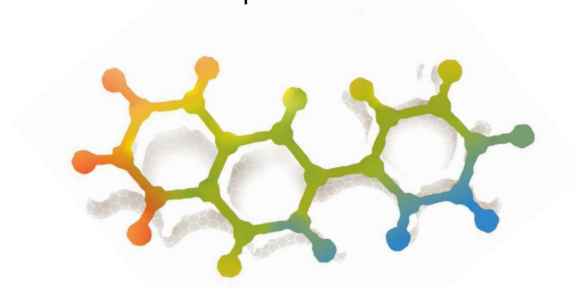


Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
Académie d'Aix-Marseille

THESE

Ecole Doctorale Sciences des Procédés - Sciences des Aliments (ED 306), Montpellier
Laboratoire d'accueil : UMR A-408, INRA-UAPV, « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale »

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AVIGNON
Discipline : CHIMIE



Modélisation chimique du pouvoir antioxydant des polyphénols dans le
compartiment gastrique

Inhibition de l'oxydation lipidique initiée par la metmyoglobine dans des
émulsions stabilisées par la sérum albumine ou les phospholipides

Présentée et soutenue publiquement par

Bénédicte LORRAIN

Le 16 décembre 2008

Jury :

MAILLARD Marie-Noëlle	Professeur	AgroParisTech, Massy	Rapporteur
ROLANDO Christian	Directeur de Recherche	CNRS, Lille	Rapporteur
GENOT Claude	Directeur de Recherche	INRA, Nantes	Examineur
BOREL Patrick	Directeur de Recherche	INRA, Marseille	Examineur
DUFOUR Claire	Chargée de Recherche	INRA, Avignon	Directeur de thèse
DANGLES Olivier	Professeur	Université d'Avignon	Directeur de thèse



Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Académie d'Aix-Marseille

Région



Provence-Alpes-Côte d'Azur



THESE

Ecole Doctorale Sciences des Procédés - Sciences des Aliments (ED 306), Montpellier
Laboratoire d'accueil : UMR A-408, INRA-UAPV, « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale »

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AVIGNON
Discipline : CHIMIE

Modélisation chimique du pouvoir antioxydant des polyphénols dans le
compartiment gastrique

Inhibition de l'oxydation lipidique initiée par la metmyoglobine dans des
émulsions stabilisées par la sérum albumine ou les phospholipides

Présentée et soutenue publiquement par

Bénédicte LORRAIN

Le 16 décembre 2008

Jury :

MAILLARD Marie-Noëlle	Professeur	AgroParisTech, Massy	Rapporteur
ROLANDO Christian	Directeur de Recherche	CNRS, Lille	Rapporteur
GENOT Claude	Directeur de Recherche	INRA, Nantes	Examineur
BOREL Patrick	Directeur de Recherche	INRA, Marseille	Examineur
DUFOUR Claire	Chargée de Recherche	INRA, Avignon	Directeur de thèse
DANGLES Olivier	Professeur	Université d'Avignon	Directeur de thèse

« Toute certitude est par essence contradictoire avec la philosophie de la recherche. »

« Le chercheur doit être libre de tenter des expériences audacieuses, de soutenir des théories révolutionnaires, voire paradoxales. Il doit disposer du droit à l'erreur. »

Pierre Joliot, *La Recherche Passionnément*

A mes parents,
A Guilhemette et Anne-Claire,
A Christophe,

Pour votre soutien permanent pendant mes longues années d'étude

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au sein de l'équipe « Chimie des antioxydants » du laboratoire « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale », UMR A-408 INRA-Université d'Avignon. Je remercie Monsieur Christophe N'Guyen-Thé pour m'avoir accueillie dans l'unité qu'il dirige.

Je tiens à exprimer ma plus vive reconnaissance aux membres du jury :

- **Madame Marie-Noëlle MAILLARD** et **Monsieur Christian ROLANDO** pour votre participation à ce travail en qualité de rapporteur. Je vous remercie d'avoir enrichi cette étude par vos expertises et vos expériences respectives.

- **Madame Claude GENOT** pour avoir participé à ce jury en qualité de rapporteur. Je tiens aussi à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'accueil et la disponibilité dont vous avez fait preuve lors de mes différents stages dans votre équipe à l'INRA de Nantes et pour le suivi annuel de ma thèse lors des comités de pilotage.

- **Monsieur Patrick BOREL** pour votre contribution à ce jury en qualité de rapporteur. Je vous exprime également ma gratitude pour votre expertise « nutrition » et votre collaboration au suivi de mes travaux durant ces trois années. Je vous adresse aussi ma reconnaissance pour vos conseils avisés en statistiques et pour les transferts d'échantillons entre Avignon et Marseille.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à mes deux directeurs de thèse pour la confiance qu'ils m'ont témoignée et l'ensemble des connaissances scientifiques qu'ils m'ont transmises lors de ces trois années : - **Olivier DANGLES**, un grand merci pour vos conseils scientifiques en chimie. Je tiens aussi à vous exprimer ma gratitude pour votre patience et votre bonne humeur qui ont fortement contribué aux résultats de ces travaux.

- **Claire DUFOUR**, merci beaucoup pour vos conseils scientifiques, pour vos encouragements quotidiens et votre disponibilité. Je tiens à vous adresser ma plus vive reconnaissance pour la passion que vous avez témoignée envers cette étude mais aussi pour votre patience et votre amitié, facteurs clé du succès de ces trois années de travaux.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble des membres de l'équipe « Chimie des antioxydants » qui ont partagé mon quotidien pendant ces trois années. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Michèle LOONIS pour sa sympathie et l'aide précieuse qu'elle m'a apporté pendant ces trois années. Je remercie aussi Catherine CARIS-VEYRAT, Michel CARAIL, Pascale GOUPY et Marie-José VALLIER pour leur sympathie et leur bonne humeur de tous les jours.

