

Université Frères Mentouri, Constantine (UFMC)

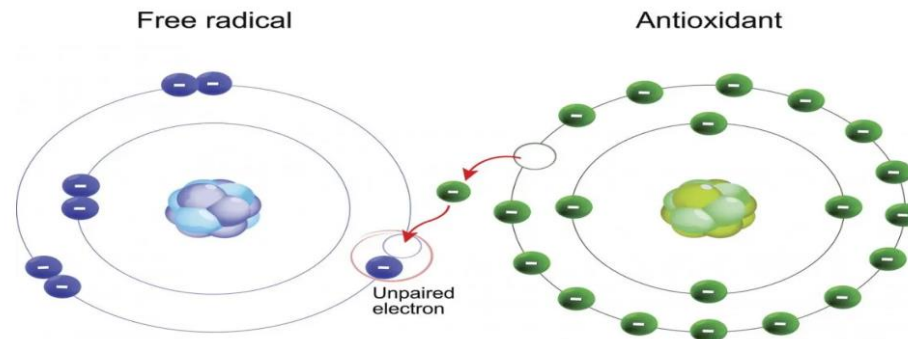
Institut de la Nutrition, Alimentation et Technologie Agro-Alimentaires

(I.N.A.T.A-A)

MOLÉCULES À INTÉRÊT FONCTIONNEL

COURS SUR L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Master 1 Biotechnologie Alimentaire



OBJECTIFS

- Le cours sur l' « *activité antioxydante* » vise à :
- Comprendre les mécanismes du stress oxydatif;
- Identifier les types d'antioxydants naturels;
- Expliquer le rôle des antioxydants dans la prévention des dommages cellulaires;
- comprendre les mécanismes d'action des antioxydants;
- connaître quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante et leurs principes.

PRÉ-REQUIS

- Afin de bien comprendre ce cours, les étudiants doivent avoir des connaissances de base en :
- Biochimie (structures et rôles des biomolécules);
- Physiologie cellulaire (mitochondrie, respiration, radicaux libres);
- Notions fondamentales sur les enzymes et réactions redox.

PLAN DE COURS

- Introduction
- 1. Mécanismes d'action des radicaux libres (conséquences du stress oxydant)
- 2. Mécanismes d'action des antioxydants (systèmes de défense)
- 3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

INTRODUCTION

- ❑ **L'oxydation** est une réaction chimique impliquant le transfert d'électrons, souvent catalysée par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que **les radicaux libres**.
- ❑ Dans le corps humain, l'oxydation se produit naturellement au cours du métabolisme, lorsque les cellules utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie. Ce processus génère des **radicaux libres**.
- ❑ Ce phénomène est à l'origine de la dégradation des biomolécules (lipides, protéines, ADN) dans les organismes vivants et les produits alimentaires.
- ❑ Pour faire face à ces effets, **les antioxydants** sont des composés capables de neutraliser ou de piéger ces radicaux, retardant ainsi les réactions d'oxydation.

Qu'est ce que un Radical libre?

Molécule instable possédant un ou plusieurs électrons non appariés, très réactifs (ex : $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$).

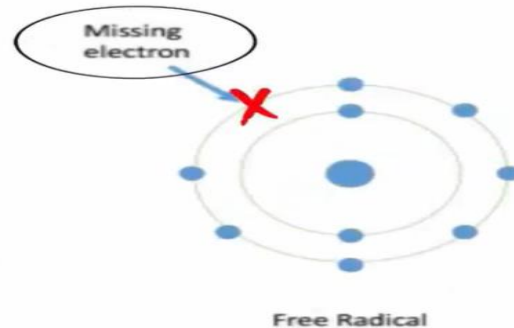
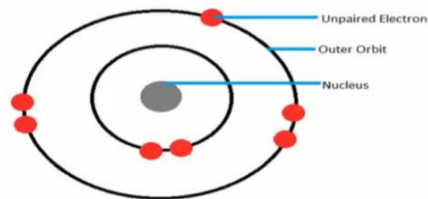


Fig. An Example of a Free Radical



Definition:

Free radicals are chemical species that contain **single unpaired electron** in an **outer orbit**.

- Unstable & highly reactive
- Autocatalytic Reaction
- Induce cell injury
- Has role in phagocytosis

Effets positifs : Les radicaux libres jouent un rôle important dans certaines fonctions, comme la défense immunitaire.

Effets négatifs : Un excès de radicaux libres provoque un **stress oxydatif**, qui peut endommager les cellules, l'ADN et les protéines, favorisant le vieillissement et les maladies.

