

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ
الَّذِي أَحْتَسِبُ عَلَى اللَّهِ عَوْنًا
وَأَتُوبُ إِلَيْهِ



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

La lumière de mes yeux et le bonheur de ma vie à mes chers parents pour leurs soutiens durant le long chemin de mes études, qui ont toujours été là pour moi, et

qui ont beaucoup sacrifié pour que j'atteins ce niveau, qu'ils trouvent ici tous mes profonds remerciements, et j'espère qu'ils sont fières de leur fille et que dieu

vous bénisse pour moi.

A l'homme de ma vie Michou ,mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur.

Mon cher frère

Mohad c'est ma fierté, l'homme de la maison après mon père.

Mes chères sœurs Nina,Fati,Mona,Doda,Fifi,Khadra et ses enfants.

Mes adorables Assala,Hadil,Zouzou,Rahma,JijietWadasse.

Tous mes oncles et leurs familles, mes cousines et mes cousins.

Mes chers amisAridje,Wissou,Zahra,Ines,Nedjoua et Noura.

Mon très cher binôme « Imed »et sa famille.

Toute la promotion ACQ (2021/2022).

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

Ahlem ZENIKHRI



Dédicace

Je dédie ce modeste travail de recherche à :

*A mon cher père que Dieu lui fasse miséricorde et le place dans ses havres qui
ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son*

Sacrifice ses conseils et ses encouragements

Ma très chère mère, que j'aime très fort et qui a toujours espéré ma réussite et

qui m'a donné assez d'affection et je prie le dieu de la protéger du mal,

à ma sensible mère, celle que je lui souhaite une longue vie pleine de santé et

de prospérité.

Mes très chers frères « Amine » et « Fouad » qui me servit d'avantage dans

ma vie, je leurs souhaite une vie pleine de joie et de réussite.

Ma sœur « Hiba » qui ma encourage dans mes études afin de réaliser mes

projets, je lui souhaite une belle vie .

A mon Binôme « Ahlem » qui a partagée avec moi les moments difficiles

de ce travail et sa famille.

Imed ZERGET

Remerciements

En premier lieu, nous remercions notre Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force, la patience et la foi qui nous a guidés jusqu'à la réalisation de ce projet.

*Nous remercions très vivement notre promotrice Mme Gougue. **F** d'avoir accepté de nous guider et de nous aider pour avoir toujours eu confiance en nous et pour son soutien. Elle s'est toujours montré à l'écoute et disponible pour réaliser ce modeste travail.*

Un merci pudique aux membres de jury d'accepter de juger notre modeste travail.

A tous nos collègues

Liste des Figures

Figure 1. Structure tridimensionnelle de la catalase... ..	04
Figure 2. Structure tridimensionnelle de la Glutathion peroxydase.....	05
Figure 3. Réaction de dimérisation du glutathion.....	06
Figure 4. Structure tridimensionnelle du superoxyde dismutase.....	07
Figure 5. Structure chimiques des vitamines E.....	08
Figure 6. Structure chimique de la vitamine C	09
Figure 7. Schéma de régénération de la vitamine E à partir de la vitamine C... ..	09
Figure 8. Structure chimique de quelques rétinoïdes... ..	10
Figure 9. Structure chimique des β - carotènes.....	10
Figure 10. Modification du DPPH• lors du transfert électronique	17
Figure 11. Structure chimique du Trolox.....	19
Figure 12. Modification de l'ABTS • lors du transfert électronique.....	20
Figure 13. Modification de l'AAPH• lors du transfert électronique.....	21
Figure 14. Structure chimique de la fluorescéine	21

Liste des abréviations

4HR : 4-Hexyl Resorcinol

ABTS : 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

BHA :ButylHydroxylAnisole

CAT : Catalase

DPPH : 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent d'Acide Gallique

EC : Equivalent de Cathichine

EOA : Espèces Oxygénées Activées

EQ : Equivalent de Quercétine

ERA : Espèces réactives d'Azote

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène ou oxygénées

ES : Extrait Sec

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Potential

GPX :Glutathioneperoxidase

GSH :Glutathionréduit

HO₂ : Radical hydro peroxydyle

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

LDL :Lowdensitylipoprotein ou lipoprotéine de basse densité

LOO : Radical peroxyde d'hydrogène

LOOH : Peroxyde lipidique

LP: Peroxydation lipidique

NO : Oxyde nitrique

NO₂ : Dioxyde de nitrogène

NOS : Nitricoxidesynthase

1O₂ : Oxygène singlet

OG : Gallate d'Octyle

OH : Radical hydroxyle

PG : Gallate de Propyle

PR : Pouvoir réducteur

RO : Radical alkoxy

RO₂ : Radical peroxyde

ROO : Radical peroxy

SOD : Super Oxyde Dismutase

TAC : Totale AntioxidantCapacity

TBHQ : TertiaryButyl Hydro Quinone

THBP : Tri Hydroxy ButyroPhenone

UV : Ultra Viole

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Introduction.....01

Chapitre I: Généralités sur l'oxydation et les antioxydants.

Définitions :

Les radicaux libres	02
Le stress oxydatif	03
Les antioxydants	03

Systèmes antioxydants endogènes

Enzymatiques..... 04

La catalase	04
La glutathion peroxydase.....	05
La superoxyde dismutase	07

Non enzymatiques08

Autres antioxydants

Les vitamines :

- La vitamine E.....	08
- La vitamine C	09
- La vitamine A	10

Les oligo-éléments :

- Le sélénium.....	11
- Le cuivre	11
- Le zinc	11

Les polyphénols..... 12

Modes d'action antioxydant.....	13
Mécanismes d'action des antioxydants	14
Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action	
Classification des antioxydants suivant la nature chimique dans les aliments	
- Antioxydants naturels	15
- Antioxydants synthétiques	15
- Antioxydantssynergiques	15
Toxicité des antioxydants	16

Chapitre II : Evaluation de l'activité antioxydant.

Test DPPH et leur principe	17
Test TEAC et leur principe.....	19
Test ORAC et leur principe	21
Test FRAP et leur principe	22
Test TRAP et leur principe	23
Test à l'hémolyse des globules rougeet leur principe.....	23
La résonance paramagnétique électronique (RPE)et leur principe.....	24
Conclusion	26
Références bibliographiques	27

Les Résumés

Résumé :

L'oxygène est indispensable à la vie. En effet, c'est cette molécule qui permet l'apport d'énergie à l'être humain par son rôle d'accepteur final d'électron au sein de la mitochondrie. Pourtant, elle est fortement impliquée dans l'initiation du stress oxydant qui, bien qu'il soit utile à l'organisme, peut être délétère et entraîner des pathologies variées dans certaines situations. et pour lutter contre ce stress oxydant on est besoin des antioxydants. ou on est largement détailler leurs source naturels et synthétiques dans le chapitre 1 , et on est aussi détailler les différents méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante dans le 2eme chapitre .

Mots clés : Stress oxydant, les antioxydants, les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante .

Abstract :

Oxygen is essential for life, it is a molecule allows the supply of energy , it is considered as the final acceptor of electrons in the mitochondria, oxygene is involved in the initiation of oxidative stress which although it is useful to body, it can be deleterious and lead to various pathologies in certain situations, to fight oxidative stress we need antioxydants which we are largely detailed in the first chapter and we are also detailed the different methods of evaluation of antioxidant activity.

Key words: oxidative stress, antioxydants , methods of evaluation of antioxidant activity.

المخلص:

يعتبر الأكسجين من العناصر الهامة للحياة وهو المستقبل النهائي للإلكترونات في السلسلة التنفسية كما يعتبر أيضا العامل المحرض للأكسدة التي تعتبر مفيدة للجسم غير أنها تحفز ظهور بعض الأمراض في ظل بعض الشروط لذلك ارتأينا في بحثنا هذا تفصيل الأكسدة ومضادات الأكسدة في الفصل الأول وطرق قياس النشاط المضاد للأكسدة في الفصل الثاني.

الكلمات المفتاحية : الأكسدة ، مضادات الأكسدة، طرق قياس النشاط المضاد للأكسدة.

Introduction
Générale

Introduction

*L'*homme a dû faire face à son environnement et a appris à utiliser les ressources naturelles pour subvenir à ses besoins nutritionnels afin d'assurer sa survie et la pérennité de son espèce. apprendre à reconnaître les plantes à caractère bénéfique pour l'organisme et se méfier de celles ayant un effet néfaste est une nécessité naturelle, très développée par l'homme mais également par d'autres espèces animales.