J'adresse aussi ma reconnaissance à l'ensemble du personnel de l'unité SQPOV. Je remercie plus particulièrement Christian GINIES pour m'avoir permis d'accéder à la CPG-SM et David PAGE pour sa

bonne humeur et pour avoir cru en moi sur les terrains de badminton. Je tiens également à remercier les deux SOSIs, Eric et Domi pour leur aide en informatique et les dépannages fréquents en fin de rédaction. Je remercie également Carine pour sa sympathie : en souvenir des agréables moments passés autour d'une sangria sur la Plaza Major à Salamanque.

Je tiens à adresser ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail :

- Martine ARMAND pour m'avoir fourni du suc gastrique et pour avoir répondu à mes nombreuses questions.

- Anne MEYNIER, Michelle VIAU, Marie-Hélène ROPERS pour l'accueil et les conseils qu'elles m'ont apportés lors de mes stages à l'INRA de Nantes.

- Christina SCACCINI et Fausta NATELLA et l'ensemble du personnel de l'INRAN qui m'ont accueillie trois mois en stage à Rome « Grazie mille per la vostra gentilezza »

- Stéphane GEORGE, Aurélie CERVAUX du CTCPA d'Avignon, partenaire socio-économique de cette thèse, pour leur participation à cette étude au travers des applications sur fruits et légumes.

Je tiens à exprimer chaleureusement ma reconnaissance à Marie-Gabrielle SCHWEIGHOFER pour m'avoir accompagnée dans la rédaction du Nouveau Chapitre de Thèse et pour m'avoir permis d'y voir plus clair sur mon avenir.

Je remercie très chaleureusement l'ensemble des stagiaires qui ont partagé mon bureau pendant ces trois années : - Céline, un grand merci pour ta gentillesse, pour ton amitié et ton soutien précieux dans les moments difficiles. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse : le rendez-vous est pris pour juin 2010 mais aussi bien avant j'espère!

- Eric, toute ma reconnaissance pour m'avoir réexpliqué les fondamentaux de la chimie organique. Bonne chance à toi pour cette dernière année.

- Charlotte, « l'une démarre tandis que l'autre termine ». Profite de chaque instant de ces trois années si passionnantes et bon courage à toi !

Enfin, mes pensées vont aussi vers toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer grâce à cette thèse : - Marion, ma partenaire de sport. Merci pour ta bonne humeur communicative et ton amitié si précieuse.

- Camille, merci pour ton amitié et ta gentillesse. Je te souhaite une bonne continuation à l'INRA où tu auras séjourné finalement plus longtemps que moi.

- Julia, Aurélie, Assia, Nicolas, Yann, Guillaume, Cyrille, Adrien et Audrey merci pour votre gentillesse et les bons moments passés en votre compagnie.

Abréviations

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride
ABTS	2,2-azinobis(3-éthylbenzothiaziline-6-sulfonate)
AG	acide gras
AGPI	acide gras polyinsaturé
ANOVA	analyse de variance
CLHP	chromatographie liquide haute performante
COMT	catéchol O-méthyl transférase
CPG	chromatographie en phase gazeuse
Cys	cystéine
$d_{[3,2]}$	diamètre en surface
$d_{[4,3]}$	diamètre en volume
DC	diène conjugué
DMSO	diméthylsulfoxyde
ERO	espèce réactive de l'oxygène
h/e	huile dans eau
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HDL	lipoprotéine de forte densité (<i>high density lipoprotein</i>)
HNE	4-hydroxy-2-nonène
K_a/pK_a	constante de dissociation acide
LDL	lipoprotéine de basse densité (<i>low density lipoprotein</i>)
LH	lipide polyinsaturé
LOH	lipide polyinsaturé alcool
LOOH	lipide polyinsaturé peroxydé
LPC	lysophosphatidylcholine
MDA	malondialdéhyde
MbFe ^{III}	metmyoglobine
MbFe ^{IV} =O	ferrylmyoglobine
m/z	masse/charge
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
p	niveau de probabilité (statistiques)
PE	phosphatidyléthanolamine
PC	phosphatidylcholine
PL	phospholipide
SAB	sérum albumine bovine
SAH	sérum albumine humaine
SM	spectrométrie de masse
SOD	superoxyde dismutase
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i> (micro extraction en phase solide)
T	température
Tr	temps de rétention
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TG	triglycéride
TL	trilinoléine
Trp	tryptophane
UA	unité arbitraire
UV	ultraviolet
VLDL	lipoprotéine de très basse densité (<i>very low density lipoprotein</i>)
vs	versus

SOMMAIRE GENERAL

Etude bibliographique

Chapitre 1

Modélisation chimique du bol alimentaire

Chapitre 2

Peroxydation lipidique dans les modèles chimiques du bol alimentaire
Inhibition par des polyphénols d'origine alimentaire

Chapitre 3

Etude structurale de la SAB en émulsion
Impact sur l'activation de MbFe^{III} par les hydroperoxydes

Chapitre 4

Applications des modèles gastriques à des aliments réels
Inhibition de la peroxydation lipidique par la quercétine en présence de suc
gastrique

Chapitre 5

Pouvoir antioxydant de 4-méthylcoumarines
Stage à l'étranger : INRAN, Rome

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

« La majorité des chercheurs ayant existé dans l'histoire sont actuellement en activité. »

