

Activités antioxydantes

Dr. BENCHIKH Yassine

Version 1.0 Publié le 23/04/2024

Table des matières

Objectifs	3
Introduction	4
I - Modes d'action des antioxydants	6
II - Mécanisme retardataire	7
III - Mécanisme d'arrêt de la propagation de la chaîne radicalaire	8
IV - Evaluation de l'activité antioxydante	9
1. Références.....	15
Mentions légales	16

Objectifs



Le cours sur l' « activité antioxydante » vise à :

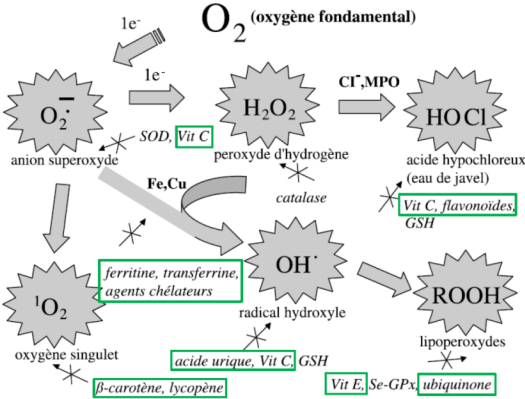
- **connaître** quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante et leurs principes ;
- **comprendre** les mécanismes d'action des antioxydants.



Introduction

Systèmes de défenses antioxydantes

Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes

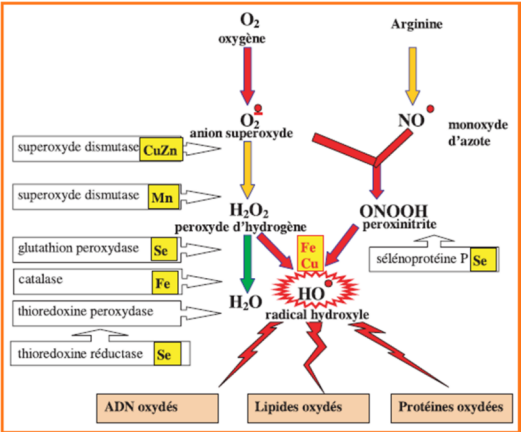


Les antioxydants sont des molécules qui *neutralisent* les **espèces réactives de l'oxygène**.

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

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

Intervention des antioxydants dans le processus physiologique au sein des organismes



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 :

1. la réactivité de l'antioxydant envers le radical libre ;
2. le nombre de molécules des radicaux libres neutralisés par les molécules antioxydantes ;
3. la liposolubilité de l'antioxydant ;
4. la présence de réactions secondaires.

Modes d'action des antioxydants



Remarque

Les antioxydants lipophiles peuvent agir :

- soit en protégeant les lipides des **initiateurs** de l'oxydation,
- soit en **interrompant** la phase de la **propagation** (ils piègent les espèces réactives de l'oxygène et ils interrompent directement la chaîne de lipopéroxydation).

Exemple

L' α -tocophérol ou d'autres antioxydant participent indirectement à cette interruption (acide ascorbique, polyphénols).

Mécanisme retardataire



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**

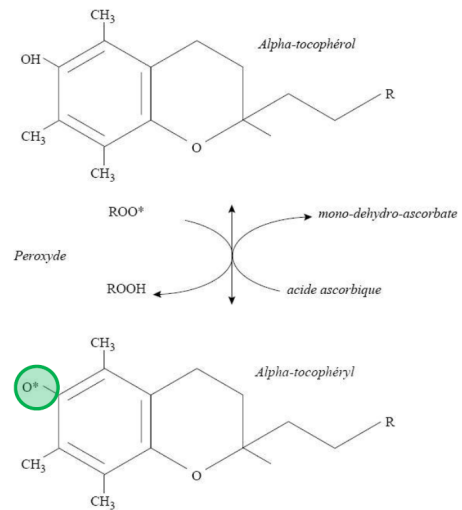
(Ex. β -carotène est un puissant neutralisant de l'oxygène singulet).

Mécanisme d'arrêt de la propagation de la chaîne radicalaire

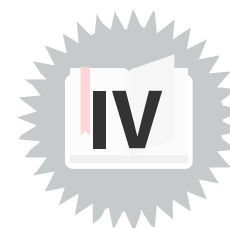


L'oxydation des acides gras peut être stoppée par des antioxydants tel que l' α -tocophérol.

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.



Evaluation de l'activité antioxydante



Les antioxydants dans l'organisme agissent différemment. Pour cela, il était nécessaire de développer de **différentes méthodes** d'évaluation de l'activité antioxydante.