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « **stress oxydant** », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques.

actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, pour combattre ce stress oxydant on a besoin des antioxydants surtout naturels qui se trouvent dans les plantes.

*L'*Algérie, de par sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques, induisant une biodiversité de plantes riches en antioxydants naturels mais la pharmacopée Algérienne est qualifiée de traditionnelle parce que, à la différence des pharmacopées occidentales officialisées en formulaires ou codex, elle n'est pas écrite et s'est perpétuée jusqu'à présent de génération en génération, chez les guérisseurs et les herboristes uniquement par la transmission orale des connaissances et la pratique de l'art médical. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître (**Emberger L, 1971**).

Une manière simple de conserver les cultures, les savoirs et les plantes qui y sont liées consiste à valoriser ces connaissances, les dynamiser, les expérimenter pour vérifier et valider leurs effets supposés qui sont généralement dus aux métabolites secondaires dotés des activités antioxydantes ou la mesure et l'évaluation de ces activités antioxydantes par les différentes méthodes expérimentales leur donner un sens et nous permettons d'intégrer la médecine traditionnelle dans le système de santé moderne.

La présente étude s'inscrit dans cet objectif et elle a porté sur :

- De donner des généralités sur l'oxydation et les antioxydants
- Et déterminer les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Chapitre 01 :

Généralité sur l'oxydation et les antioxydants

Définitions :

- les radicaux libres

L'oxygène, un élément essentiel à la vie, peut être également une source pour la destruction des tissus et / ou de nuire à leur capacité de fonctionner normalement [Ferencik M,1999].

Un radical libre est une espèce capable d'existence indépendante (d'où le terme libre) qui contient un ou plusieurs électrons non appariés [Duracková Z, 1999]. Un électron non apparié est un électron qui occupe une orbitale atomique ou moléculaire par elle-même. Le plus simple des radicaux libres est l'hydrogène atomique. Beaucoup de radicaux libres existent dans les systèmes vivants (certaines mauvaises, certaines bonnes et certaines les deux), bien que la plupart des molécules in vivo sont non radicales.

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène ERO.

La plupart des radicaux libres proviennent de la chaîne respiratoire, du NADPH, et de l'activité de la xanthine oxydase, alors que les espèces réactives du monoxyde d'azote NO sont essentiellement produites par la NO-synthase. La production de radicaux libres est donc largement physiologique : elle est déterminée, dirigée, et utile. Parmi les exemples les plus communs, on peut citer la production de superoxyde pendant la phagocytose, et la libération de NO par l'endothélium, qui constitue un des mécanismes de régulation du tonus vasculaire. Les radicaux libres interviennent aussi dans la signalisation cellulaire.

Bien que physiologique, la production de radicaux libres peut être accidentelle et potentiellement délétère, comme par exemple la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, ou ceux résultant de l'auto-oxydation des catécholamines. Cette production radicalaire est dommageable si elle est prolongée ou incontrôlée, dépassant les capacités de neutralisation de l'organisme. D'autres productions sont anormales, pathologiques, toujours dommageables, et sans objectif physiologique, comme par exemple celles résultant de la fumée de cigarettes, des polluants et de l'ozone [Berger, 2006].

- **Stress oxydatif**

La perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé stress **oxydant** [Bonnefont-Rousselot D, 2002].

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des foetus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, et immunosuppression [Bergendi L., Benes L., Duracková Z., Ferencik M, 1999].

- **les antioxydants**

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaire. Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient [Halliwell et Gutteridge, 1990 ; Sies, 1996].

Les antioxydants agissent de plusieurs manières. Leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydantes, comme dans le cas des éléments traces. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la spirale oxydative (vitamines C et E, NADPH, glutathion), la prévention des dégâts par la mise

à disposition d'électrons (céruloplasmine, vitamine C, superoxyde dismutase, GSHPx), et la réparation des molécules d'ADN (Zn, acide folique, niacine) [Berger, 2006].

L'organisme possède des systèmes endogènes dédiés à cette action protectrice. Cependant, cette ligne de défense est facilement saturée. De nombreux antioxydants exogènes sont également présents dans l'alimentation apportant un soutien significatif dans la lutte antioxydante. Nous les trouvons dans les fruits (pommes, poires, fruits rouges...), les légumes (brocoli, oignon...), les boissons (café, thé, vin...) ainsi que dans les épices, le cacao ou encore les céréales. Ces antioxydants sont surtout connus pour leur capacité à réagir avec les radicaux libres en les « neutralisant » par réaction de réduction.

Les antioxydants sont un groupe hétérogène composé de systèmes antioxydants endogènes, enzymatiques ou non, de vitamines, d'oligo-éléments ou encore de polyphénols[Bonnefont-Rousselot D,2002].

Systèmes antioxydants endogènes :

Enzymatiques :

La catalase :

C'est une enzyme que l'on retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales.

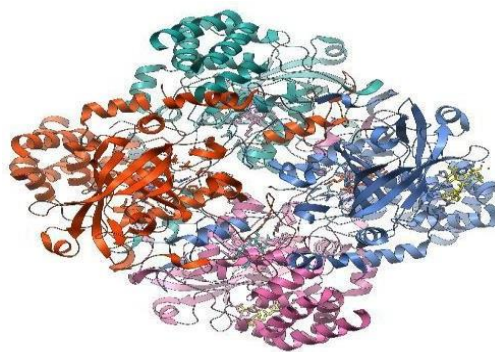
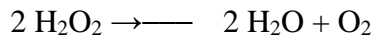
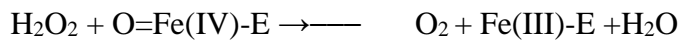
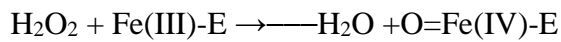


Figure 1. Structure tridimensionnelle de la catalase (Bonnefont-Rousselot D.2002)

Elle catalyse la dismutation de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau.



Cette enzyme est constituée de quatre chaînes polypeptides, comportant chacune un atome de Fer sous forme ferrique (Fe^{3+}). Ces derniers constituent les sites actifs de cette enzyme. Le mécanisme de dismutation du peroxyde d'hydrogène est le suivant :



Sa vitesse de réaction est uniquement dépendante de la vitesse limite avec laquelle les molécules parviennent au site actif de l'enzyme ce qui en fait une des enzymes les plus efficaces connues [Bonnefont-Rousselot D, 2002].

La glutathion peroxydase :

La glutathion peroxydase (GSH-Px) est une enzyme à sélénium ayant la propriété de pouvoir catalyser la réduction des hydroxy peroxydes. Elle se retrouve dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries.

Elle est constituée de 4 sous-unités contenant chacune un atome de sélénium. Il existe 5 isoformes de cette enzyme variant suivant leur localisation dans l'organisme. [Bergendi L., Benes L., Duracková Z., Ferencik M, 1999].

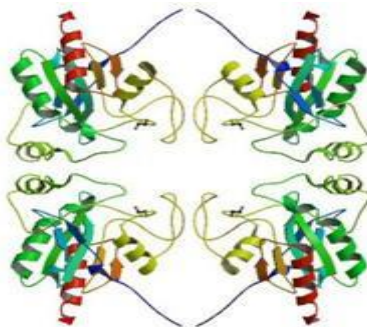


Figure 2. Structure tridimensionnelle de la Glutathion peroxydase (Bergendi L., Benes L., Duracková Z., Ferencik M. 1999)

Cette enzyme constitue la voie majeure de dégradation des hydroperoxydes. Cette fonction antioxydante est d'autant plus importante qu'elle joue un rôle essentiel avec les superoxydes dismutases et la vitamine E. Elle va donc assurer l'équilibre intra et extracellulaire de la balance pro-/antioxydants.

Son activité principale est de permettre l'oxydation du glutathion par réaction de dimérisation avec la formation d'un pont disulfure. Cette réaction conduit à la génération de H₂ pouvant réduire les espèces environnantes [Bergendi L., Benes L., Duracková Z., Ferencik M, 1999].