Pierre Joliot, La Recherche Passionnément

Introduction	1
I. Les différentes catégories de lipides alimentaires et leur organisation	3
I.1 Les principales catégories de lipides alimentaires	3
I.1.1 Les acides gras	3
I.1.2 Les triglycérides	5
I.1.3 Les phospholipides	5
I.1.4 Le cholestérol	6
I.2 Les systèmes lipidiques modèles	7
I.2.1 Les émulsions	7
I.2.2 Les micelles, liposomes et bicouches lipidiques	8
II. Les mécanismes généraux de l'oxydation des lipides insaturés	10
II.1 L'amorçage	10
II.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	10
II.1.2 Les catalyseurs métalliques	14
II.1.3 Décomposition thermique des hydroperoxydes préformés	15
II.1.4 Les enzymes	15
II.2 La propagation	16
II.3 La terminaison	16
II.4 La formation des composés volatils	16
II.5 Exemple de l'oxydation de l'acide linoléique	17
III. Absorption et transport des lipides oxydés chez l'homme : conséquences biologiques	19
III.1 Mécanismes de digestion et de transport des lipides chez l'homme	19
III.1.1 Digestion des lipides dans l'estomac et l'intestin	19
III.1.2 Absorption des lipides et transport dans le plasma sanguin	19
III.2 Ingestion et absorption de lipides oxydés d'origine alimentaire	21
III.2.1 Origine des lipides alimentaires oxydés dans le tractus digestif	21
III.2.2 Biodisponibilité et absorption des produits d'oxydation lipidique	24
III.2.3 Conséquences de l'absorption des produits d'oxydation lipidique chez l'homme	27
IV. Les systèmes biologiques de défense antioxydante	33
IV.1 Qu'est ce qu'un antioxydant ?	33
IV.1.1 Systèmes enzymatiques de défense antioxydante <i>in vivo</i>	33
IV.1.2 Système de défense antioxydante <i>in vivo</i> , non enzymatique	35
IV.1.2 Les antioxydants d'origine alimentaire	38
IV.2 Les composés phénoliques	47
IV.2.1 Définition	47
IV.2.2 Les différents composés phénoliques et leurs principales sources	47
IV.2.3 Consommation journalière de polyphénols	53
IV.2.4 Biodisponibilité, absorption et métabolisme des polyphénols	55
IV.2.5 Mécanismes d'action antioxydante des polyphénols	60
IV.2.6 Propriétés biologiques et effets santé des polyphénols	65
IV.3 Les différentes méthodes de mesure de pouvoir antioxydant	72
IV.3.1 Mesure du transfert d'électrons et/ou d'atomes H vers un radical stable	72
IV.3.2 Les tests de compétition	74

<i>V. Objectifs de l'étude</i>	<hr/>	80
<i>Références bibliographiques</i>	<hr/>	83

Introduction

« Cinq à dix fruits et légumes par jour ! »

Cette recommandation, largement diffusée *via* les médias, découle du Programme National Nutrition Santé (PNNS), lancé en 2001 et reconduit de 2006 à 2010 (PNNS 2), dont l'objectif est d'améliorer l'état de santé de l'ensemble de la population en agissant sur l'un de ses déterminants majeurs qu'est la nutrition. Plusieurs questions se posent alors : Pourquoi consommer plus de fruits et légumes? Quels sont leurs effets sur la santé ?

Outre leur abondance en vitamines et en fibres et leur faible teneur en calories, la richesse des fruits et légumes en antioxydants (bêta-carotène, vitamines C et E, polyphénols...) est une des principales raisons à la recommandation du PNNS. De nombreuses études épidémiologiques suggèrent en effet que les antioxydants dont les polyphénols, omniprésents dans les fruits et légumes, mais aussi dans leurs produits dérivés (vin, thé) et dans les céréales pourraient exercer un rôle protecteur important contre les maladies cardiovasculaires voire contre certaines formes de cancers, *via* une alimentation riche en produits végétaux telle que l'alimentation méditerranéenne.

Le nombre de maladies dans lesquelles un processus d'oxydation préjudiciable pourrait intervenir comme inducteur est colossal. Celles-ci incluent des maladies de plus en plus courantes chez l'homme, comme les maladies cardio-vasculaires, le diabète et certaines formes de cancers, en relation avec l'importance croissante des lipides dans nos alimentations occidentales. Les lipides polyinsaturés sont en effet les cibles privilégiées des processus oxydants. Lourds de conséquences, ces processus interviennent par différents mécanismes, tout au long de la conservation des aliments, de leur préparation mais aussi de leur absorption et de leur digestion. Il apparaît ainsi essentiel de rendre compte de la diversité des lipides alimentaires (triglycérides, cholestérol et ses esters, phospholipides) et de leurs assemblages (phase continue ou dispersée).

L'oxydation lipidique des aliments, conduit à la formation de composés potentiellement néfastes et toxiques (hydroperoxydes, aldéhydes volatils, cétones, etc ...) pour l'homme. A tout le moins, elle nous prive de lipides polyinsaturés que nous sommes incapables de synthétiser dans nos cellules (acides gras essentiels).

« Comment ces composés, formés avant l'ingestion des aliments, ou directement dans l'organisme peuvent-ils entraîner des complications pour la santé ? »

L'implication des antioxydants au sein de l'organisme et leur action contre les différentes formes de stress oxydant pouvant se manifester apparaissent donc capitales.