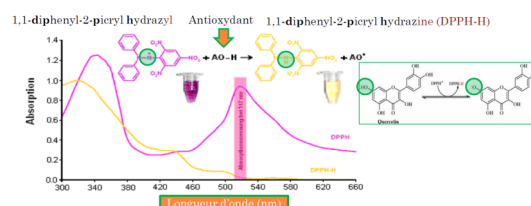
Ces tests se basent sur diverses stratégies qui ont pour but d'évaluer :

- 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.

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.

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.



Expression des résultats



Les résultats de cette activité sont exprimés en pourcentage de piégeage du DPPH° ou en IC₅₀.

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

ou

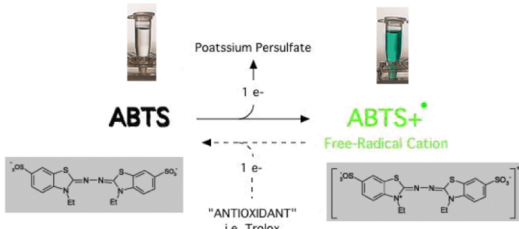
$$\text{IC}_{50} = \dots \text{ mg/mL}$$



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

2. Activité de piégeage du radical ABTS°+

L'ABTS°+ (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazole-6-sulphonate) interagit avec des antioxydants en lui donnant un électron.



1. Cette méthode génère un chromophore $ABTS^{+\bullet}$ de couleur bleu/verte via la réaction préalable de l'ABTS avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$).
2. Puis l' $ABTS^{+\bullet}$, qui est oxydé, va chercher à son tour un électron, dans ce cas l'antioxydant le réduit, et donc sa couleur diminue en intensité.

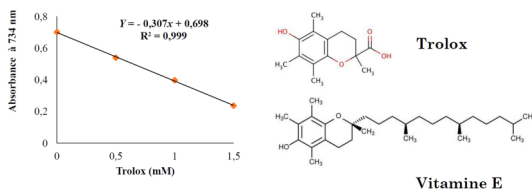
Expression des résultats



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

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

Les résultats de cette activité sont exprimés en millimole équivalent de trolox (mMET)



Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant le trolox comme standard.

Ce test de décoloration permet d'estimer la capacité antioxydante totale pour des substances hydrophile et lipophile.

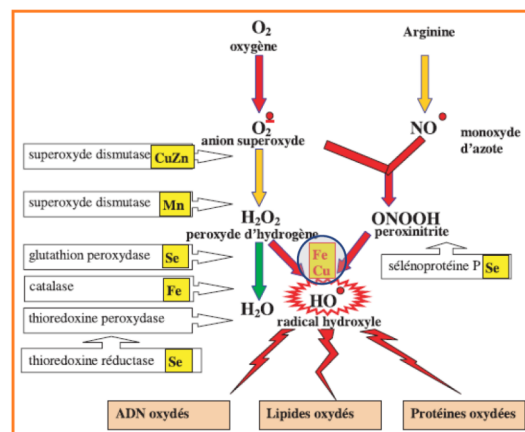
Le trolox est un produit de synthèse qui ressemble au noyau chromofore de la vitamine E (antioxyant naturel) ,mais il n'est pas lipophile.



L'activité antioxydante peut être exprimée en IC_{50} , et comparée par la suite à l' IC_{50} du trolox.

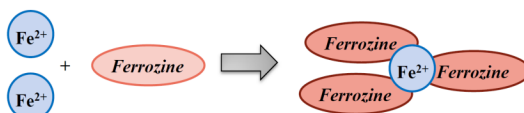
3. Pouvoir chélateur de fer

La capacité des antioxydants à chélater le fer permet de limiter la réaction de Fenton.



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.



L'antioxydant présent dans la solution entre en compétition avec la ferrozine (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphényl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonate de sodium) pour chélater le Fe^{2+} , donc, plus la couleur est moins foncée, plus le pouvoir chélateur de fer de l'antioxydant est puissant.