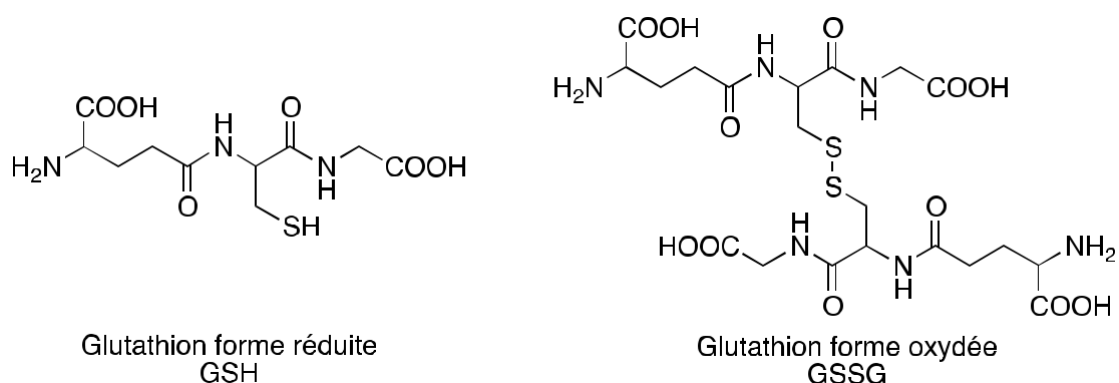
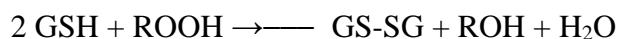


Figure 3. Réaction de dimérisation du glutathion [Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M 2006].

En présence de substrat de type ROOH, la réaction se traduit de la manière suivante avec la formation d'une molécule d'eau et d'une molécule d'alcool.



Le gros avantage de ce système est sa capacité à se régénérer. En effet, sous la dépendance du NADPH via le métabolisme des glucides, le glutathion réduit est capable d'être reformé et ainsi pouvoir être de nouveau disponible [Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, 2006].

La superoxyde dismutase :

La superoxyde dismutase (SOD) est une protéine métallique possédant une activité enzymatique lui permettant de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde O_2^- .

Il existe plusieurs SOD, elles diffèrent par le ou les métaux présent(s) dans sa structure qui va (vont) permettre la liaison enzyme-ligand. Il est important de noter qu'il existe des SOD avec deux types de métaux qui pourront être du Cuivre, du Zinc, du Manganèse et/ou du Fer [Pearl PL., Taylor JL., Trzcinski S., SokohIA. (2007)].

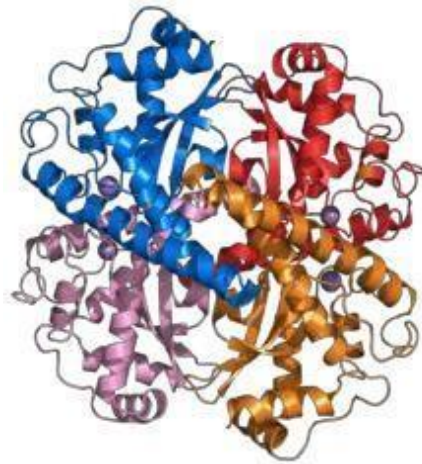
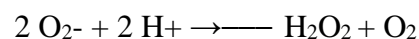


Figure 4. Structure tridimensionnelle du superoxyde dismutase [J Gerontol, 1956].

La réaction chimique catalysée par la SOD nécessite un milieu acide et va permettre d'agir simultanément avec 2 anions superoxydes aboutissant à la formation de dioxygène et de peroxyde d'hydrogène.



La dismutation du radical superoxyde est spontanée, mais l'action de la SOD permet de l'accélérer 10 000 fois.

Chez l'homme il existe trois différentes classes de SOD, catalysant toutes la même réaction : la SOD à cuivre et à zinc que l'on trouve dans le cytosol et au niveau des liquides extracellulaires, la SOD à fer et la SOD à manganèse, dans les mitochondries.

Non enzymatiques :

Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine). Le groupement amine de la cystéine est lié à la fonction acide en γ de l'acide glutamique. La fonction thiol de la cystéine porte les principales propriétés de ce peptide [McCord JM, Fridovich I, 1969].

On le retrouve dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries) soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée (GS-SG). Le rapport de concentration entre ces deux formes est en faveur de la forme réduite, ce qui est nécessaire à l'action antioxydante. Pour être actif, le glutathion ne nécessite pas forcément l'action de la GSH réductase citée ci-dessus. Dans ce cas, la régénération à l'état initial ne sera pas possible.[McCord JM, Fridovich I, 1969].

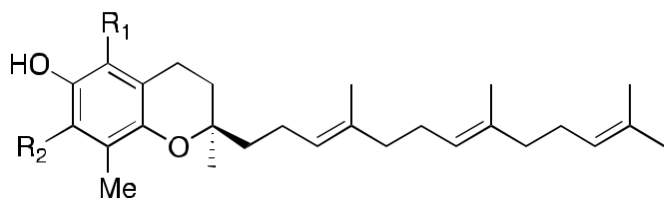
Autres antioxydants :

Notre comportement alimentaire joue un rôle important dans la faculté de l'organisme à lutter contre les effets néfastes du stress oxydant. Les études mettent en évidence les effets bénéfiques d'une alimentation riche en fruit et légumes.

Les vitamines :

- La vitamine E :

La vitamine E est une vitamine liposoluble présente en grande quantité dans les huiles végétales (e.g., l'huile de palme, d'olive et de tournesol). La vitamine E est en réalité formée de huit composés chimiques différents regroupés en deux sous-ensembles en fonction de la présence de groupements de substitution et de doubles liaisons. Nous trouvons donc le sous-ensemble des tocopherols (α -, β -, γ -, ou δ -tocopherol) et des tocotrienols (α -, β -, γ -, ou δ -tocotrienol)[Oxford University Press; 2004].



$R_1 = R_2 = \text{Me}$	α -tocophérol
$R_1 = \text{Me}, R_2 = \text{H}$	β -tocophérol
$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Me}$	γ -tocophérol
$R_1 = R_2 = \text{H}$	δ -tocophérol

Figure 5. Structure chimiques des vitamines E [Tec & Doc Lavoisier; 2007].

Elle va agir comme antioxydant contre les ROS (en parallèle de la vitamine C et du glutathion) et plus particulièrement dans l'inhibition de la peroxydation lipidique. La chaîne carbonée augmente en effet le caractère lipophile de la molécule et ainsi facilite la pénétration dans les bicouches lipidiques, et permet une action directe intracellulaire.

L' α -tocopherol est considéré comme un antioxydant de référence servant d'étalon pour les nouvelles molécules que l'on souhaite évaluer comme antioxydants.

- La vitamine C :

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrophile que l'on retrouve dans de nombreux fruits comme les oranges, les citrons et les fraises. Son caractère hydrophile ne lui permet pas d'avoir une activité intracellulaire. [Kirkwood TB.2005]

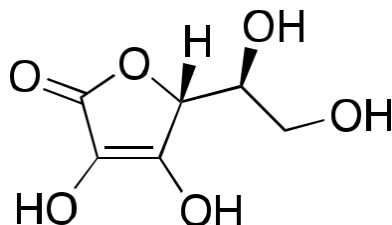


Figure 6. Structure chimique de la vitamine C [Kirkwood TB.2005].

Toutefois la vitamine C est capable de piéger des radicaux libres mais son intérêt majeur en terme de pouvoir antioxydant réside en sa capacité à régénérer la vitamine E au sein de la membrane.

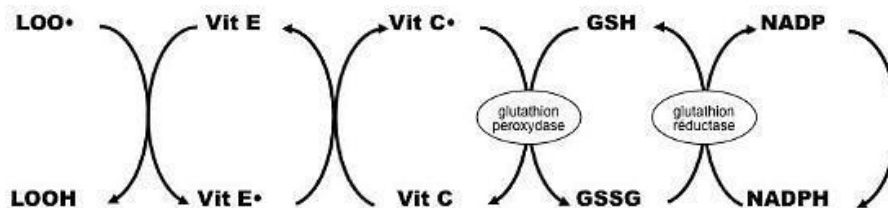


Figure 7. Schéma de régénération de la vitamine E à partir de la vitamine C [Kirkwood TB.2005].

- La vitamine A :

La vitamine A est une vitamine liposoluble que l'on retrouve en grande quantité dans l'organisme surtout au niveau du foie, son lieu de stockage principal. On distingue deux groupes, à savoir les rétinoïdes (rétinol, trétinoïne...) et les provitamines A (principalement les α - et β - carotènes) [Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002)].