« Quels moyens notre corps possède-t-il pour se défendre face aux phénomènes oxydants ? De quelle façon les antioxydants exogènes apportés par les aliments, et plus particulièrement les polyphénols, peuvent-ils exercer des effets protecteurs au sein du corps humain ? »

Cette étude bibliographique a pour but de répondre au mieux à l'ensemble de ces questions. Pour ce faire, elle insiste d'abord sur les différents lipides pouvant être ingérés lors d'un repas, les mécanismes d'oxydation conduisant à la perte de leurs qualités sensorielles et nutritionnelles, et leur conséquence sur la santé.

Elle présente alors, brièvement, les différents dispositifs de défense antioxydante que possède naturellement notre organisme. Les différentes catégories d'antioxydants apportés par les aliments, et plus particulièrement les polyphénols, objets de ce travail, sont ensuite exposées. Le métabolisme de ces derniers est également évoqué et révèle qu'après absorption intestinale, les polyphénols sont présents dans les fluides biologiques sous des formes modifiées. Les mécanismes antioxydants, supposés à l'origine des effets bénéfiques des polyphénols *in vivo* sont détaillés. S'ajoutent à cela quelques notions sur leurs implications dans certains mécanismes cellulaires. Cependant, du fait de la faible concentration des polyphénols entrant dans la circulation sanguine et distribués aux tissus (absorption intestinale partielle) mais aussi en raison des modifications structurales qu'ils subissent et qui typiquement abaissent leur pouvoir réducteur, cette étude bibliographique souligne les limites des effets antioxydants susceptibles d'intervenir au delà de la paroi intestinale et nous permet de présenter l'hypothèse supportant l'ensemble de ces travaux de thèse :

Les polyphénols pourraient exercer une protection antioxydante dans le tractus digestif, et ce dès le compartiment gastrique, où ils sont présents en fortes concentrations et sous leurs formes natives. Ils pourraient ainsi lutter activement contre l'oxydation, notamment des lipides, pouvant se produire dès l'estomac.

I. Les différentes catégories de lipides alimentaires et leur organisation

I.1 Les principales catégories de lipides alimentaires

Le terme « lipide » regroupe des substances organiques, insolubles dans l'eau, « huileuses ou grasses », extraites des cellules et des tissus par des solvants non polaires tels que le chloroforme. Les lipides les plus abondants sont les triglycérides (ou triacylglycérols) mais d'autres composés de structures variées, tels que les phospholipides ou le cholestérol appartiennent à cette catégorie.

I.1.1 Les acides gras

Les acides gras sont des acides organiques à longue chaîne (4 à 24 atomes de carbone généralement) comprenant une fonction carboxylique (-COOH) et une chaîne hydrocarbonée. Plus de 150 acides gras différents existent dans la nature. La majorité des acides gras sont caractérisés par un nombre pair d'atomes de carbone et les plus abondants sont de type C16 et C18. Il existe des acides gras possédant un nombre impair de carbone comme l'acide margarique (C_{17:0}) mais leurs teneurs dans les huiles végétales (tournesol, olive) sont généralement mineures (< 0,2 % des acides gras totaux). En fonction du type de liaison existant entre les atomes de carbone (liaison simple ou liaison double) les acides gras sont dits saturés ou insaturés. L'acide palmitique (C_{16:0}) et l'acide stéarique (C_{18:0}), abondants dans la plupart des graisses d'origine animale, appartiennent aux acides gras saturés. En revanche, l'acide oléique (C_{18:1}), composant majoritaire de l'huile d'olive (55 à 80%) est un acide monoinsaturé. L'acide linoléique (C_{18:2}), abondant dans l'huile de tournesol, présentant 2 doubles liaisons est polyinsaturé. Dans les acides gras, les doubles liaisons sont rarement conjuguées et séparées par un groupement méthylène (-CH=CH-CH₂-CH=CH-). Les acides gras existent naturellement dans une configuration *cis* ou Z. Le Tableau 1 illustre les acides gras les plus communs et indique leurs principales sources.

Tableau 1. Les principaux acides gras, leurs structures et sources alimentaires.

Nom systématique	Nom commun	Nombre de C	Nombre de doubles liaisons	Poids moléculaire	Principales sources alimentaires
Dodécanoïque	Laurique	12	0	200,31	Huile de coprah
Tétradécanoïque	Myristique	14	0	228,36	Produits laitiers
Hexadécanoïque	Palmitique	16	0	256,42	Huile de palme
Hexadécénoïque $\Delta 9$	Palmitoléique	16	1	254,39	Huile de noix de Macadamia
Octadécanoïque	Stéarique	18	0	284,47	Graisses animales
Octadécénoïque $\Delta 9^a$	Oléique	18	1	282,44	Huile d'olive, huile de pépin de raisin, beurre de karité Huiles de tournesol, de lin, de maïs, de soja,...
Octadécadiénoïque $\Delta 9-12$	Linoléique ($\omega 6$) ^b	18	2	280,43	Constituant des phospholipides (animaux)
Octadécatriénoïque $\Delta 9-12-15$	α -Linoléique ($\omega 3$)	18	3	278,41	Huile de noix, colza, soja
Eicosanoïque	Arachidique	20	0	312,5	Huile d'arachide, de germes de maïs
Eicosanoïque $\Delta 5-8-11-14$	Arachidonique ($\omega 6$)	20	4	304,45	Graisses animales
Eicosapentaénoïque	EPA ($\omega 3$)	20	5	302,45	Huiles de poissons (foie de morue, hareng, saumon)
Docosanoïque	Béhénique	22	0	340,57	Huiles d'arachide, de jojoba
Docosénoïque	Erucique	22	1	338,55	Colza, graines de moutarde
Docosahexaénoïque	DHA ($\omega 3$)	22	6	328,49	Huiles de poissons

^a : Δ : position du premier carbone portant la double liaison (numérotation à partir de la fonction acide).