Formation des radicaux libres: principales sources

Physique

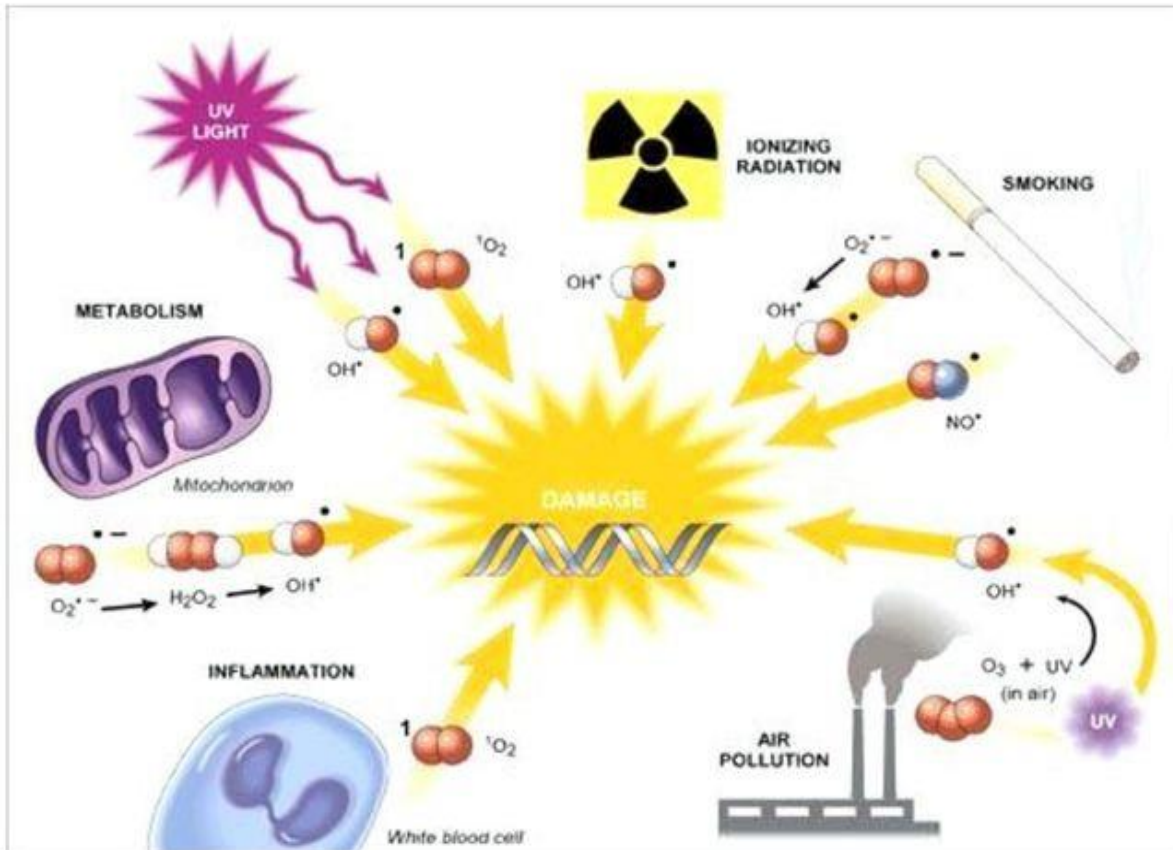
UV, radiations ionisantes

Chimique

polluants, drogues, médicaments, pesticides

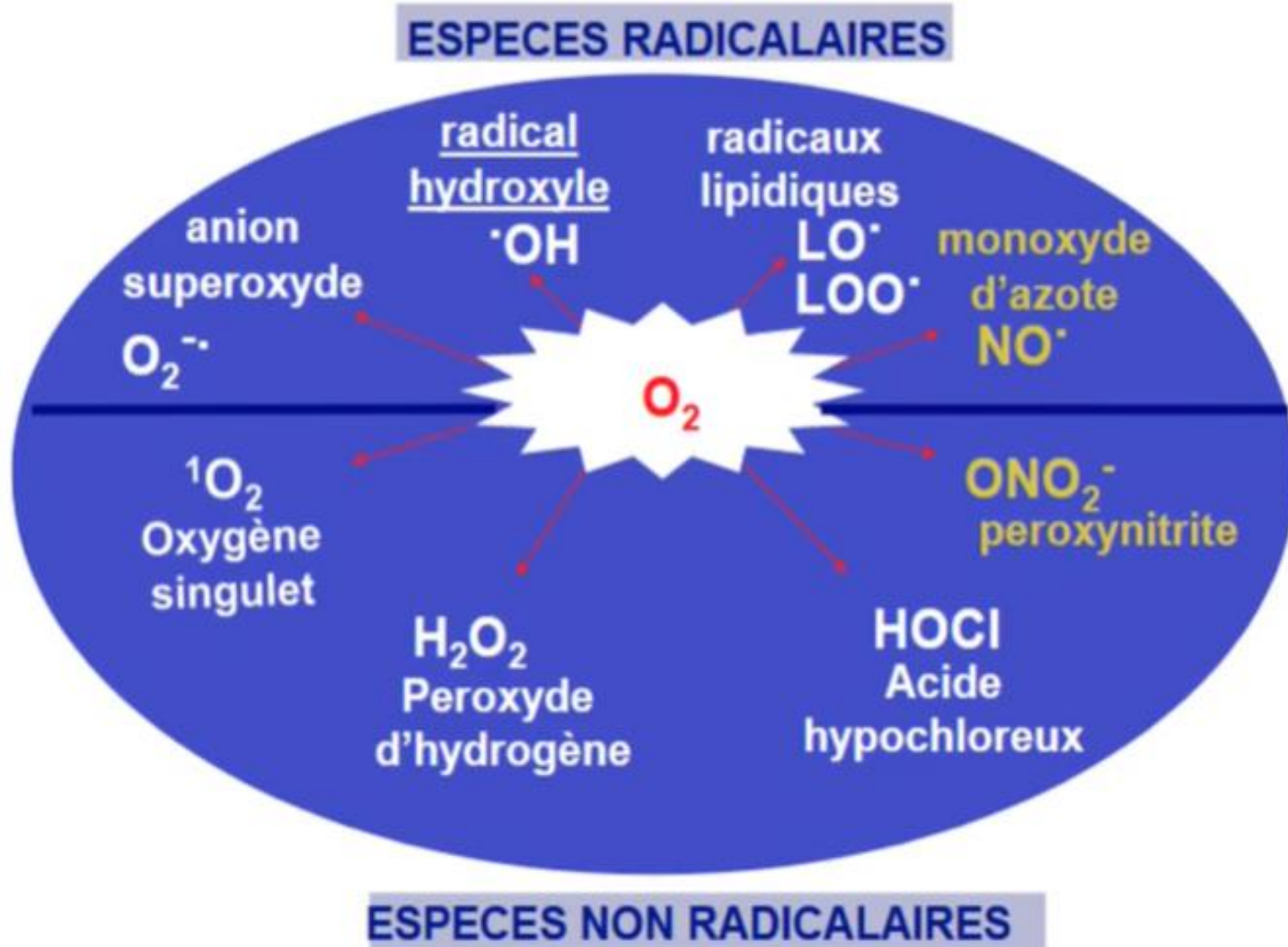
Biologique

virus, bactéries, réactions immunologiques, fuite des électrons (métabolisme humain normal)



Les radicaux libres sont inévitablement produits lors des réactions physiologiques normales – les radicaux libres sont nécessaires à la vie mais ils sont aussi le fléau de notre existence

Types d'espèces réactives de l'oxygène



Activité antioxydante

désigne la capacité d'une molécule ou d'un système biologique à inhiber ou à retarder l'oxydation des substrats, principalement en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou les radicaux libres.

Antioxydants

sont des **molécules** *qui neutralisent les espèces réactives de l'oxygène.*

Selon leur propriété physico-chimique, on peut les classer en 3 groupes :

Hydrosolubles	Liposolubles	Plus hydrosolubles que liposolubles
Acide ascorbique	α -tocophérol	Polyphénol
	β -carotène	

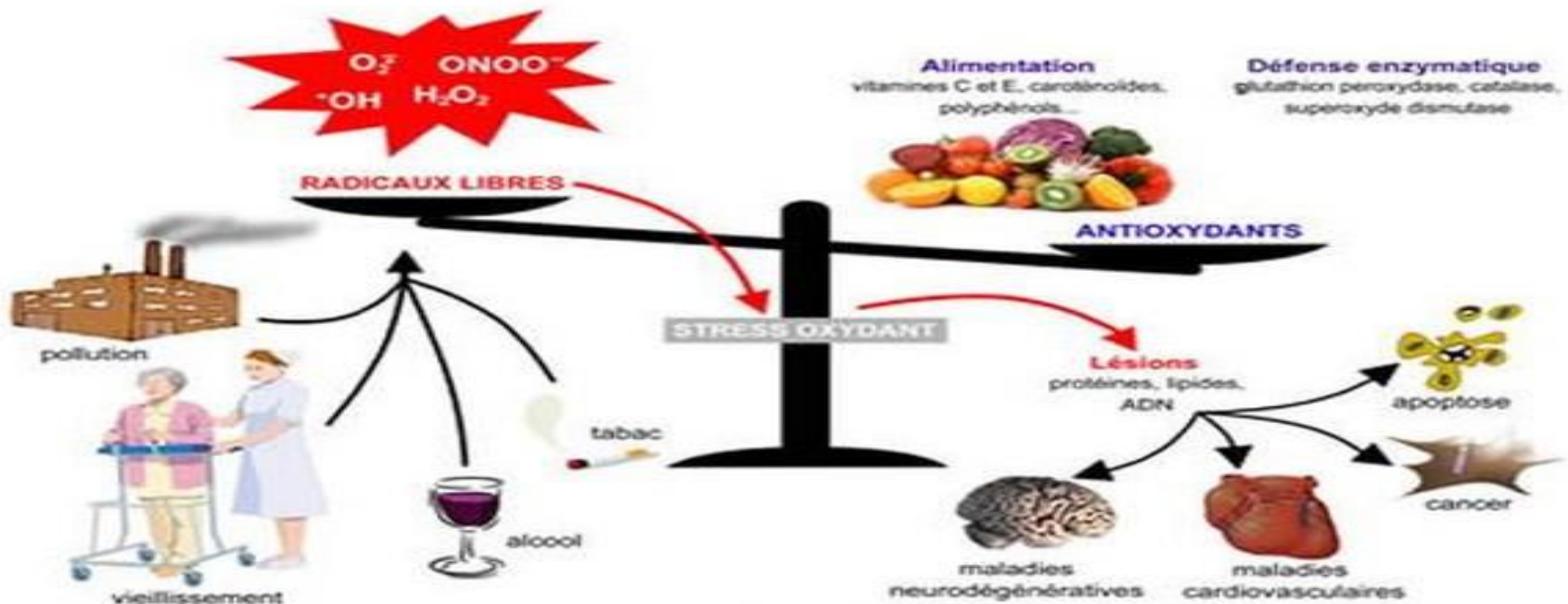
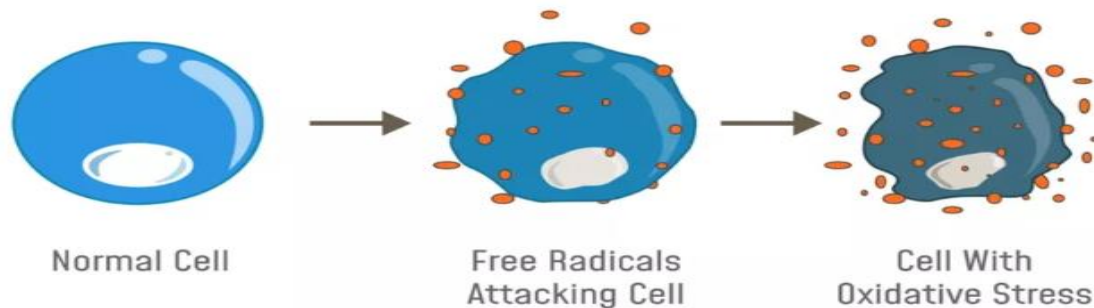


Figure 1 : Balance radicaux libres / antioxydants

OXIDATIVE STRESS



Etat de déséquilibre entre la production des radicaux libres et la capacité de l'organisme à les neutraliser.