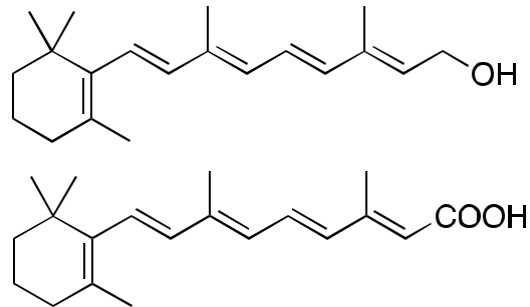


Figure 8. Structure chimique de quelques rétinoïdes [Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002)].

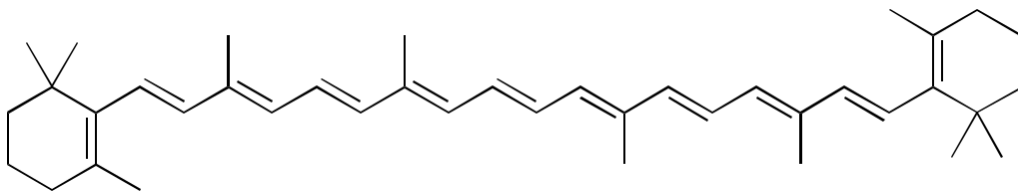


Figure 9. Structure chimique des β - carotènes [Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002)].

Les rétinoïdes vont se retrouver dans les aliments d'origine animale (œufs, lait, viande...). Les provitamines A sont essentiellement contenues dans les végétaux et plus particulièrement la carotte, la citrouille et la patate douce.

Même en l'absence de liaison OH, le β - carotène est un bon antioxydant naturel. Son activité s'explique en partie par ses propriétés lipophiles lui permettant de traverser les membranes cellulaires et en partie par son système π -conjugué permettant d'interagir avec les radicaux libres pour former des adduits. Le β - carotène peut agir comme un inhibiteur de la peroxydation lipidique uniquement à une faible pression partielle en O₂. Il peut être oxydé tout comme un acide gras et ainsi avoir un effet pro-oxydant [Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.1995].

Les oligo-éléments :

Les oligo-éléments se définissent comme une classe de nutriments nécessaires, en quantité très faible, à la vie d'un organisme. L'apport par l'alimentation, en quantité raisonnable, est crucial. En effet, ils n'agissent pas directement contre les ROS (ou Reactive Oxygen Species), mais ils sont nécessaires aux enzymes décrites précédemment. Un apport excessif en oligo-éléments peut entraîner de sérieux dysfonctionnement [Pasquier C. (1995)].

- Le sélénium :

Le sélénium est un oligo-élément constituant des sélénoprotéines dont fait partie le principal antioxydant intracellulaire, la glutathion peroxydase. On le retrouve notamment dans le bœuf et le poisson. Il joue également le rôle de détoxification des métaux lourds comme le cadmium [Pasquier C. (1995)].

- Le cuivre :

Le cuivre est un des cofacteurs essentiels de la SOD (ou La super Oxyde Dismutase) étant donné sa facilité à passer de l'état réduit à l'état oxydé. On retrouve le cuivre surtout dans le foie, les huitres et le chocolat noir.

Néanmoins, il joue également un rôle important dans l'initiation des réactions produisant des ROS de par ses propriétés de métal de transition, tout comme le fer. Une concentration importante en cuivre pourra être le révélateur d'un stress oxydant. Au cours du processus de vieillissement, la concentration sérique en cuivre est amenée à augmenter. En d'autres termes, cet élément peut jouer à la fois le rôle de protecteur ou d'initiateur [Pasquier C. (1995)].

- Le zinc :

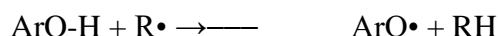
Le zinc est un cofacteur de la SOD. On retrouve le zinc dans les huitres, le foie de veau et la viande de bœuf. Le zinc a également comme fonction de protéger le groupement thiol des protéines. De plus, il peut lutter contre la formation des ROS induite par le fer ou le cuivre. Ainsi l'analyse du rapport des taux sanguins Cuivre/ Zinc permet d'évaluer le stress oxydant d'un individu donné. Il semblerait que les personnes atteintes de maladies

dégénératives aient un rapport Cuivre/Zinc plus élevé que la moyenne. De plus, une carence en zinc est souvent liée à (i) un stress oxydant plus important et à l'apparition de pathologies chroniques [Pasquier C. (1995)].

Les polyphénols :

Les polyphénols représentent une classe de métabolites secondaires. Ils sont très largement représentés dans le règne végétal et donc dans notre alimentation. Nous les consommons sous forme de fruits ou de légumes par exemple. Leur structure comporte un ou plusieurs groupes phénoliques (e.g., un groupement OH greffé sur un noyau aromatique). Leur étude a été croissante ces dernières décennies en raison de leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives. Ils sont également utilisés en agroalimentaire, en cosmétique ou dans l'industrie pharmaceutique comme additifs [J Clin. sept 1967].

Le mécanisme de piégeage des radicaux libres par les polyphénols se fait par le transfert de l'atome d'hydrogène (H-Atom Transfer ou HAT). Le radical libre est réduit par transfert de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant (ArO-H) vers le radical (R') [J Clin Invest. 1967].



Le radical ArO' ainsi formé sera stabilisé par délocalisation des électrons π , par un nouveau transfert d'atome d'hydrogène conduisant à la formation de quinone ou par réaction avec un autre radical libre.

Les polyphénols jouent un rôle important, ils sont capables d'interagir avec les métaux de transition, notamment avec le fer et le cuivre. En effet les ROS sont produits abondamment par réduction d'O₂ par Fe²⁺ ou Cu⁺ aboutissant à la formation de superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et de radicaux oxyde (réaction de Fenton). Ainsi la formation de complexes chélateurs stables et inertes est un mécanisme antioxydant [J Clin. sept 1967].

Modes d'action antioxydant :

Les antioxydants peuvent agir contre la Lip peroxydation de deux façons : soit en protégeant les lipides cibles (les acides gras polyinsaturés ou AGPI) contre les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (ERO) : ion superoxyde, oxygène singulet, $\text{NO}\cdot$ et peroxy-nitrite, produites notamment par les cellules de l'inflammation, soit en empêchant la propagation de la Lip peroxydation une fois qu'un peroxyde d'acide gras (le radical acylperoxy) est apparu. Dans le premier cas, ils fonctionnent comme des pièges à ERO (caroténoïdes, vitamine C, polyphénols). Dans le second cas, ils interrompent directement la chaîne de Lip peroxydation (a-tocophérol) ou participent indirectement à cette interruption (acide ascorbique, polyphénols).

Interruption de la Lip peroxydation Au contact de la molécule d'acide gras peroxydé, le radical acylperoxy (figure 3) est réduit en groupement acylhydroperoxyde plus stable, alors que l'a-tocophérol est oxydé sous forme du radical tocophéroxy. $\text{ROO}\cdot + \text{a-TOH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{a-TO}\cdot$ Celui-ci est régénéré par l'acide ascorbique (ascorbate) qui est à son tour oxydé en déhydroascorbate. $\text{AscO}^- + \text{a-TO}\cdot \rightarrow \text{AscO}\cdot + \text{a-TOH}$ Ces réactions successives d'oxydoréduction ne trouvent en réalité leur terme qu'après régénération du déhydroascorbate en ascorbate par une réductase dépendante du glutathion réduit GSH, processus au cours duquel la forme oxydée du glutathion GSSG apparaît. $\text{AscO}\cdot + \text{Enz.GSH} \rightarrow \text{AscO}^- + 1/2 \text{Enz.GSSG}$ Une réduction de GSSG par la glutathion réductase $\text{Enz}[(\text{SH})_2]$, elle-même réduite par le NADPH issu des premières étapes du cycle des pentoses (G6PDH et phosphogluconate déshydrogénase) intervient finalement : $\text{Enz}[(\text{SH})_2] + \text{GSSG} \rightarrow \text{Enz}[\text{S-S}] + 2 \text{GSH}$ $\text{Enz}[\text{S-S}] + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Enz}[(\text{SH})_2] + \text{NADP}$ $\text{Glucose-6-P} + 2 \text{NADP} \rightarrow \text{Ribulose-5-P} + \text{CO}_2 + 2 \text{NADPH}$ assurant ainsi la poursuite de la régénération de l'acide ascorbique (ascorbate) et, par voie de conséquence, celle de la vitamine E. Cette chaîne de réactions ne fonctionne pas normalement dans la déficience en G6PDH (favisme), ce qui entraîne une accumulation de peroxydes d'acides gras dans les hématies par suite du défaut de régénération du tocophéroxy en tocophérol membranaire, et provoque une anémie hémolytique. En présence du radical acylperoxy, le b-carotène subit une réaction d'oxydation en 5 avec délocalisation du radical sur la chaîne latérale. En présence d'oxygène, la forme terminale est un adduit radicalaire, le radical peroxy $\text{ROO-b-CarOO}\cdot$. En l'absence ou en présence d'une faible pression partielle d'oxygène, la forme époxy apparaît (5,6-époxy-b-Car) avec production concomitante d'un