Expression des résultats

 **Remarque**

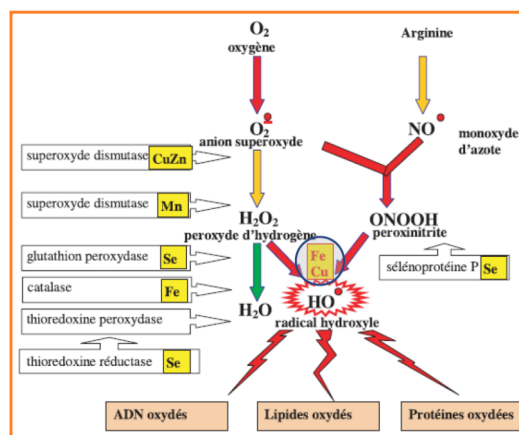
La capacité des antioxydants à chélater le fer est exprimée en pourcentage :

$$PCF (\%) = (Abs_t - Abs_a / Abs_t) \times 100$$

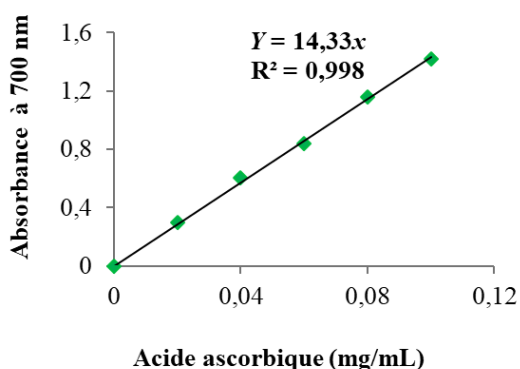
Où PCF : pouvoir chélateur de fer; Abst : absorbance de la solution témoin (contenant la ferrozine); Absa : l'absorbance de la solution contenant l'antioxydant.

4. Pouvoir réducteur de fer

La capacité des antioxydant à réduire le fer permet de limiter la réaction de Fenton.



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.



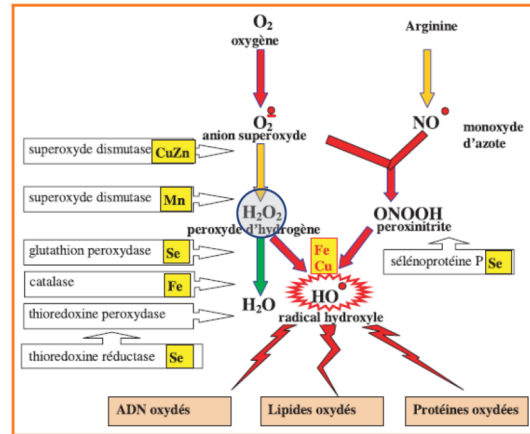
Le pouvoir réducteur de fer prut être exprimé en mg équivalent d'acide ascorbique (mgEAA)/ 100g de l'échantillon.

 **Remarque**

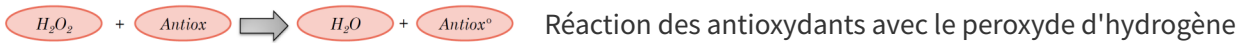
Ce test nécessite la préparation d'une courbe d'étalon pour estimer les résultats (l'acide ascorbique peut être utilisé comme standard).

5. Activité inhibitrice du peroxyde d'hydrogène

L'activité inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est évaluée pour déterminer si un antioxydant a la capacité de réduire le H₂O₂ en H₂O.



Dans une solution contenant des antioxydants à évaluer, un volume de peroxyde d'hydrogène est ajouté (préparée dans un tampon phosphate où le pH est de 7,4). L'absorbance est mesurée à 230 nm.



Expression des résultats



L'activité inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est exprimée en pourcentage :

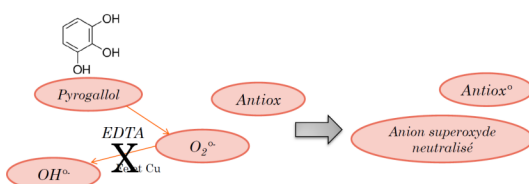
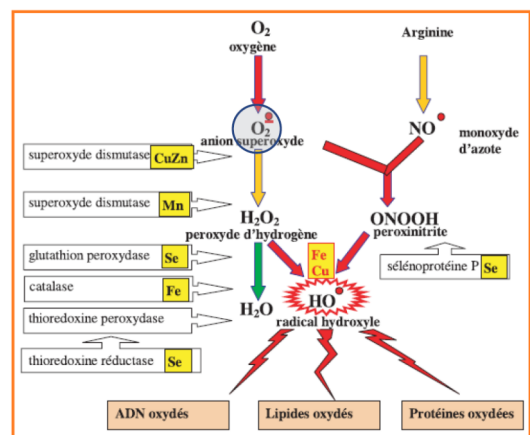
$$\text{Activité inhibitrice (\%)} = (Abs_t - Abs_a / Abs_t) \times 100$$

Abs_t : absorbances du témoin ;

Abs_a : absorbances de l'antioxydant.

6. Activité inhibitrice de l'anion superoxyde

L'activité inhibitrice de l'anion superoxyde est évaluée pour déterminer la capacité d'un antioxydant à neutraliser l'anion superoxyde.