I. Mécanismes d'action des radicaux libres (conséquences du stress oxydant)

1. Peroxydation lipidique

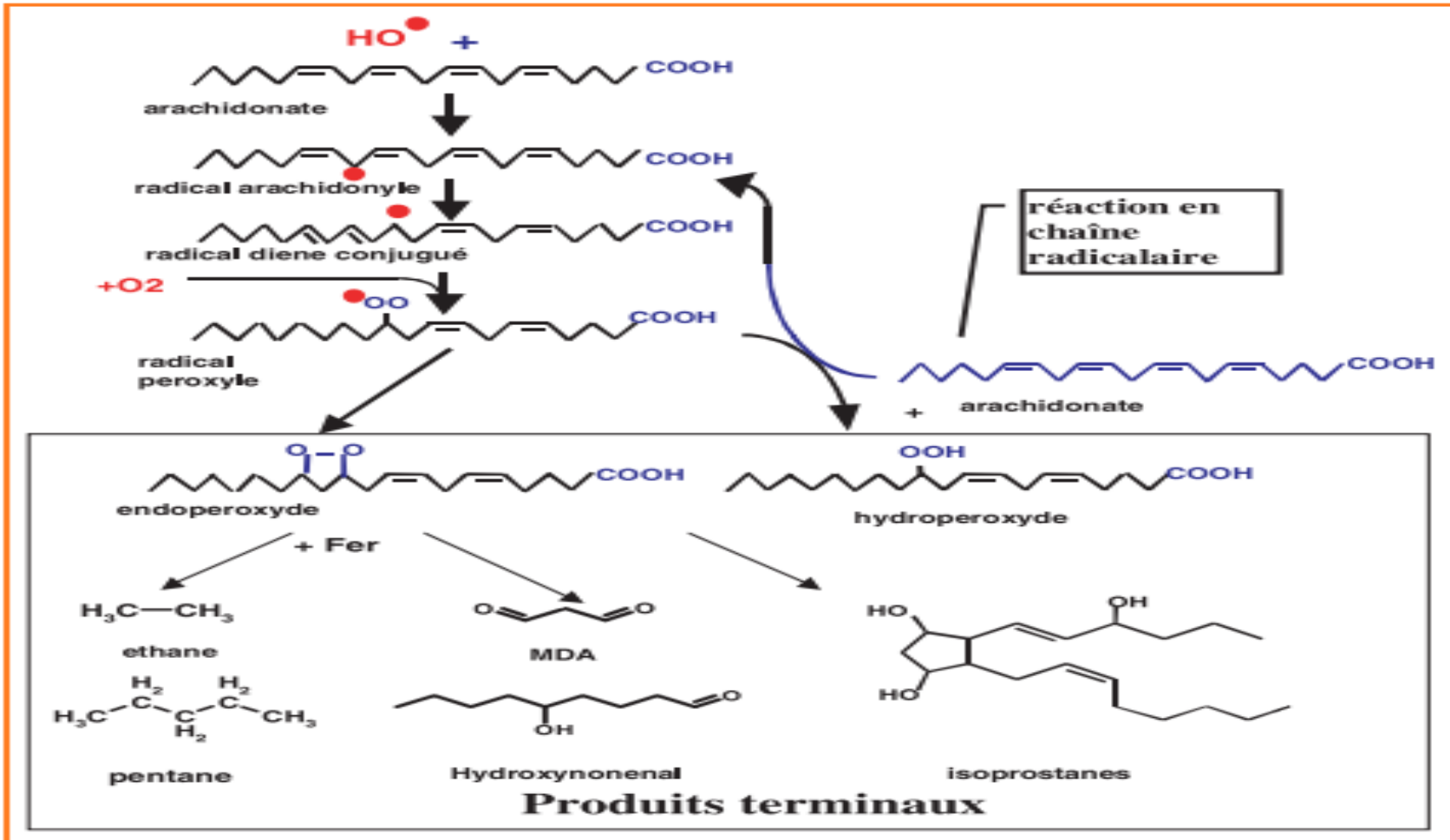


Figure. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.