radical alkoxy $RO\bullet$. En l'absence de substances capables de réduire ces formes radicalaires, les radicaux produits peuvent avoir des effets délétères sur les structures cellulaires. Contrairement au b-Car, il ne semble pas que la vitamine E donne lieu à la formation d'un adduit en présence d'un acylperoxy, même si chimiquement un adduit en position 8a du chromanol a été décrit, la tocophérone 8a-acylperoxy- α -T=O, qui se dégrade finalement en α -tocophérol quinone . Une telle différence de comportement pourrait être attribuée à la position de ces molécules dans leur milieu lipidique naturel, la membrane. Rappelons en effet que l' α -tocophérol occupe une position qui le rend aisément régénérable à l'interface huile-eau, alors que par suite de l'absence de groupements hydrophiles, le b-carotène reste enfoui dans la membrane. Mais cette explication n'est pas entièrement satisfaisante pour le b-carotène (voir plus loin le cas des formes oxydées réversibles). Pour des raisons thermodynamiques, le b-carotène est par ailleurs un excellent piège pour l'oxygène singulet 1O_2 , une forme d'oxygène physiquement activée qui apparaît pour l'essentiel lors de l'exposition aux rayons solaires. En présence de 1O_2 , ou par suite de l'absorption directe d'un photon en présence d'oxygène, le radical b-Car \bullet est produit et se

Interactions des antioxydants [Bonnefont-Rousselot D ,2002].

Mécanismes d'action des antioxydants :

Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action :

Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation :

- Soit intercepter les radicaux libres responsables de la réaction en chaîne.
- Soit éviter la décomposition des hydroperoxydes dans les radicaux libres.

Ces deux options fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire selon leur mécanisme d'action (ROLLAND, 2004).

Classification des antioxydants suivant la nature chimique dans les aliments :

Les antioxydants sont classés dans trois catégories différentes (naturelles, synthétiques et synergiques) (PELLI et LYLY, 2003).

- Antioxydants naturels :

Les antioxydants naturels sont présents dans presque toutes les plantes, tous les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Le groupe le plus important d'antioxydants naturels comprend la vitamine E (tocophérol), les flavonoïdes et autres composés végétaux (PELLI et LYLY, 2003)

Antioxydants synthétiques :

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques. Dans l'industrie alimentaire, l'ajout d'antioxydants naturels dans les aliments est une technique complètement nouvelle. Depuis à peu près 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants, ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs. Toutefois, le fait de trouver communément une substance dans un aliment ne constitue pas une garantie de son absence totale de toxicité. Les antioxydants synthétiques ont été testés quant à leurs effets carcinogènes ou mutagènes, mais de nombreux constituants naturels des aliments n'ont pas encore été testés (PELLI et LYLY, 2003)

Antioxydants synergiques :

Les antioxydants synergiques sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence des autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés, de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chantants. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées.

Toxicité des antioxydants

Les antioxydants sont des molécules en général faiblement toxiques. Pourtant, pour certains d'entre eux, leur utilisation à forte dose n'est pas dénuée de danger. Par exemple, le radical α -tocophérol (α TO.) stabilisé par mésomérie, peut initier des réactions d'oxydation avec les acides gras mono et poly- insaturés des phospholipides membranaires (LH, LOOH) à l'origine de radicaux libres, et peut ainsi contribuer à la phase de propagation des réactions radicalaires survenant dans la peroxydation lipidique.

Ce rôle prooxydant de α -tocophérol en tant qu'initiateur des réactions radicalaires n'est néanmoins possible que si le radical α -tocophéryl est présent en forte concentration dans les membranes et que la vitamine C n'assure pas sa régénération (**PASTRE et PRIYMENKO, 2007**).

*Chapitre 02 : les
méthodes d'évaluation
de l'activité
antioxydante*

Depuis ces dernières décennies, les tests d'évaluation de l'activité antioxydante ont été largement développés pour évaluer l'efficacité de nouveaux composés. De nombreuses méthodologies sont disponibles, permettant d'évaluer les différents aspects physico-chimiques du potentiel antioxydant dans différentes conditions. Dans cette section, les méthodes expérimentales les plus répandues seront décrites ainsi que les nouvelles méthodes dites théoriques.

Test DPPH :

Le DPPH• (ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical stable à température ambiante et de couleur bleue caractéristique. Sa stabilité provient de la haute délocalisation des électrons π le long de la molécule. Il est un des premiers radicaux à avoir été utilisé pour étudier la relation structure/activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. Sa particularité provient de la modification de ses propriétés d'absorption UV/Visible selon son état : la forme réduite (e.g., après ajout d'électron) absorbe à 515-518nm alors que sa forme oxydée ne présente pas de pic d'absorption.

L'efficacité d'un antioxydant peut être mesurée par sa capacité à réduire le radical. Ceci s'observait historiquement par le changement de couleur allant du bleu-violet (forme oxydée) au jaune (forme réduite) [Bonnefont-Rousselot D,2002].

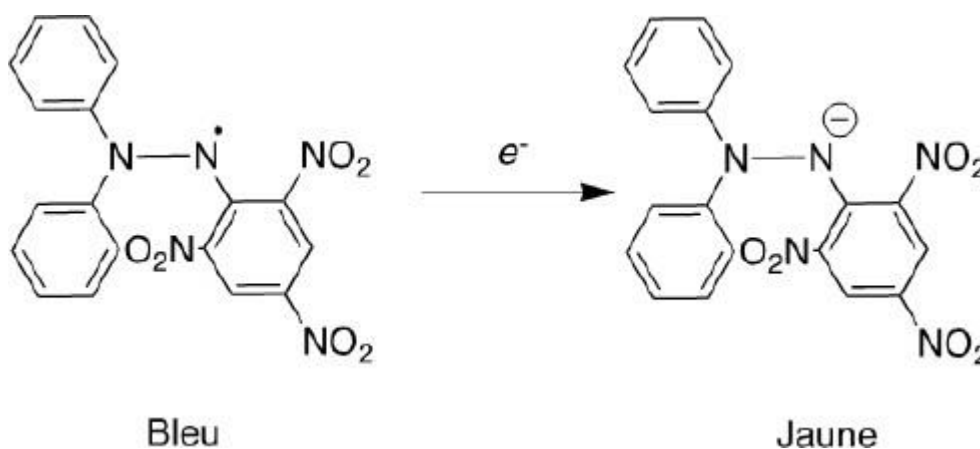


Figure 10. Modification du DPPH• lors du transfert électronique [Bonnefont-Rousselot D, 2002].

Cette propriété peut dorénavant être quantifiée par spectroscopie UV/Visible en se focalisant sur l'absorption à 515-518 nm. Ce test est encore fréquemment utilisé pour évaluer le potentiel antioxydant de poly phénols. Un avantage indéniable de ce test est qu'il permet

Également d'évaluer la cinétique de piégeage. Pour cela, il suffit d'évaluer l'augmentation d'absorption à 515-518 nm en fonction du temps.

Le mécanisme de piégeage du DPPH reste encore relativement controversé entre le transfert d'atome d'hydrogène concerné et le transfert électronique. Le piégeage des radicaux libres a été décrit ci-dessous comme pouvant suivre deux types de mécanismes. D'une part, le transfert d'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle présenterait une cinétique rapide comme dans le cas de certains acides et dérivés phénoliques. D'autre part, le transfert d'électron aurait une cinétique lente comme montré dans le cas de dérivés glycolyses et des anthocyanes. Cette discrimination de la cinétique en fonction du type de piégeage reste néanmoins à considérer avec prudence. En effet, il a été récemment montré que les cinétiques de transfert d'électron sont généralement plus rapide que celles d'un transfert d'atome [**Beaudeau J-L, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Peynet J(2006)**].

Il est important de noter que dans le cas des poly phénols, la capacité à piéger les radicaux libres est tributaire des conditions expérimentales. De nombreux facteurs vont influencer le potentiel antioxydant comme le rapport antioxydant/DPPH• ou le pH. Pour évaluer l'activité antioxydant, deux approches sont utilisées : d'une part, la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction.