^b : ω : position du premier carbone portant la double liaison (numérotation à partir de la fin de la chaîne carbonée)

Chez l'homme, certains acides gras ne sont pas synthétisés par l'organisme, ou en quantité insuffisante. Ces acides gras sont dits essentiels. Ils appartiennent en partie aux séries oméga-3 ($\omega 3$) et oméga-6 ($\omega 6$) (position du premier carbone portant la double liaison avec une numérotation à partir de la fin de la chaîne carbonée). L'acide linoléique, que l'on peut trouver dans l'huile de tournesol, de soja et l'acide α -linoléique, présent dans les graines et l'huile de lin et les noix sont les deux principaux acides gras considérés comme essentiels. Ils permettent à l'organisme la synthèse des acides gras de

longueur supérieure, nécessaires à la structuration cellulaire. Ces acides gras polyinsaturés ont donc un rôle bénéfique pour la santé mais leur sensibilité à l'oxydation leur confère également un potentiel toxique.

I.1.2 Les triglycérides

Les triglycérides ou triacylglycérols sont des lipides neutres composés d'une molécule de glycérol acylée par trois molécules d'acides gras (Figure 1).

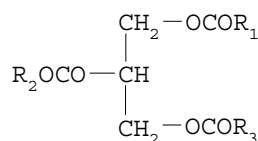


Figure 1. Représentation d'une molécule de triglycérides (R1, R2, R3 : chaînes d'acides gras).

Si les trois acides gras sont identiques, on obtient des triacylglycérols homogènes, nommés selon l'acide gras qu'ils contiennent (ex : tristéaroylglycérol ou tristéarine, triglycéride comprenant trois résidus d'acide stéarique). Les triglycérides constituent la catégorie de lipides la plus abondante dans les aliments. Ils possèdent un rôle biologique fondamental chez les animaux puisqu'ils constituent une réserve d'énergie très importante dans les tissus adipeux (énergie grâce aux acides gras, réserve grâce au glycérol).

La plupart des corps gras naturels sont constitués d'un mélange complexe de triglycérides de compositions variables. Les propriétés physiques et rhéologiques de ces mélanges sont ainsi très variables et difficiles à prédire. Une matière grasse comporte généralement à une température donnée un mélange de cristaux (triglycérides les plus saturés, sous différentes formes cristallines) en suspension dans une phase liquide plus riche en triglycérides insaturés. Les matières grasses ne présentent pas un point de fusion net mais une zone de fusion.

Les huiles végétales sont constituées à 100% de lipides, principalement sous forme de triglycérides. Elles se différencient des graisses par leur état liquide à température ambiante.

I.1.3 Les phospholipides

Les phospholipides sont des lipides contenant un groupement phosphate. Parmi les phospholipides, les phosphoacylglycérols ou glycérophospholipides possèdent une tête polaire et deux chaînes hydrophobes, ce qui leur confère un caractère amphiphile. Ce sont les principaux constituants

des membranes cellulaires, leur propriété amphiphile leur permettant de s'organiser en bicouche. La phosphatidylcholine (lécithine), la phosphatidyléthanolamine (céphaline), la phosphatidylsérine et la phosphatidylinositol, principaux phospholipides d'origine alimentaire sont représentés en Figure 2.

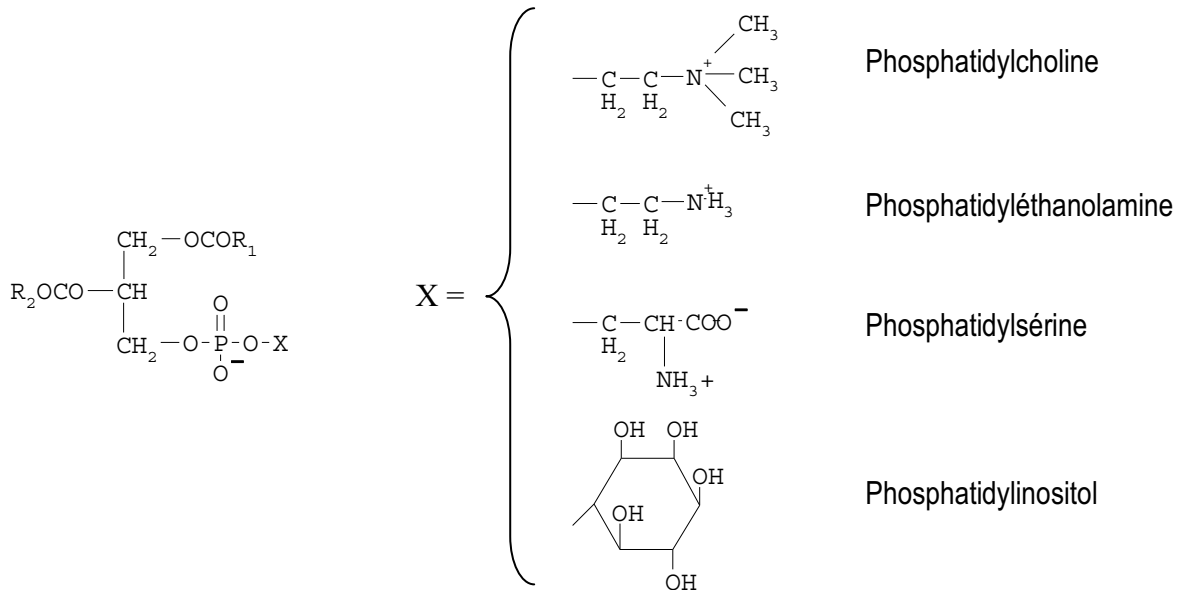


Figure 2. représentation des principales catégories de phospholipides.