3. Mutation génétique

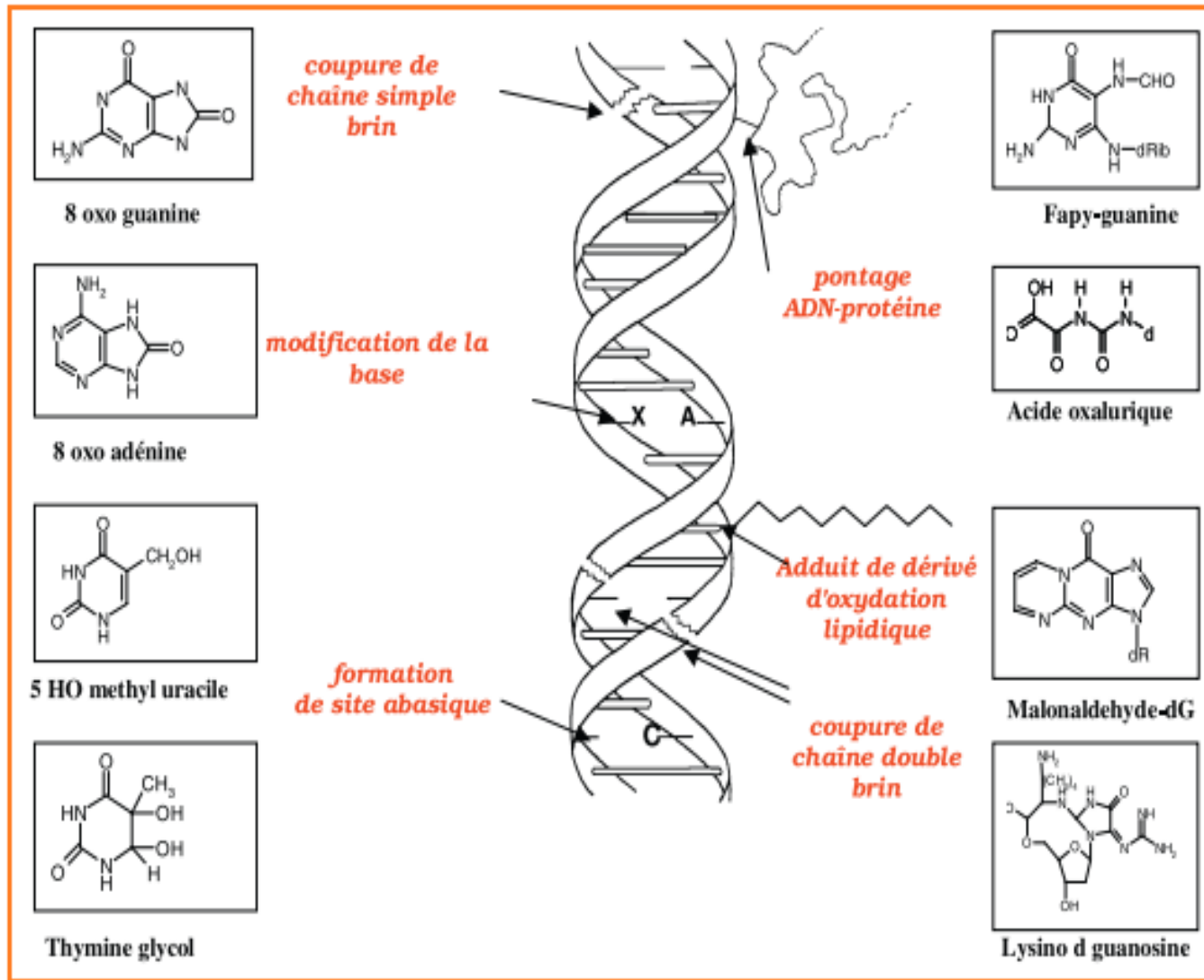


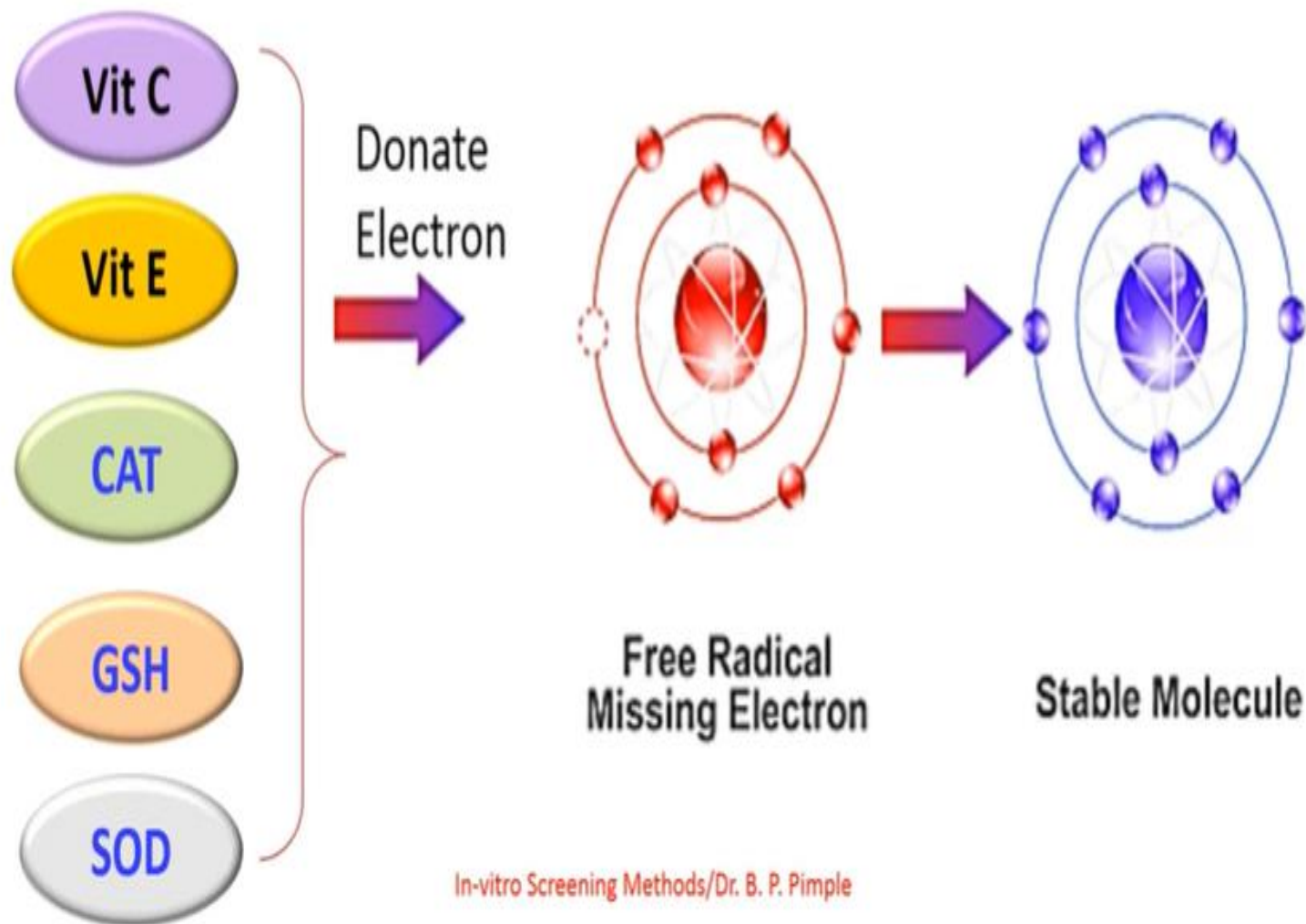
Figure. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

II. Mécanismes d'action des antioxydants (systèmes de défense)

- ❖ La cellule peut réduire l'impact de **ROS** par:
 - **un système endogène** impliquant **des enzymes** telles que la catalase et la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase.
 - **un système exogène** employant **des antioxydants** tels que les composés phénoliques, les caroténoïdes, les vitamines (C,E)...



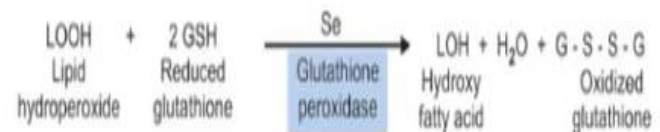
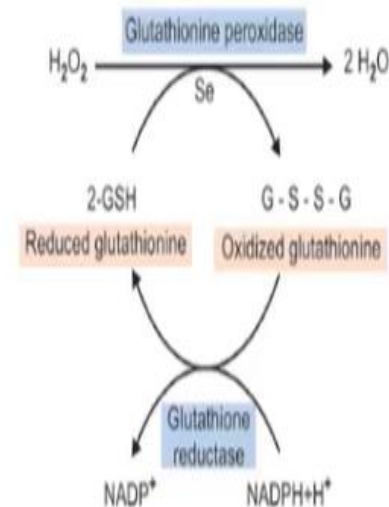
- Dr Mangala Nischal



In-vitro Screening Methods/Dr. B. P. Pimple

Glutathione peroxidase

- Glutathione peroxidase is a selenium containing enzyme.
- It catalyzes the reduction of **hydrogen peroxide (H₂O₂)** and **lipid hydroperoxides (LOO₂)** using reduced glutathione (**GSH**) as the reducing agents.



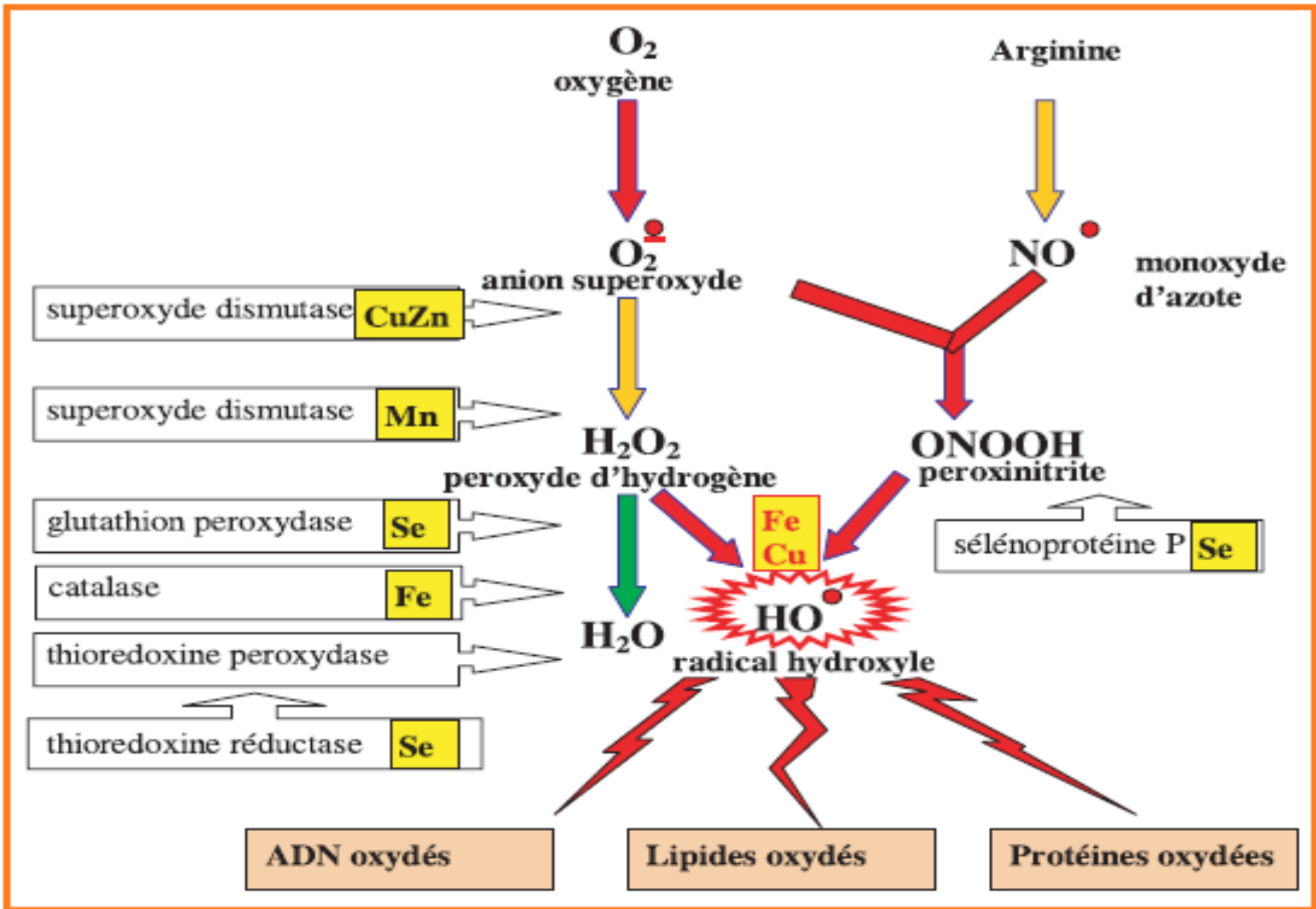


Figure: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.

(Favier, 2003)

2. Modes d'action des antioxydants

On distingue plusieurs modes d'intervention des antioxydants :

- interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires,
- chélation des métaux de transition,
- désactivation des espèces oxygénés réactives,
- inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation.

2. MODES D'ACTION DES ANTIOXYDANTS

Les antioxydants lipophiles

peuvent agir

soit en protégeant les lipides des initiateurs de l'oxydation,

(ils piègent les espèces réactives de l'oxygène),

soit en interrompant la phase de la propagation

(ils interrompent directement la chaîne de lipopéroxydation (ex. α -tocophérol) où d'autres antioxydant participent indirectement à cette interruption (acide ascorbique, polyphénols).