- Principe de test DPPH

Le radical DPPH⁺ (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) est stable à température ordinaire et présente une couleur bleue bien caractéristique. Les antioxydants présents dans l'échantillon le réduisent entraînant une décoloration facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm..La méthode est généralement standardisée par rapport au Trolox[**Richard MJ, Belleville F, Chalas J, Ceballos-Picot I, Vitoux D, Boyer MJ ,1997**)].

Test TEAC :

La méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) permet de mesurer la capacité d'un candidat à piéger le radical cation ABTS•+ (obtenu à partir de sels d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La particularité de cette méthode est l'aspect compétitif puisque la mesure sera comparé la capacité d'un antioxydant de référence le

Trolox(63). Il est important de noter que le Trolox est un analogue chimique de la vitamine E[Christen .Y1988].

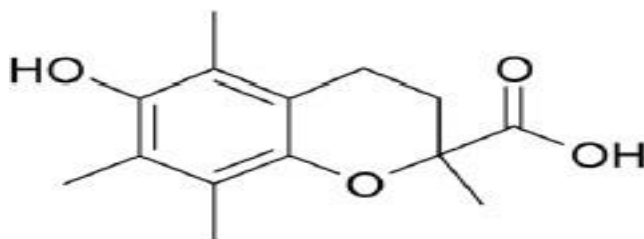


Figure 11. Structure chimique du Trolox[Christen .Y1988].

Le test TEAC est également une méthode colorimétrique où une décoloration de la solution bleue-verte contenant $ABTS^{\bullet+}$ sera observée lors de la formation de $ABTSH^+$ (couleur bleue à verte). Cette décoloration pourra également être quantifiée par spectrophotométrie (Absorption UV/Visible) à 734 nm. La valeur TEAC obtenue par ce test correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la concentration unitaire du composé à tester. C'est une méthode, tout comme le DPPH, conceptuellement facile à mettre en place puisque seuls les réactifs et un spectrophotomètre sont nécessaires. Elle est, de plus, rapide et se corrèle bien avec des tests biologiques. En revanche, l'inconvénient majeur de cette méthode relève de l'instabilité des radicaux $ABTS^{\bullet+}$. Ces derniers doivent être générés extemporanément à partir de sels d'ABTS et la mesure doit être faite assez rapidement [McCord JM, Fridovich I (1968–1988)].

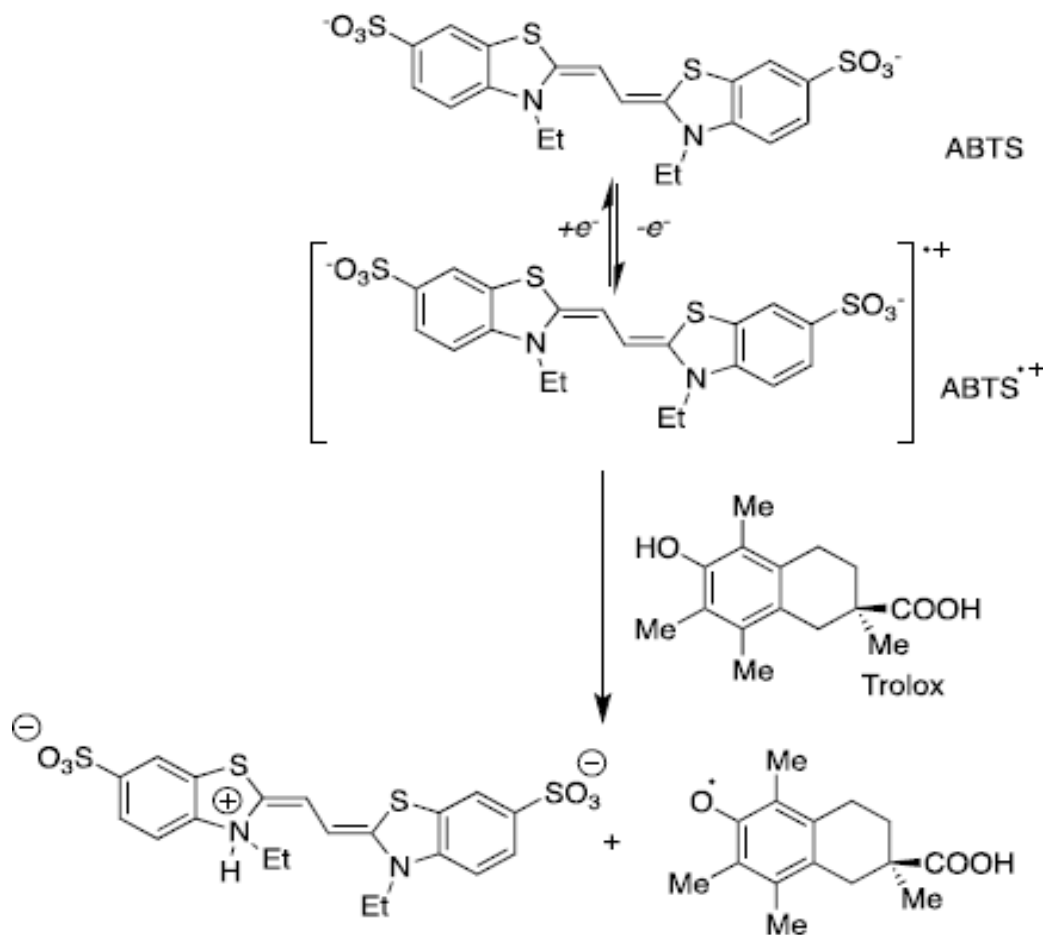


Figure12. Modification de l'ABTS • lors du transfert électronique.[Fabre G, Bayach I, Berka K, Paloncýová M, Starok M, Rossi C, et al (2005)].

- Principe de test TEAC

En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical $ABTS^{\bullet+}$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants. La méthode est généralement standardisée par rapport au Trolox[Fabre G, Bayach I, Berka K, Paloncýová M, Starok M, Rossi C, et al ,2005].

II.3 Test ORAC :

Le test ORAC (Oxygène Radical Absorbance Capacité) est une méthode de mesure de la capacité antioxydante des échantillons biologiques *in vitro*. Cette méthode mesure la dégradation oxydative d'une molécule fluorescente après ajout d'un générateur de radicaux libres, le 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPH). La dégradation thermique de cette molécule en présence d'oxygène va provoquer la génération de radicaux libres de façon régulière qui vont pouvoir attaquer la membrane des globules rouges.

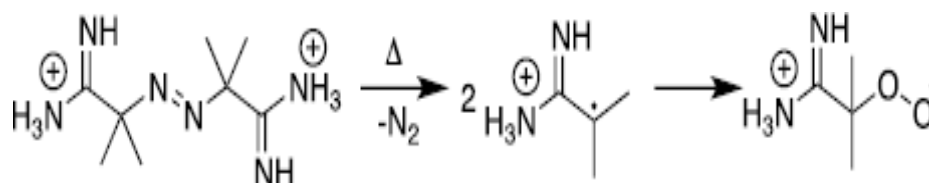


Figure 13. Modification de l'AAPH• lors du transfert électronique. [Mezzetti A, Pierdomenico SD, Costantini F, Romano F, De Cesare D, Cuccurullo F, *et al*, 1998].

Deux systèmes révélateurs sont fréquemment utilisés : la fluorescéine et la \square - phycoérythrine. La dernière est particulièrement pertinente des tests *in vitro* puisque c'est une fluor protéine.

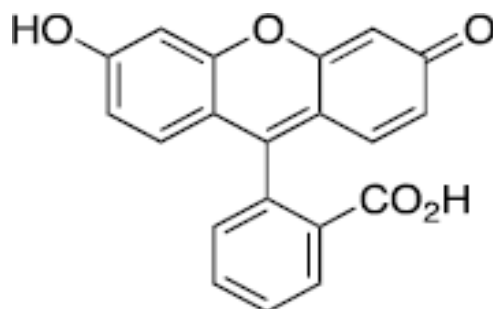


Figure 14. Structure chimique de la fluorescéine [Kampa M, Alexaki V-I, Notas G, Nifli A-P, Nistikaki A, Hatzoglou A, 2004].