1.1.4 Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques. La molécule de cholestérol comprend 4 cycles carbonés, notés A, B, C, D (Figure 3). Elle possède un groupement hydroxyle sur le carbone 3, qui peut être estérifié par un acide gras, saturé ou insaturé, rendant la molécule encore plus hydrophobe. Le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires et contribue à leur stabilité en s'intercalant entre les phospholipides. Il est également un précurseur de nombreuses molécules, la vitamine D3 (calcification des os), les hormones stéroïdes (cortisol, cortisone...), les hormones stéroïdes sexuelles (progestérone, œstrogène, ...).

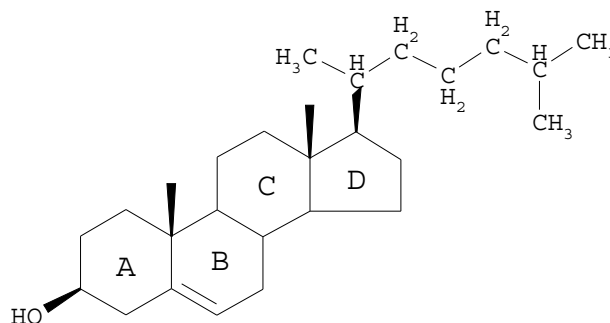


Figure 3. Représentation du cholestérol.

I.2 Les systèmes lipidiques modèles

I.2.1 Les émulsions

a) Définition

Une émulsion est constituée de deux liquides non miscibles l'un dans l'autre (ex : eau et huile), l'un dispersé dans l'autre sous la forme de gouttelettes. Dans la plupart des aliments, le diamètre de ces gouttelettes varie entre 0,1 μm et 50 μm . On trouve deux types de système, les émulsions huile dans eau (h/e ou o/w), pour lesquelles des gouttelettes d'huile sont dispersées dans la phase aqueuse (ex : la mayonnaise, le lait, la crème) et des émulsions eau dans huile (e/h ou w/o) constituées de gouttelettes d'eau dispersées dans une phase lipidique (ex : la margarine et le beurre).

b) Préparation

Pour augmenter la surface de contact entre la phase aqueuse et la phase lipidique et ainsi créer l'émulsion, un apport énergétique est nécessaire, c'est l'étape d'homogénéisation. Cet apport énergétique peut être effectué par agitation rapide à l'aide d'un homogénéisateur rotor-stator, par ultrasons (sonication) ou par hautes pressions.

c) Les émulsifiants

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables. Spontanément, une émulsion tend à retrouver l'état thermodynamiquement le plus stable pour lequel la surface de contact entre les phases est la plus faible, c'est à dire les deux phases séparées. Pour former des émulsions stables au cours du temps, des émulsifiants doivent être ajoutés avant homogénéisation. Les émulsifiants sont des molécules amphiphiles qui s'adsorbent à la surface des gouttelettes fraîchement formées durant l'homogénéisation, entraînant une baisse de la tension interfaciale et stabilisant ainsi le système. Ils forment une couche en surface des gouttelettes qui prévient leur rapprochement et leur coalescence. Les émulsifiants les plus communs sont les protéines amphiphiles (caséine, albumine, ...), les phospholipides (lécithine du soja ou du jaune d'oeuf) mais aussi les mono- et diglycérides, principaux émulsifiants à usage alimentaire (E471-E472). Les agents de texture, tels que les polysaccharides permettent aussi de maintenir les gouttelettes en suspension dans les systèmes émulsionnés, en augmentant la viscosité de la phase aqueuse et en atténuant l'effet des forces gravitationnelles. Les agents gélifiants créent un réseau tridimensionnel qui emprisonne les gouttelettes et ralentissent les phénomènes de floculation, crémage ou sédimentation.

La balance hydrophile-lipophile (HLB) constitue un indice pour évaluer l'aptitude d'un émulsifiant à stabiliser une émulsion h/e ou e/h. Elle est liée à la proportion des parties hydrophobes et des parties hydrophiles de la molécule. Pour des émulsifiants de faible poids moléculaire, la relation empirique suivante permet de calculer la HLB comme suit : $HLB = \text{poids de la partie hydrophile} / \text{poids de la partie hydrophobe} \times 20$. Cet indice ne donne toutefois qu'une première indication de l'efficacité d'un émulsifiant car il ne prend pas en compte certains paramètres tels que l'hydratation de la partie polaire ou les insaturations dans la partie lipophile.

La teneur et la composition de la phase huileuse, la concentration et la nature de l'agent émulsifiant, le pH de l'émulsion, la taille des gouttelettes dispersées sont différents paramètres influençant la sensibilité des lipides à l'oxydation.