2. MÉCANISMES RETARDATEURS

L'oxydation des molécules organiques (ADN, protéines, lipides)

peut être retardée par

✓ *les systèmes enzymatiques antioxydants*

(Ex. la superoxyde dismutase catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène) ;

✓ *les chélateurs de métaux de transition*

(Ils peuvent prévenir l'oxydation en formant des complexes ou des composés de coordination avec les métaux de transition (Fe, Cu)) ;

✓ *les protéines*

*(Ex. la transferrine, la ferritine et la lactalbumine chélatent le **fer** alors que l'albumine chélate le **cuivre**) ;*

✓ *les caroténoïdes*

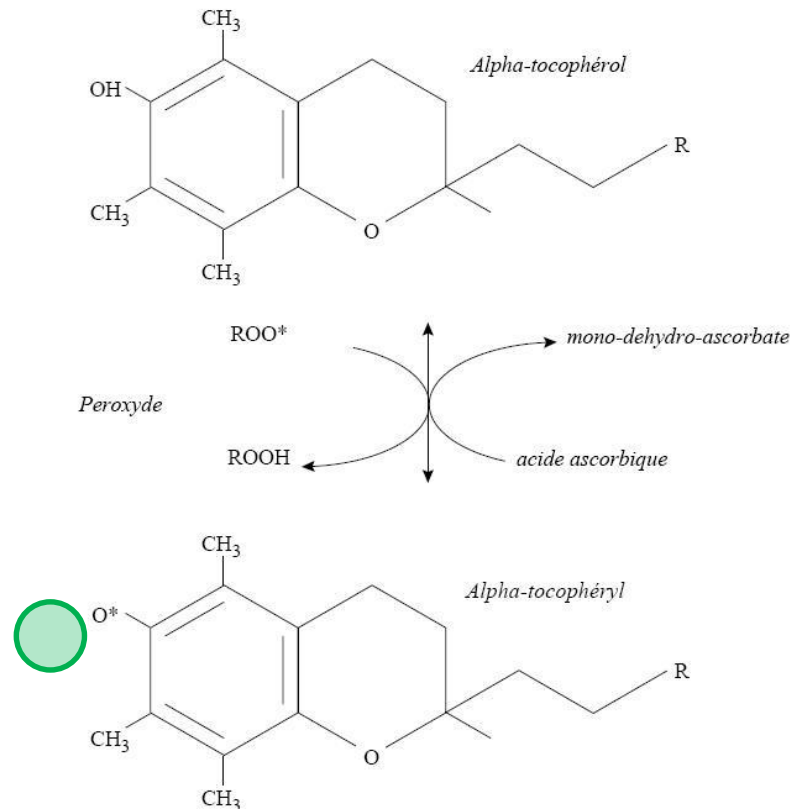
(Ex. β -carotène est un puissant neutralisant de l'oxygène singulet)

L'oxydation des acides gras

peut être *stoppée* par

des antioxydants tel que l' α -tocophérol.

Les produits alimentaires contenant des **acides gras insaturés**, qui pourraient être peroxydés (rancissement), sont protégés notamment par l'ajout d'antioxydants. De ce fait, ils *évitent* la formation de **produits toxiques** (peroxydes) et **allergiques**, mais également qui *protègent* la **perte de la qualité nutritionnelle** de ces aliments.



III. MÉTHODES D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Les antioxydants dans l'organisme

agissent différemment.

Pour évaluer l'activité antioxydante,

plusieurs méthodes sont à réaliser, et cela dépend de la nature d'antioxydants que l'on veut évaluer.

Du fait de la complexité structurale et fonctionnelle, et de la variabilité des propriétés des antioxydants, à ce jour, il n'existe pas une méthode universelle ou standardisée dans le but d'évaluer leur activité antioxydante.

Facteurs influençant l'activité antioxydante :

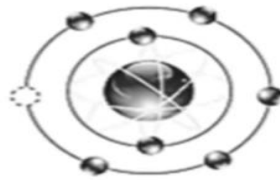
- ❑ *la réactivité de l'antioxydant envers le radical libre ;*
- ❑ *le nombre de molécules des radicaux libres neutralisés par les molécules antioxydantes ;*
 - ❑ *la liposolubilité de l'antioxydant ;*
 - ❑ *la présence de réactions secondaires.*

Ces tests se basent sur diverses stratégies qui ont pour but d'évaluer :

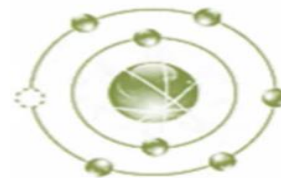
- *la neutralisation des radicaux libres (de synthèse) par les antioxydants ;*
- *l'aptitudes des antioxydants à réduire les ions de cuivre et de fer ;*
- *la protection, par les antioxydants, d'une molécule cible exposée à une source de radicaux libres ;*
- *l'aptitude des antioxydants à inhiber l'oxydation des LDL.*



DPPH ●



H₂O₂ ●



NO ●

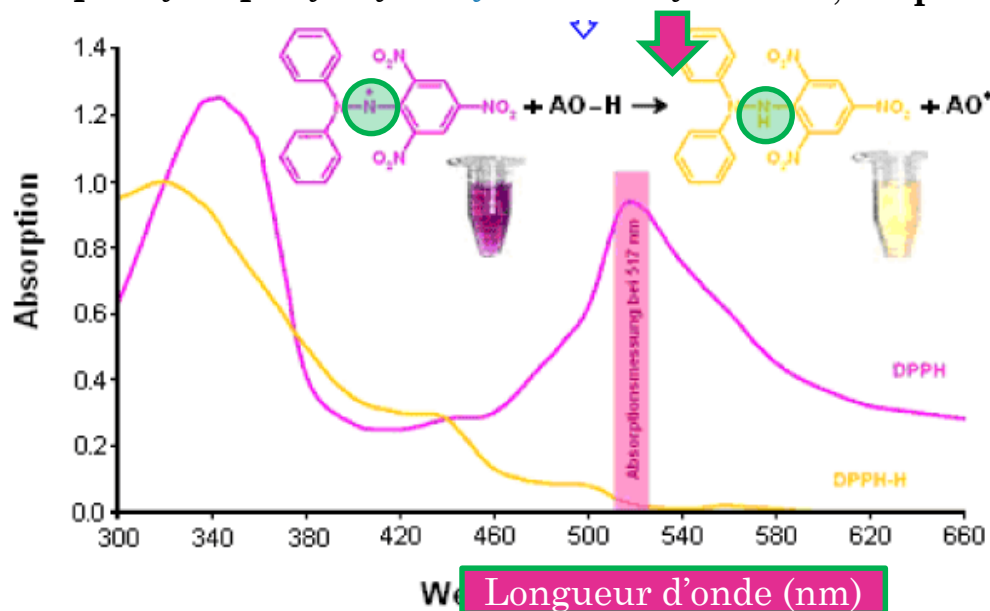
III.1. ACTIVITÉ DE PIÉGEAGE DU RADICAL DPPH°

Le DPPH° est un radical libre stable

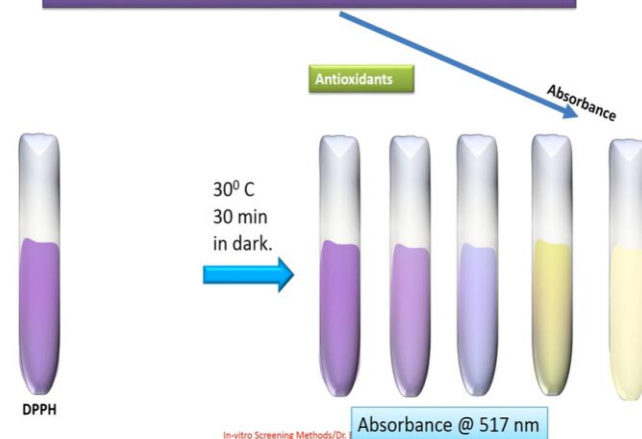
qui interagit avec des composés pouvant donner

un atome d'hydrogène.

1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl Antioxydant 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine (DPPH-H)



Antioxidant Activity: DPPH FRSA



Cette méthode est basée sur le piégeage du DPPH° à travers l'ajout d'antioxydants (dans la solution contenant le radical), faisant suite à une décoloration de la solution du pourpre au jaune.

La mesure de l'activité antioxydante s'effectue à 517 nm.