Le principe est basé sur la mesure de la baisse de fluorescence. La génération de radicaux libres dégrade la molécule optiquement active, qui perd alors sa propriété à émettre, et ainsi aboutit à une perte de fluorescence du milieu. L'ajout de composés antioxydants efficaces devrait permettre le piégeage des radicaux libres et protéger la molécule fluorescente. Le milieu sera alors analysé 35 minutes après l'ajout du générateur de radicaux libres par spectrofluorimétrie,

permettant de relier l'intensité de fluorescence à la concentration présente dans le milieu [Kampa M, Alexaki V-I, Notas G, Nifli A-P, Nistikaki A, Hatzoglou A, 2004].

Ce test permet également de suivre la cinétique de piégeage ainsi que la consommation des antioxydants testés. Tout comme le TEAC, les résultats seront comparés à ceux du Trolox.

L'avantage principal de cette méthode est la capacité d'évaluer dynamiquement les capacités antioxydantes de composés. Elle permet notamment de déceler une latence d'action. Ce point est particulièrement intéressant pour étudier des extraits végétaux, aliments ou des compléments alimentaires contenant plusieurs antioxydants à action rapide et à action retardée, ces effets combinés ne pouvant que difficilement être prédits [Kampa M, Alexaki V-I, Notas G, Nifli A-P, Nistikaki A, Hatzoglou A, 2004].

Cette méthode a également des inconvénients. Elle ne va mesurer l'activité antioxydante que sur des radicaux peroxydes. De plus, il n'y a pas de corrélation évidente entre les résultats obtenus avec cette méthode et la consommation d'aliments réputés contenir des antioxydants. Une vaste gamme de molécules et d'extraits végétaux a été testée par cette méthode aboutissant au recueil d'un nombre très important de données. Toutefois il est difficile de corréler les données *in vitro* avec des résultats physiologiques *in vivo*. Les aliments ayant eu les meilleurs résultats avec cette méthode sont le pruneau, les haricots et les myrtilles.

-Principe de test ORAC

Cette méthode mesure la dégradation de la fluorescéine (FL: 3',6'-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-3-one]) induite par la décomposition thermique (37°C) de l'AAPH (2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride) en deux radicaux libres. La présence d'antioxydants dans l'échantillon en retarde la dégradation. La réaction est standardisée par rapport à des concentrations connues de Trolox connu pour son activité antioxydante [Lavoisier; 2009].

Test FRAP :

Le test FRAP (ou Ferrique Reducing Ability of Plasma) est une méthode basée sur le changement de coloration lors de la réduction du fer, e.g., de l'ion ferrique (Fe^{3+}) à l'ion ferreux (Fe^{2+}) par transfert d'électrons. Cette réduction se fait en présence d'un antioxydant. De par la nature de la réaction de réduction, l'antioxydant doit présenter une capacité de donneur d'électron. Le

transfert d'atome d'hydrogène ne sera pas le mécanisme privilégié. L'absorbance est mesurée à 593 nm [Momtaz K, Fitzpatrick TB ,1998].

Ce test est peu coûteux, simple, reproductible et rapide. Toutefois il n'est pas capable d'évaluer l'activité antioxydante des thiols (SH), incluant donc les polypeptides et les protéines à groupement cystéine.

-Principe de test FRAP

Les antioxydants sont déterminés par colorimétrie. Le complexe ferrique-tripyridyltriazine est réduit en la forme ferreux-tripyridyltriazine en présence d'antioxydants; le complexe perd sa couleur jaune pour un bleu foncé. Cette coloration mesurée à 595 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants présents dans les échantillons. La méthode est standardisée par rapport au Trolox[Momtaz K, Fitzpatrick TB (1998).].

Test TRAP :

Ce test TRAP (ou TelomericRepeat Amplification Protocol) est spécifique de l'action des antioxydants sur les radicaux peroxydes ROO•. Ces radicaux vont être produits par des générateurs de radicaux libres. Pour ce test, le BAP [2,2-azo-bis(2-amidinopropane) chlorhydrate] ou le AAPH [2,2'-azobis(2- amidinopropane)] seront utilisés[J Nutr , 2003].

-Principe de test TRAP

Cette méthode permet de quantifier les antioxydants non enzymatiques (glutathion...) ainsi que de mesurer la capacité antioxydante du plasma et du sérum. En revanche, cette méthode se base sur le fait que chaque antioxydant possède un temps de latence avant son action. Ainsi la corrélation avec d'autres méthodes d'évaluation est particulièrement compliquée.

II.6 Test à l'hémolyse des globules rouges :

Ce test consiste à prélever sur de l'EDTA (ou Éthylène Diamine Tétra-Acétique) du sang qui sera ensuite être centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes afin d'extraire un culot de globules rouges. Ce culot sera lavé puis mis en contact avec le générateur de radicaux libre AAPH à 37°C[J Nutr, 2003].

Quand les antioxydants endogènes seront consommés, les radicaux libres agiront alors sur les parois des érythrocytes entraînant alors leur éclatement. L'hémoglobine sera alors reléguée dans le milieu. Ce phénomène d'hémolyse sera suivi par spectrophotométrie à 545nm. Si dans le milieu sont présents des composés à activité antioxydante, l'hémolyse sera logiquement retardée. Cette méthode nécessite un étalonnage en utilisant la vitamine C comme référence [J Nutr , 2003].

- Principe de test à l'hémolyse des globules rouges

Du sang prélevé sur EDTA est centrifugé à 3000 t/min pendant 10 minutes et le culot de globules rouges résultant est lavé avec du liquide physiologique (NaCl 0,9%). Le culot de globules est ensuite mis en contact à 37 °C avec du AAPH(2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride). La décomposition thermique de ce composé génère des radicaux libres à vitesse constante qui attaquent la membrane des globules rouges (Int J Vitam NutrRes 75 : 11-18, 2005). Lorsque les antioxydants endogènes sont consommés, la membrane des globules rouges éclate et de l'hémoglobine se retrouve dans le surnageant. Le suivi de l'hémolyse se fait par spectrophotométrie à 545 nm. L'ajout dans le milieu d'incubation de molécules ou d'extraits à activité antioxydante retarde l'apparition de l'hémolyse. La méthode est standardisée par rapport à l'Acide Ascorbique [Gutteridge J., Halliwell PB., 1993].

II.7 La résonance paramagnétique électronique (RPE)

Cette méthode est une technique très utilisée pour visualiser directement les radicaux libres que ce soit in vitro ou in vivo. Elle suit le même principe que la résonance magnétique nucléaire, à savoir l'absorption et la réémission d'énergie provenant d'un rayonnement électromagnétique extérieur.

Les radicaux libres se caractérisent par la présence d'un électron libre, qui par son mouvement de spin, va produire un champ magnétique. Si le radical se trouve dans un champ magnétique extérieur puissant et dirigé, il en résultera une absorption d'énergie qui pourra être visualisée sous la forme d'un spectre. Plus la quantité de radicaux libres présents dans le milieu sera importante, plus l'absorbance sera grande. Cette méthode est idéale pour évaluer les emballements de processus oxydatif. Par exemple, l'inhibition de la peroxydation lipidique par des antioxydants est aisément quantifiable. Un antioxydant enrayera rapidement la phase de

propagation empêchant la formation de nouveaux radicaux. Un autre exemple est la quantification de production d'oxygène singulet dans le milieu. Pour la quantification du radical anion superoxyde, la méthode est fréquemment calibrée en utilisant l'efficacité de superoxyde dismutase (SOD)[**J Nutr,2016**].

- Principe de la résonance paramagnétique électronique (RPE)

Les radicaux libres sont caractérisés par la présence d'un électron libre qui, en tournant sur lui-même comme une toupie, induit un champ magnétique. Si le radical libre est placé dans un champ magnétique produit par deux puissants aimants (appareil JEOL FR30), il en résultera une absorption d'énergie qui pourra être visualisée sous la forme d'un spectre. Des piègeurs de radicaux libres (spin trap) sont toutefois nécessaires pour augmenter la durée de vie du radical

Produit par des systèmes chimiques (réaction de Fenton → radical hydroxyle) ou biochimiques (xanthine/xanthine oxydase → anion superoxyde).

L'intensité du signal obtenu sera directement proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents dans l'échantillon biologique analysé, de sorte qu'il est possible d'obtenir une mesure quantitative de la production de radicaux libres. Pour le radical anion superoxyde, la méthode est calibrée par rapport à de la superoxyde dismutase (SOD). Par cette méthode, il est également possible d'étudier la formation de radicaux libres de type lipidique[**J NutrHealthAging. 2016**].