1.2.2 Les micelles, liposomes et bicouches lipidiques

Les molécules détergentes ou agents tensioactifs, peuvent s'agréger spontanément en solution pour former une variété de structures stables thermodynamiquement, telles que les micelles, les bicouches ou les vésicules, illustrées en Figure 4. De telles structures se forment pour minimiser la surface de contact entre les régions polaires et non polaires. La nature précise des agrégats moléculaires formés est déterminée par la géométrie des molécules et les interactions des têtes polaires des surfactants.

a) Les micelles

Quand une molécule tensioactive est ajoutée à une solution aqueuse, elle vient s'adsorber en surface de la solution, diminuant ainsi sa tension de surface. Une fois la surface saturée, n'offrant plus d'espace à de nouvelles molécules, les molécules commencent à s'ordonner en structures organisées. Ainsi, les micelles se forment lorsque la concentration des molécules surfactantes dépasse la limite dite « concentration micellaire critique » (CMC). Les molécules tensioactives s'organisent en sphères de manière à ce que les chaînes apolaires ne soient plus en contact avec le milieu aqueux. Les micelles sont capables de solubiliser des molécules peu polaires comme les acides gras libres au sein de leurs cœurs hydrophobes.

b) Le liposome (ou bicouche lipidique)

Le liposome (ou bicouche lipidique) correspond à l'arrangement le plus favorable dans l'eau pour la plupart des agents tensioactifs bicaténaires (2 chaînes grasses) tels que les phospholipides. Le liposome correspond à un compartiment aqueux entouré par une bicouche lipidique. Il peut notamment être utilisé pour encapsuler diverses substances afin de les protéger d'une dégradation par les enzymes, ou d'une élimination par le système immunitaire. Les liposomes permettent aussi le passage de substances hydrosolubles à travers la barrière intestinale hydrophobe. Dans l'industrie pharmaceutique les liposomes sont de plus en plus utilisés pour la vectorisation de médicaments. La bicouche lipidique présente de nombreuses similitudes avec la membrane cellulaire naturelle et peut être mise à profit pour en étudier ses différentes propriétés : perméabilité, potentiel membranaire, interactions avec divers ligands.

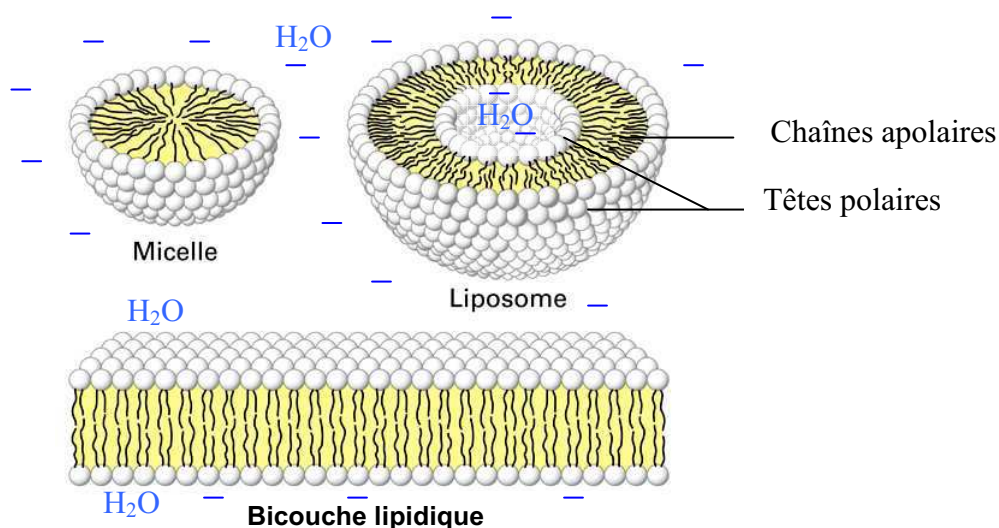


Figure 4. Arrangements possibles des lipides amphiphiles en milieu aqueux.

Source : <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255chem/mcb2.20.micelle.jpg>

II. Les mécanismes généraux de l'oxydation des lipides insaturés

La peroxydation lipidique est un phénomène biologique normal lorsqu'il intervient sous le contrôle d'enzymes (lipoxygénases, cyclooxygénases). Il conduit alors à des médiateurs chimiques importants (leucotriènes, prostaglandines) impliqués notamment dans la réaction inflammatoire. En revanche, la peroxydation lipidique non enzymatique est un processus délétère qui implique un ensemble de réactions radicalaires, caractérisé par trois phases, l'amorçage, la propagation et la terminaison [1]. Dans l'aliment, il conduit à la dégradation des qualités sensorielles et nutritionnelles. Chez l'homme, la formation de radicaux peroxydes ou d'aldéhydes, lors de l'oxydation des lipides dans les membranes biologiques ou les lipoprotéines du sang, serait un événement à l'origine de pathologies telles que les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires [2-4]. Ces derniers aspects seront développés dans la partie III de cette étude bibliographique.

II.1 L'amorçage

L'amorçage de la peroxydation des lipides polyinsaturés consiste en l'arrachement d'un atome H sur le groupement méthylène en α de deux doubles liaisons de la chaîne hydrocarbonée (H bis-allylique) pour conduire à un radical stabilisé par mésomérie [Eq.1].



L'amorceur radicalaire, X^\bullet , est de nature variable et requiert parfois pour sa formation un processus d'activation (lumière, chaleur, traces métalliques). En chimie, un radical libre est un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre, rendant cette espèce chimique beaucoup plus réactive que la molécule ou l'atome dont il est issu.

II.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

La majeure partie du dioxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente, en plusieurs étapes successives, conduisant à la production d'eau, au niveau de la chaîne de transport des électrons de la membrane interne mitochondriale [Eq.2].