Les résultats de cette activité

sont exprimés

en pourcentage de piégeage du DPPH°

$$\% \text{ de piégeage} = (\text{Abs}_{\text{DPPH}^\circ} - \text{Abs}_{\text{DPPH-H}} / \text{Abs}_{\text{DPPH}^\circ}) * 100$$

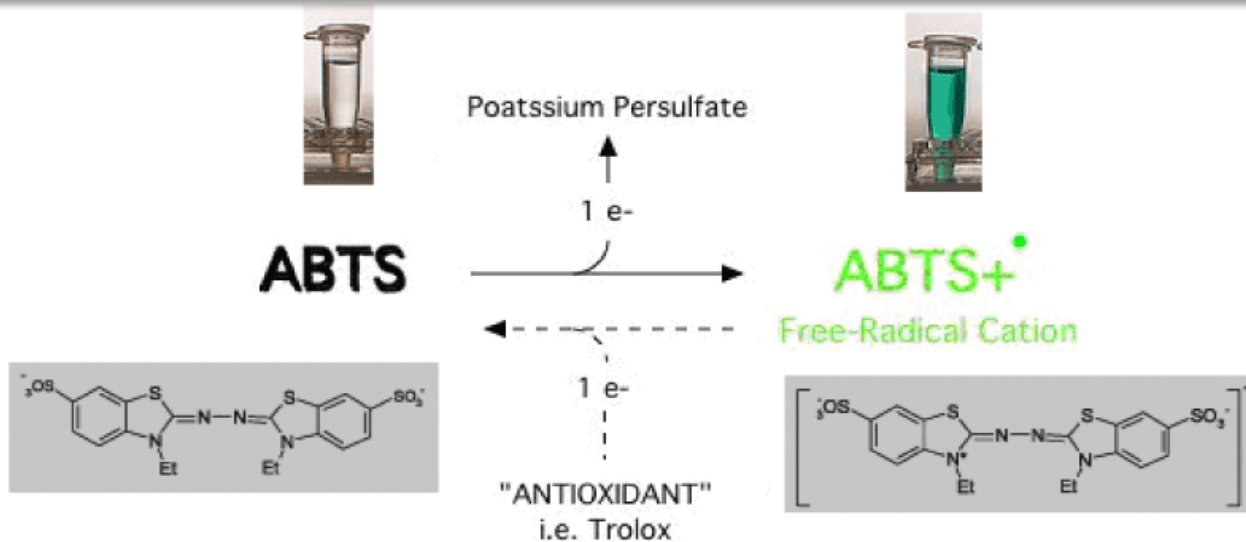
Le DPPH° est soluble dans des **solvants organiques** tel que le méthanol.

III.2. ACTIVITÉ DE PIÉGEAGE DU RADICAL ABTS^{o+}

L'ABTS^{o+}

*(2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazole-6-sulphonate)
interagit avec des antioxydants en lui donnant*

un électron.



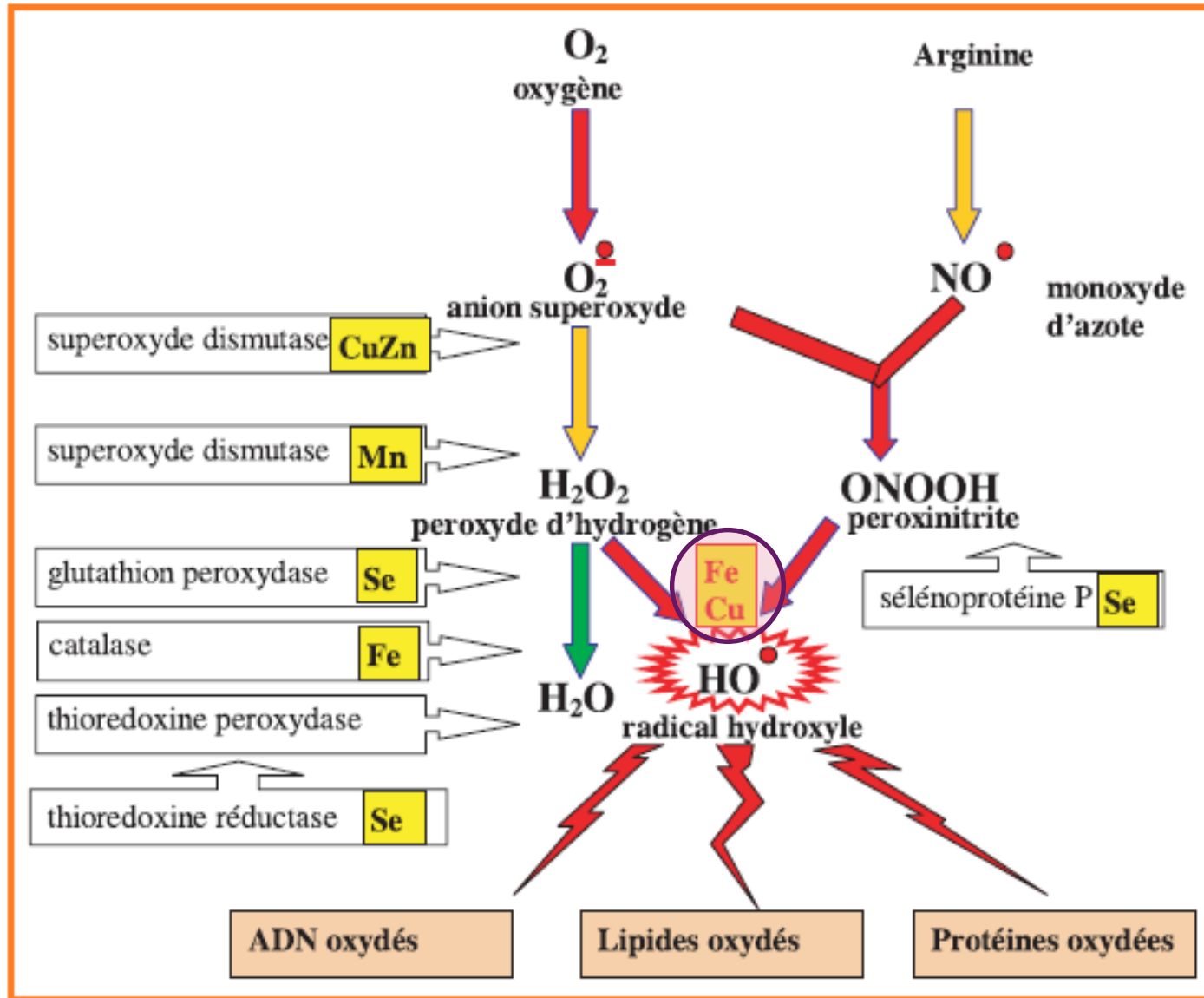
- 1 Cette méthode génère un chromophore ABTS^{o+} de couleur bleue/verte via la réaction préalable de l'ABTS avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈).
- 2 Puis l'ABTS^{o+}, qui est oxydé, va chercher à son tour un électron, dans ce cas l'antioxydant le réduit, et donc sa couleur diminue en intensité.

Le test ABTS^{o+}

La solution du cation ABTS^{o+} préparée est diluée jusqu'à l'obtention d'une solution ayant une absorbance de **0,70 ± 0,02** à **734 nm**.

Après l'ajout de la solution contenant des antioxydants à évaluer, l'absorbance est mesurée à **734 nm**.

4.3. POUVOIR CHÉLATEUR DE FER

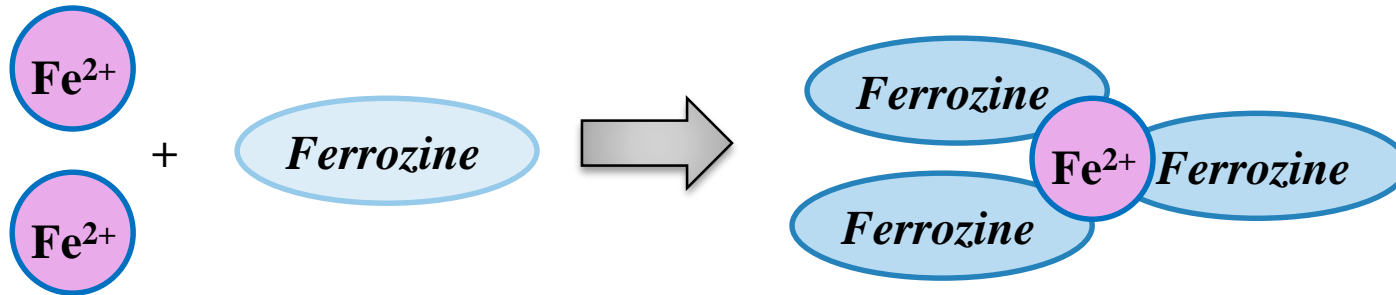


III.3. POUVOIR CHÉLATEUR DE FER

La capacité des antioxydants à chélater le fer

est évaluée selon la méthode décrite par Dinis et al. (1994).
Après l'ajout de la **ferrozine**, et du chlorure ferrique (FeCl_2) au préalable, un **complexe ferrozine- Fe^{2+}** formé est de couleur **rosâtre** qui absorbe à **562 nm**.

Le principe est basé sur la formation de complexe ferrosine- Fe^{2+} et sa perturbation en présence d'autres agents chélateurs (antioxydants).



L'antioxydant présent dans la solution *entre en compétition avec la ferrozine* pour chélater le Fe^{2+} , donc, **plus** la couleur est **moins foncée**, **plus** le pouvoir chélateur de fer de l'antioxydant est **puissant**.

Ferrozine : 3-(2-Pyridyl)-5,6-diphényl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonate de sodium

III.3. POUVOIR CHÉLATEUR DE FER

La capacité des antioxydants à chélater le fer

est exprimée en pourcentage :

$$\text{PCF (\%)} = (\text{Abs}_t - \text{Abs}_a / \text{Abs}_t) * 100$$

Où

PCF : pouvoir chélateur de fer;

Abs_t : absorbance de la solution témoin (contenant la ferrozine);

Abs_a : l'absorbance de la solution contenant l'antioxydant.