Dans une solution contenant des antioxydants à évaluer, un volume d'une solution de pyrogallol est ajouté (préparée dans un tampon Tris-HCl contenant l'EDTA où le pH est de 8,2). L'absorbance est mesurée à 420 nm.

Expression des résultats



L'activité inhibitrice de l'anion superoxyde est exprimée en pourcentage :

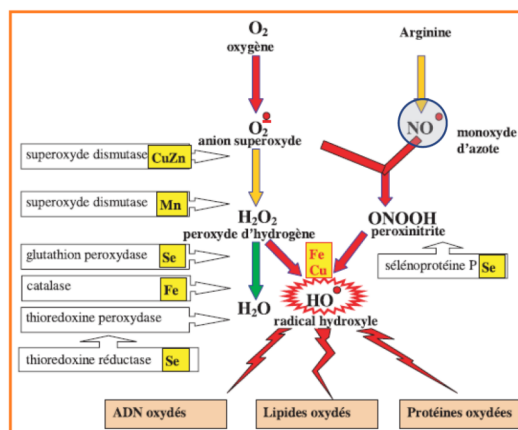
$$\text{Activité inhibitrice (\%)} = (\text{Abs}_t - \text{Abs}_a / \text{Abs}_t) \times 100$$

Abs_t : absorbances du témoin ;

Abs_a : absorbances de l'antioxydant.

7. Activité inhibitrice du monoxyde d'azote

L'activité inhibitrice du monoxyde d'azote est évaluée pour déterminer la capacité d'un antioxydant à neutraliser le monoxyde d'azote.



Un échantillon contenant des antioxydants est incubé pendant 150 min dans un mélange réactionnel contenant de nitroprussiate de sodium (qui sert à produire le monoxyde d'azote).

Un volume du mélange est prélevé et mixé à un volume égal de réactif de Griess (réagit avec l'ion nitrite pour former un colorant rouge).

L'absorbance est mesurée à 540 nm.

Expression des résultats



L'activité inhibitrice du monoxyde d'azote est exprimée en pourcentage :

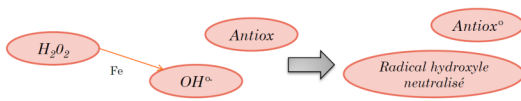
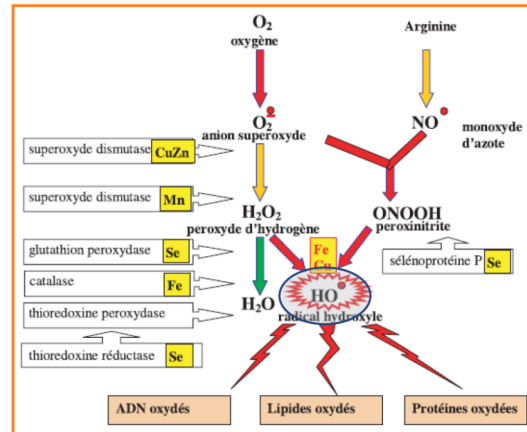
$$\text{Activité inhibitrice (\%)} = (\text{Abs}_t - \text{Abs}_a / \text{Abs}_t) \times 100$$

Abs_t : absorbances du témoin ;

Abs_a : absorbances de l'antioxydant.

8. Activité inhibitrice du radical hydroxyle

L'activité inhibitrice du radical hydroxyle est évaluée pour déterminer la capacité d'un antioxydant à neutraliser le radical hydroxyle.



Dans une solution contenant des antioxydants à évaluer (préparée dans un tampon phosphate où le pH est de 7,4), un volume d'une solution de peroxyde d'hydrogène est y ajouté contenant de chlorures ferriques. L'absorbance est mesurée à 532 nm.

Expression des résultats



L'activité inhibitrice du radical d'hydroxyle est exprimée en pourcentage :

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

Abs_t : absorbances du témoin ;

Abs_a : absorbances de l'antioxydant.

9. Capacité d'absorption des radicaux oxygénés

L'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) est un test où le 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) ajouté à une solution contenant la fluorescéine dégrade cette protéine en générant deux radicaux libres. Donc le rôle des antioxydants ajoutés est de retarder la dégradation de la fluorescéine.

Expression des résultats



Les résultats sont exprimés en millimoles équivalent de trolox.

9. Test de blanchiment de β-carotène

La capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la production de composés organiques volatils et la formation de diènes conjugués hydroperoxydes issus de l'oxydation de l'acide linoléique.

Le résultat étant la décoloration du β-carotène.

1. 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

Mentions légales



Pas d'utilisation commerciale ; Pas de modifications