 833 34 Bratislava 37, Vlárská 5, Slovakia.**

Tel: +421 2 593 277 05; *Fax:* +421 2 547 736 66;

E-mail: gpb@savba.sk

Website: <http://www.gpb.sav.sk>

It is presumed that manuscripts have not been published and have not been simultaneously submitted elsewhere.

B. Preparation of manuscripts

1. *Manuscripts* should be in English, typed double-spaced with 2.5 cm margins, and an unjustified right margin. Use a standard 12 point typeface (e.g., Times, Arial, or Courier) throughout the manuscript. Number each page at the bottom. Use hard return only at the end of paragraphs. Do not use any hyphenation to divide words at the right margin. Please take care to distinguish properly between digit "1" and letter "l" (also 0 and O).
2. If you use symbols or special characters the hard copy of the corresponding text file must show exactly how they have to look like. Please supply a list of all symbols or special characters used so that we know exactly what they represent.
3. The text should be arranged under the following headings: Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; and References.
4. For studies that employed animals, indicate whether institutional or National Research Council guidelines were followed. If human subjects were used, indicate whether the procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 or if they were approved by an institutional committee on human experimentation.
5. An *abstract* of not more than 200 words together with up to 5 key words should be submitted on a separate sheet.
6. At the bottom of the title page the postal address to which proofs are to be sent should be given; in addition, the corresponding e-mail address, if available.
7. The *references* should be in alphabetical order on a separate sheet according to the following format:
 - a) *Articles from journals:*
Hodgkin A. L., Huxley A. F., Katz B. (1952): Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* (London) 116, 424—448

b) *Monographs:*

Zachar J. (1971): *Electrogenesis and Contractility in Skeletal Muscle Cells*. University Park Press, Baltimore and London

c) *Chapters from monographs:*

Haggis G. H. (1964): The structure and function of membranes. In: *Introduction to Molecular Biology* (Eds. G. H. Haggis, D. Michie, A. R. Muir, K. B. Roberts and P. M. Walker), pp. 151—192, Longmans, London

Abbreviation of Journal titles should correspond to those used in Current Contents. In case of any doubt the way how the journal quotes itself should be used. Personal communications or unpublished papers should not be included in the list of references. In the text the name(s) of the author(s) should be followed by the year of publication. Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al."

8. *Illustrations:*

- a) *Tables* must include appropriate headings and are to be typed on separate sheets.
- b) *Graphs* and *diagrams* should be in a form suitable for reproduction. If possible, they should be provided also in the form of encapsulated postscript (EPS) files without captions. If grey is used in the graphs, it is necessary to send them as EPS files, as well.
- c) *Halftone photographs* should be arranged in layouts and submitted in the exact size for printing which should not exceed the size of the printed page (126×182 mm). The photographs printed by a laser printer cannot be used in the printing process of the journal. Therefore, their electronic version must be supplied by the author.
- d) *Colour photographs* will be only printed at the discretion of the Editors; the cost of reproduction will be charged to the author.

9. *Figure legends* should be typed on a separate page.
10. *Numerical data* should be expressed in SI units (Système International d'Unités). When expressing concentrations mol/l or mol·l⁻¹ instead of M should be used.
11. Authors are asked to supply a *short title*, which will be printed at the head of the right-hand pages of the article. This running head should be as short as possible.
12. *Short communications* should be limited to six pages without section headings including a maximum of three figures and an Abstract of not more than 100 words.
13. The Editors will not accept a series of papers with the same main title followed by "part I", "part II", etc. Each paper should have its own title.
14. Send your files in Word (saved as RTF) or Wordperfect and, if possible, also in T_EX format.
15. Authors not entirely familiar with English should seek a native English-speaking colleague for advice on correct syntax and word usage. Correct style and word usage, however, are the responsibility of the author(s). Spelling may be British or American, but it must be consistent throughout the text. Manuscripts submitted in poor English may be returned to the author(s) and there will be a delay in publication.
16. All contributions get carefully reviewed by our Field Editors. The final decision whether a specific manuscript may be accepted for publication in **General Physiology and Biophysics** will be made by the Editors. Authors are encouraged to suggest up to three names (including postal address, phone and e-mail address) to be added to our list from which referees will be selected.
17. Thirty reprints will be supplied free of charge. Additional reprints are available, provided the order is received with the corrected proofs.