III.4. POUVOIR RÉDUCTEUR DE FER

Principe

Le pouvoir réducteur de fer est l'aptitude des antioxydants à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) de complexe ferricyanure $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en fer ferreux (Fe^{2+}). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'antioxydant, ayant le maximum d'absorbance à 700 nm.

Le complexe vert est formé par l'addition de FeCl_3 à la forme ferreux (Fe^{2+}) selon la réaction suivante :

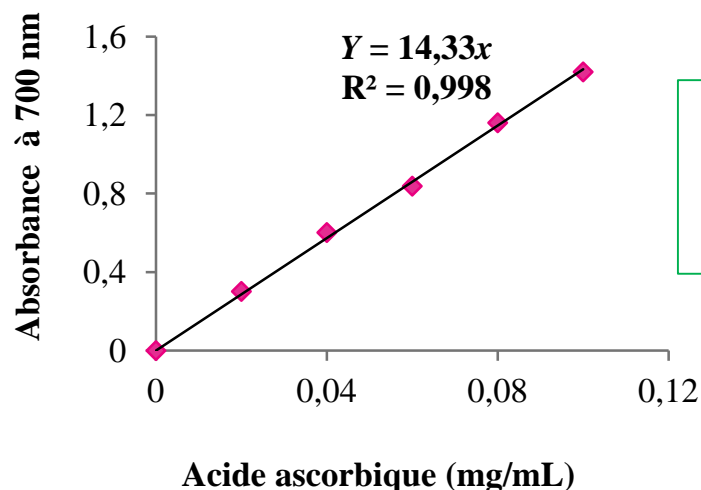


Complexe vert

III.4. POUVOIR RÉDUCTEUR DE FER

Un complexe coloré (ferrocyanure de fer)

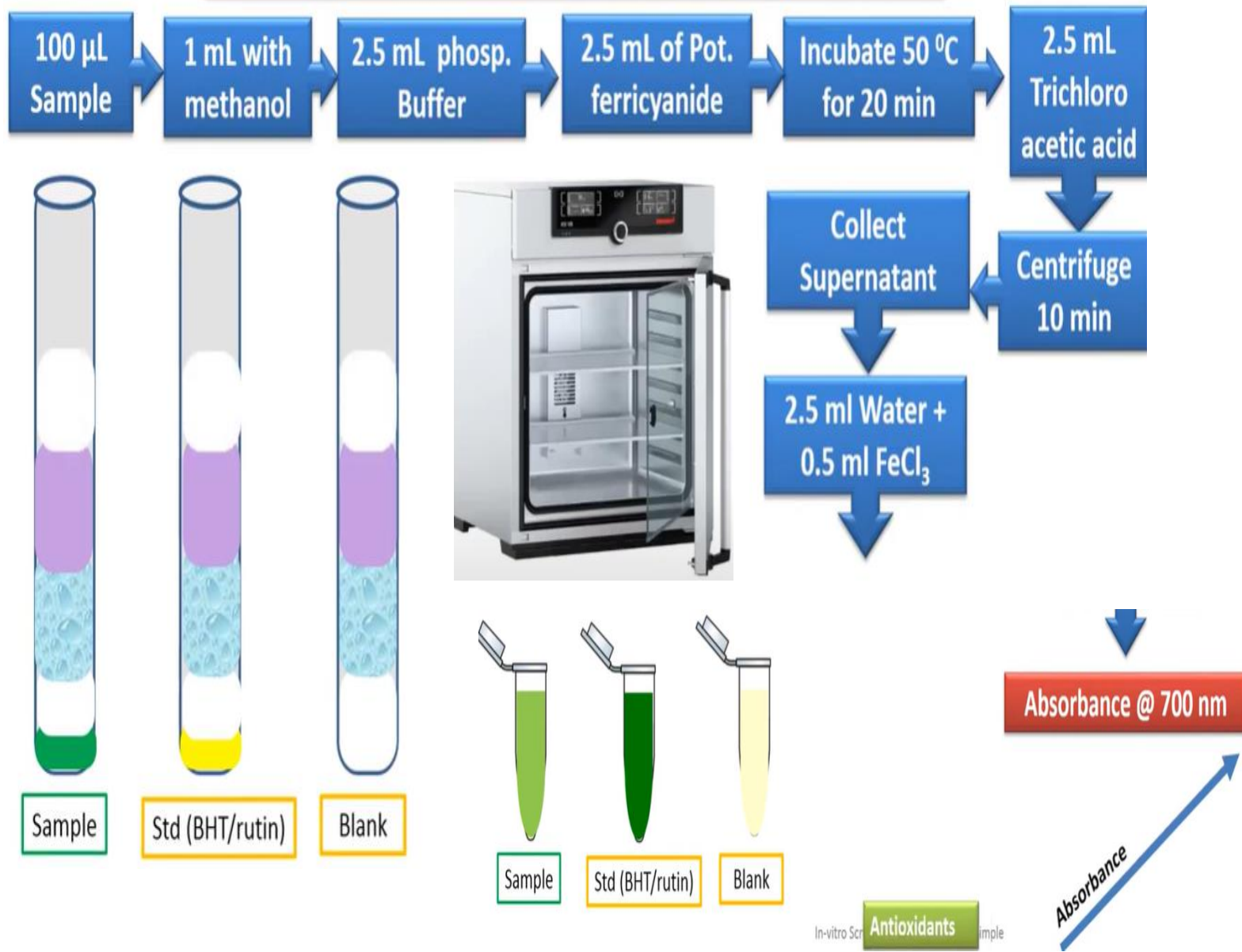
*se forme lorsque l'antioxydant réduit le fer du ferrocyanure, sous l'effet de la température et après addition du chlorure ferrique. Le pouvoir réducteur du fer des antioxydants est déterminé en mesurant l'absorbance de ce complexe coloré à **700 nm**.*



Le pouvoir réducteur de fer est exprimé en g équivalent d'acide ascorbique (gEAA)/ 100g de l'échantillon.

Ce test nécessite la préparation d'une courbe d'étalon pour estimer les résultats (*l'acide ascorbique peut être utilisé comme standard*).

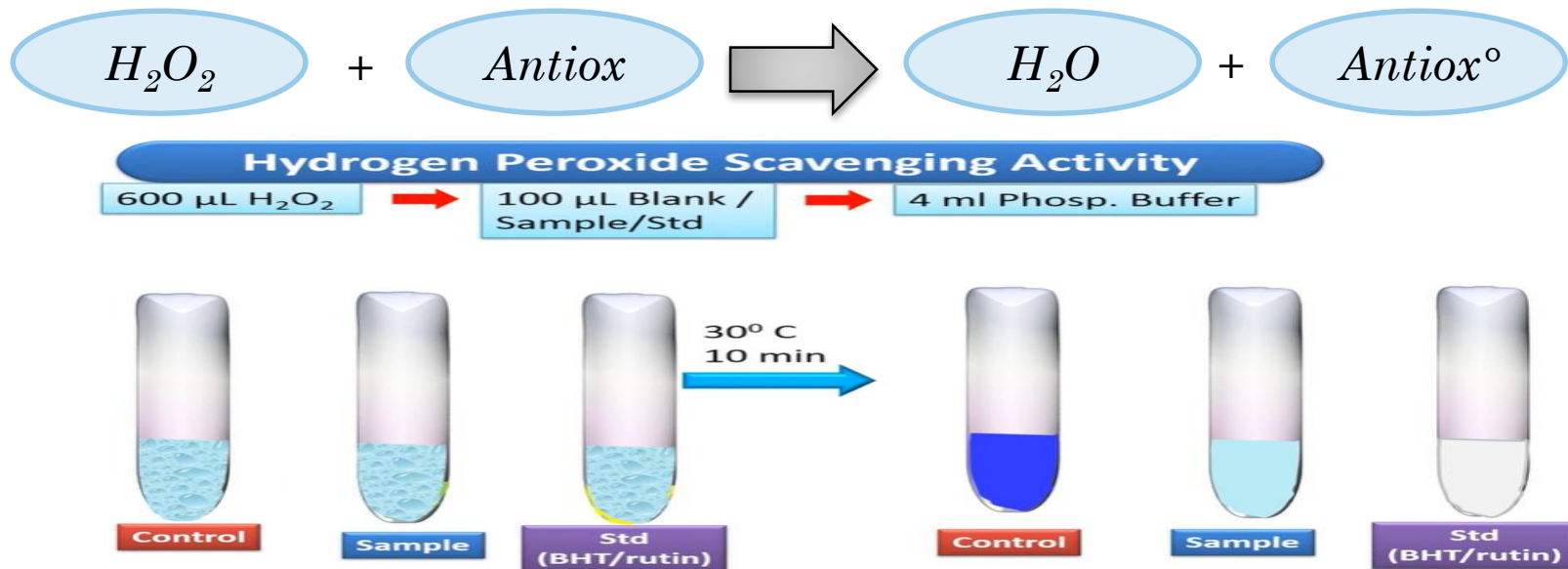
Procedure:



II.5. ACTIVITÉ INHIBITRICE DU PEROXYDE D'HYDROGÈNE

Dans une solution contenant des antioxydants à évaluer, un volume de peroxyde d'hydrogène est y ajouté (préparée dans un tampon phosphate où le pH est de 7,4).