Conclusion générale

Conclusion

Le stress oxydant est un paradoxe en soi. Initialement conçu pour défendre l'organisme, la balance pro-/antioxydant est un équilibre fragile. L'appréhension de ce phénomène est d'autant plus difficile par sa dimension ubiquitaire et non sélective : un prooxydant puissant attaque tout ce qui l'entoure sans distinction. La supplémentation en antioxydants peut s'avérer donc nécessaire plus particulièrement pour les populations ayant une alimentation mal équilibrée. La « malbouffe » devient un phénomène de plus en plus préoccupant dans les pays occidentaux de nos jours. Les antioxydants se retrouvent naturellement dans bon nombre de fruits, légumes, boissons et graines, et les modifications des habitudes alimentaires font apparaître des carences de plus en plus fréquentes. Il est important de noter que les besoins naturels en vitamines et oligoéléments représentent de faibles quantités tant leurs concentrations efficaces dans l'organisme se situent dans une fourchette étroite. Ainsi, une sur-supplémentation en ces éléments n'améliore pas nécessairement l'état de santé des individus, voire même pourrait être délétère dans certains cas. Tout est, une nouvelle fois, une question d'équilibre. Par ailleurs, les antioxydants sont, à raison, très largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire et cosmétologique à des fins de conservateurs. Le réservoir naturel de ces substances en fait un matériel quasi inépuisable, il s'agit pour la plupart de molécules naturelles ou hémisynthétiques. Cependant une certaine prudence est de mise quant à l'utilisation de ces substances. Il ressort de certaines études un pouvoir potentiellement délétère de ces produits s'ils sont utilisés de façon excessive ou inappropriée. Récemment, de nombreux scandales ont émergés car les antioxydants puissants utilisés ont présenté un éventuel pouvoir cancérigène ainsi que de possible troubles hormonaux. Un cadre de réglementation est donc nécessaire afin d'encadrer plus strictement leur utilisation. Le développement de nouvelles molécules (ou cocktails) antioxydant(e)s dans le domaine de la santé est tributaire de l'avancée des connaissances sur le rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de certaines maladies telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Tous les domaines scientifiques sont concernés et doivent travailler conjointement, afin de prédire une efficacité maximum mais également anticiper les effets secondaires. La recherche en nouveaux antioxydants est donc plus que jamais un problème d'actualité.

Les

Références bibliographiq

ues

Les références bibliographiques

1. **Bergendi L., Benes L., Duracková Z., Ferencik M. (1999).** Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999;65(18-19):1865-74.
2. **Bonnefont-Rousselot D. (2002).** Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* sept 2002;5(5):561-8.
3. **Bonnefont-Rousselot D. (2004).** The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol.* 2004;3(1):41-52.
4. **Biesalski HK, Böhles H, Esterbauer H, Fürst P, Gey F, Hundsdörfer G. (1997).** Antioxidant vitamins in prevention. Consensus statement. *Clin Nutr.* 1997; 16: 151-5.
5. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30.
6. **Beaudeau J-L, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Peynet J (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-Anal Biol Spéc.* juin 2006;21(3):144-50.
7. **Christen Y. (2000).** Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* févr 2000;71(2):621S - 629S.
8. **Chen D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, Li L. (2004).** Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1 sept 2004;9:2618-31.
9. **Dizdaroglu M. (1992).** Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.* 1 sept 1992;275(3):331-42.
10. **Delattre J. (2007).** Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques. Londres; Paris; New York: Tec & Doc Lavoisier; 2007.
11. **Del Corso L, Pastine F, Protti MA, Romanelli AM, Moruzzo D, Ruocco L. (2000).** Blood

zinc, copper and magnesium in aging. A study in healthy home-living elderly.

12. DESMIER Thomas.(2000). | Thèse d'exercice | Université de Limoges | mars 2016
78Panminerva Med. déc 2000;42(4):273-7.

13. Frei B., Stocker R., Ames BN.(1988).Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. déc 1988;85(24):9748-52.

14. Fabre G., Bayach I., Berka K., Paloncýová M., Starok M., Rossi C.(2015).Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. Chem Commun. 21 avr 2015;51(36):7713-6.

15. Fabre G, Bayach I, Berka K, Paloncýová M, Starok M, Rossi C, et al (2005). Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. Chem Commun. 21 avr 2015;51(36):7713-6.

16 .Gutteridge JMC., Halliwell PB.(1993). Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Consequence. Free Radic Res Commun. 1 janv 1993;19(3):141-58.

17. Jomova K., Valko M.(2011).Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology. 10 mai 2011;283(2-3):65-87.

18. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM.Oxidative stress in health and disease.

19. Harman D. Aging.(1956).A theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. juill 1956;11(3):298-300.

20. Holmes B., Page AR., Good RA. (1967).Studies of the Metabolic Activity of Leukocytes from Patients with a Genetic Abnormality of Phagocytic Function*. J Clin Invest. Sept 1967;46(9):1422-32.

21. Higdon J. (2003).Antioxidant Vitamins and Health: Cardiovascular Disease, Cancer, Cataracts, and Aging by Claude Fernand Bourgeois, 2003, 306 pages, hardcover, \$72. HNB

22. Halliwell B., Gutteridge JMC.(1990). The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990 ; 280 : 1 – 8.

- 23. Kirkwood TB.(2005).** Understanding the odd science of aging. *Cell*. 25 févr 2005;120(4):437-
- 24. Kaplan M., Aviram M., Hayek T.(2012).** Oxidative stress and macrophage foam cell formation during diabetes mellitus-induced atherogenesis: Role of insulin therapy. *Pharmacol Ther*. nov 2012;136(2):175-85.
- 25. Kampa M, Alexaki V-I, Notas G, Nifli A-P, Nistikaki A, Hatzoglou A2004,** et al. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res*. 2004;6(2):R63-74.
- 26. Košinová P., Gažák R., Duroux J-L., Lazzaroni R, Křen V., Assfeld X.(2011).** Dimerisation process of silybin-type flavonolignans: insights from theory. *Chemphyschem Eur J Chem Phys Phys Chem*. 18 avr 2011;12(6):1135-42.
- 27. Laliberté J., Labbé S.(2008).** The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast]. *Médecine Sci MS*. mars 2008;24(3):277-83.
- 28. Litwinienko G., Ingold KU.(2007).** Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. *Acc Chem Res*. mars 2007;40(3):222-30.
- 29. McCord JM., Fridovich I.(1988).** Superoxide dismutase: The first twenty years (1968–1988). *Free Radic Biol Med*. 1 janv 1988;5(5):363-9.
- 30. Mezzetti A., Pierdomenico SD., Costantini F., Romano F., De Cesare D., Cuccurullo F.(1998).** Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*. oct 1998;25(6):676-81.
- 31. McCord JM, Fridovich I (1968–1988).** Superoxide dismutase: The first twenty years (1968–1988). *Free Radic Biol Med*. 1 janv 1988;5(5):363-9.
- 31. Oxygen.(2004).** The Molecule that Made the World. Oxford; New York: Oxford University Press; 2004. 384 p.
- 32. Orgogozo JM., Dartigues JF., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R.** Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the

- 33. Pearl PL., Taylor JL., Trzcinski S., SokohIA. (2007).** The pediatric neurotransmitter disorders. *J Child Neurol.* mai 2007;22(5):606-16.
- 34. Pasquier C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Rev Fr Lab.* juin 1995;1995(276):87-92.
- 35. Richard MJ., Belleville F., Chalas J., Ceballos-Picot I., Vitoux D., Boyer MJ.(1997).** Les glutathion peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique. *Ann BiolClin (Paris).* 24 avr1997;55(3):195-208
- 36. Russo-Marie F. (1998).** L'inflammation. John LibbeyEurotext; 1998.580 p.
- 37. Richard MJ, Belleville F, Chalas J, Ceballos-Picot I, Vitoux D, Boyer MJ (1997), et al.** Les glutathion peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique. *Ann Biol Clin (Paris).* 24 avr 1997;55(3):195-208
- 38. Souza HP., Laurindo FR., Ziegelstein RC., Berlowitz CO., ZweierJL.(2002).** Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity controlSohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free RadicBiol Med.* 1 sept 2002;33(5):575-86.
- 39. Serge Przedborski DD. (1996).** Brain superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* Ann Neurol. 1996;39(2):158-65.
- 40. stereoselective biomimetic synthesis of oligostilbenoid dimers from resveratrol analogues: influence of the solvent, oxidant, and substitution.** *ChemWeinhBergstr Ger.*2008;14(36):11376-84.
- 41. The therapeutic potential of Nrf2 activation.** *Mol Aspects Med.* août 2011;32.