Absorbance est mesurée à **230 nm**.



$$\text{Activité réductrice } H_2O_2(\%) = (Abs_t - Abs_a / Abs_t) * 100$$

Abs_t : absorbances du témoin ;

Abs_a : absorbances de l'antioxydant.

III.6. ACTIVITÉ INHIBITRICE DE L'ANION SUPEROXYDE

Principe de la méthode au pyrogallol

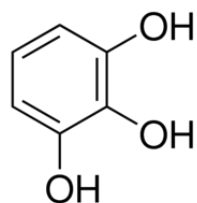
Le **pyrogallol** (1,2,3-trihydroxybenzène) s'**auto-oxyde spontanément** en présence d'oxygène à **pH basique** (généralement $\sim 8,2$), produisant du **radical superoxyde ($O_2 \cdot^-$)**.

Cette auto-oxydation se traduit par une **augmentation d'absorbance** à **420 nm**.

Quand un antioxydant est présent dans le milieu, il **interfère avec cette auto-oxydation** en **piégeant le superoxyde** ou en ralentissant la réaction. Cela se manifeste par une **diminution de l'absorbance**, proportionnelle à l'activité antioxydante de l'échantillon.

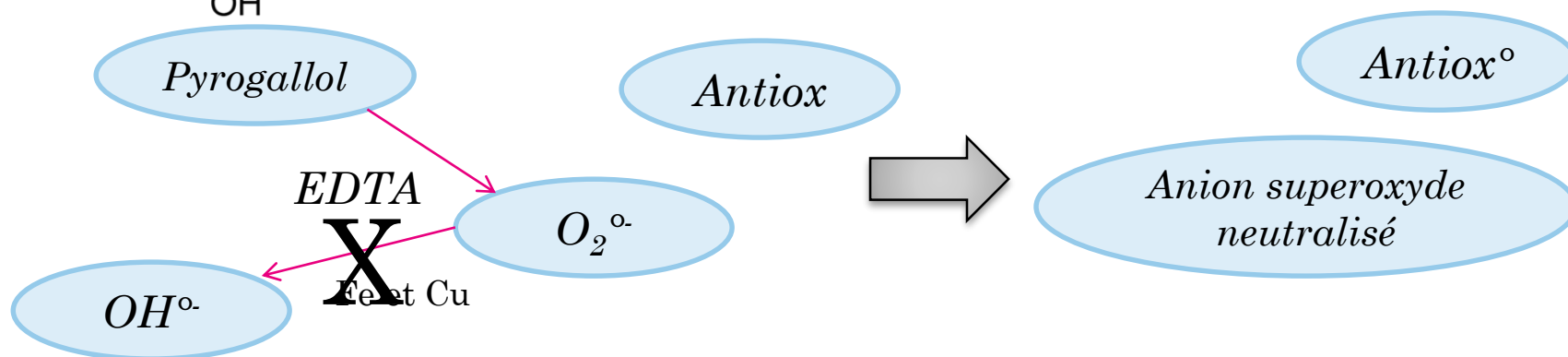
III.6. ACTIVITÉ INHIBITRICE DE L'ANION SUPEROXYDE

Dans une solution contenant des antioxydants à évaluer, un volume d'une **solution de pyrogallol** est y ajouté (préparée dans un tampon **Tris-HCl** contenant l'**EDTA** où le pH est de 8,2).



Pyrogallol

Absorbance est mesurée à **420 nm**.



Les résultats sont exprimés selon l'équation suivante :

$$\text{Activité (\%)} = (\text{Abs}_t - \text{Abs}_a / \text{Abs}_t) * 100$$

Abs_t : absorbances du témoin ;
 Abs_a : absorbances de l'antioxydant.

Tris-HCl : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane HCl
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EXERCICE

- On souhaite valoriser les écorces de grenade issus d'une production locale de jus. Ces sous-produits sont réputés pour leur richesse en composés phénoliques.
- On veut évaluer leur **activité antioxydante** à l'aide de trois tests : **DPPH, FRAP et chélation du fer**.
- Un extrait hydroalcoolique est préparé à partir des écorces séchées.

Données expérimentales

Concentration de l'extrait (mg/mL)	% inhibition DPPH	Absorbance FRAP (593 nm)	% chélation du Fe ²⁺
0.1	20 %	0.18	15 %
0.2	35 %	0.33	29 %
0.4	60 %	0.55	45 %
0.8	85 %	0.91	68 %

Questions :

1. Interprétation DPPH :

- a. Que mesure le test DPPH ?
- b. Que peut-on conclure de l'augmentation du % d'inhibition en fonction de la concentration ?

2. Pouvoir réducteur (FRAP) :

- a. Quel est le principe du test FRAP ?
- b. À quelle concentration observe-t-on le pouvoir antioxydant le plus élevé ?

3. Chélation des métaux :

- a. Pourquoi est-il important de mesurer la capacité de chélation du Fe^{2+} ?
- b. Quelle est l'efficacité de l'extrait à 0.4 mg/mL sur la chélation ?

4. Analyse comparative: Parmi les trois méthodes utilisées, laquelle semble montrer la meilleure efficacité de l'extrait ?

Interprétation DPPH

a. Que mesure le test DPPH ?

Le test DPPH mesure la **capacité de l'extrait à piéger les radicaux libres DPPH●**. Ces radicaux sont violets, et lorsqu'ils sont neutralisés par des antioxydants, la solution devient jaune. Le % d'inhibition reflète donc la **capacité antioxydante de l'extrait** via un mécanisme de **don d'hydrogène**.

b. Que peut-on conclure de l'augmentation du % d'inhibition en fonction de la concentration ?

On observe une **augmentation progressive** du % d'inhibition (de 20 % à 85 %) avec la concentration de l'extrait. Cela indique une **relation dose-dépendante**, prouvant que l'activité antioxydante augmente avec la **quantité de composés actifs présents**. Cela démontre que l'extrait est **efficace pour neutraliser les radicaux libres**, surtout à des concentrations plus élevées.

Pouvoir réducteur (FRAP)

a. Quel est le principe du test FRAP ?

Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) évalue la **capacité de l'extrait à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+})**. Cette réduction génère un complexe coloré bleu mesuré à 593 nm. Plus l'absorbance est élevée, plus le **pouvoir réducteur**, donc l'**activité antioxydante**, est important.

b. À quelle concentration observe-t-on le pouvoir antioxydant le plus élevé ?

Le **pouvoir antioxydant le plus élevé** est observé à **0.8 mg/mL**, avec une **absorbance FRAP de 0.91**, la valeur maximale du tableau. Cela indique que c'est la concentration la plus efficace pour le pouvoir réducteur.

Chélation des métaux

a. Pourquoi est-il important de mesurer la capacité de chélation du Fe^{2+} ?

Le fer (Fe^{2+}) peut catalyser la formation de **radicaux hydroxyles très réactifs** via la réaction de Fenton. Mesurer la **capacité de chélation** permet d'évaluer la capacité de l'extrait à **bloquer ces réactions pro-oxydantes**, en **neutralisant les ions métalliques libres**. C'est donc essentiel pour prévenir l'oxydation des biomolécules.

b. Quelle est l'efficacité de l'extrait à 0.4 mg/mL sur la chélation ?

À 0.4 mg/mL, l'extrait atteint **45 % de chélation du Fe^{2+}** , ce qui est **modérément élevé**. Cela indique une **bonne capacité de liaison des ions métalliques**, contribuant ainsi à l'effet antioxydant global.

Analyse comparative

a. Parmi les trois méthodes utilisées, laquelle semble montrer la meilleure efficacité de l'extrait ?

Les **résultats du test DPPH** montrent l'effet **le plus marqué** : à 0.8 mg/mL, l'inhibition atteint **85 %**, ce qui est supérieur aux valeurs observées dans les deux autres tests. Cela suggère que **l'extrait est particulièrement efficace comme piègeur de radicaux libres**. Toutefois, il reste aussi très actif selon les tests FRAP et de chélation, montrant ainsi une **activité antioxydante multifonctionnelle**.

RÉFÉRENCES

Causse C. (2013). Les secrets de santé des antioxydants : vivre plus longtemps en bonne santé. Alpen, France.

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., & Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315, 161–169.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutiques. Actualité Chimique, 108-113.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutrition clinique et métabolisme, 16(4), 233-239.

Références électroniques :

www.omicsonline.org

www.mdpi.com