Toutefois cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'espèces incomplètement réduites. Ainsi, environ 2% de O_2 subit une réduction monoélectronique conduisant à la formation de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), lui-même un précurseur du radical hydroxyle (HO^\bullet) beaucoup plus réactif [5]. Parmi les autres phénomènes qui peuvent entraîner la formation d'ERO, citons :

- la détoxification de xénobiotiques (enzymes impliquées dans la défense antimicrobienne : NADPH oxydase, chloroperoxydase...)
- l'autoxydation de neuromédiateurs (dopamine) et des thiols
- certaines étapes du métabolisme des purines (étape catalysée par la xanthine oxydase) et des lipides (étapes catalysées par les lipoxygénases et cycloxygénases).

a) Le radical hydroxyle HO[•]

Ce sont les ERO les plus dommageables en raison de leur extrême réactivité se traduisant par des constantes de vitesse de l'ordre de 10^8 à $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [5]. Leur durée de vie est extrêmement faible, aussi exercent-ils leur action directement sur leur lieu de production. Ils sont capables d'attaquer tous types de molécules chimiques et biologiques (ions métalliques, ADN, protéines, lipides ...) par divers mécanismes, soit en arrachant un électron [Eq.3] ou un atome d'hydrogène [Eq.4], soit en s'additionnant sur les doubles liaisons [Eq.5] [6].

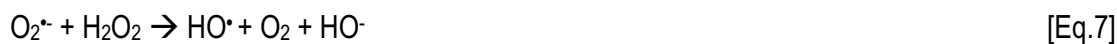


b) Le radical superoxyde O₂^{•-}

Paradoxalement, les radicaux superoxydes sont eux-mêmes peu réactifs vis-à-vis des substrats bioorganiques (constante de vitesse de l'ordre de $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ils sont produits au niveau de la chaîne de transport électronique des mitochondries mais aussi par des enzymes tels que les peroxydases, les cytochromes P450 et la xanthine oxydase. Ce sont des espèces dont la durée de vie est assez longue et qui peuvent diffuser bien au delà de leur lieu de production. Il existe néanmoins des systèmes physiologiques de detoxification : la SOD (superoxyde dismutase) dont O₂^{•-} est le substrat, capable de dismuter O₂^{•-} en H₂O₂ et O₂ [Eq.6] ou l'ascorbate, capable de réagir avec O₂^{•-} pour former le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le radical ascorbyle [5].



La toxicité des radicaux superoxydes semble plutôt s'exercer d'une manière indirecte. En effet, en réduisant le peroxyde d'hydrogène, les radicaux O₂^{•-} peuvent donner naissance à des radicaux HO[•], selon la réaction de Haber Weiss, catalysée par Fe³⁺ [Eq.7].



En outre, la dismutation spontanée des radicaux superoxydes est suffisamment rapide [Eq.6], même en l'absence de SOD ($k = 9,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) pour permettre l'accumulation de peroxyde d'hydrogène nécessaire à la réaction de Haber Weiss. Dans ce processus, $\text{O}_2^{\cdot-}$ réduit rapidement Fe^{3+} en Fe^{2+} , lequel est engagé dans la réaction de Fenton [Eq.8] avec production de radicaux hydroxyles.



Une autre réaction permettant de rendre compte de la toxicité des radicaux superoxydes est la recombinaison entre le radical superoxyde et d'autres radicaux libres, susceptible de donner naissance à des produits non radicalaires toxiques. C'est le cas en particulier de la réaction du monoxyde d'azote $\cdot\text{NO}$ avec le radical superoxyde qui conduit rapidement ($k = 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) à la formation de peroxyde d'azote $\text{O}=\text{N}-\text{OO}^{\cdot}$. En équilibre avec son acide conjugué ($\text{pK}_a = 6,8$), le peroxyde d'azote est un oxydant puissant (attaque de l'ADN, des protéines et des lipides) et un précurseur du radical HO^{\cdot} [7].

L'ion superoxyde peut également agir en tant que messager secondaire dans certains mécanismes de signalisation cellulaire. Il est notamment impliqué dans les phénomènes d'apoptose, dans la prolifération des cellules musculaires lisses, dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales ou encore dans l'agrégation des plaquettes.

c) Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène est produit par dismutation de $\text{O}_2^{\cdot-}$ mais peut également résulter de la réduction bi-électronique du dioxygène sous l'action d'oxydases. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase, qui catalyse la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et O_2 , ainsi que les glutathion peroxydases, qui catalysent la réduction par le glutathion du peroxyde d'hydrogène en eau. La majeure partie de la toxicité du peroxyde d'hydrogène provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle en présence de cations métalliques Fe^{2+} ou Cu^{2+} via la réaction de Fenton [Eq.8].

d) Le dioxygène singulet $^1\text{O}_2$

Le dioxygène singulet est un état excité de O_2 dans lequel les 2 électrons célibataires de O_2 (état triplet ou fondamental) sont désormais appariés. C'est un agent oxydant puissant, capable d'attaquer

rapidement des cibles biologiques comme les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Il peut se former lors de plusieurs processus physiologiques tels que la phagocytose ou la biosynthèse des prostaglandines. Il est aussi souvent généré par des réactions photosensibilisées, suivant le chemin réactionnel ci-après (S : photosensibilisateur) [6] [Eq.9.10.11] :



e) Autres ERO

D'autres espèces réactives de l'oxygène peuvent intervenir dans le stress oxydant. Par exemple, l'acide hypochloreux (HOCl), produit par la chloroperoxydase des enzymes du système immunitaire, est un précurseur du radical hydroxyle. En outre, les radicaux peroxydes (ROO[•]), les hydroperoxydes d'alkyle (ROOH) et les radicaux alkoxydes (RO[•]) sont des espèces oxydantes principalement formées lors de l'autoxydation des lipides. Les radicaux thiyles (RS[•]) formés par coupure homolytique des liaisons disulfures dans les protéines ou par oxydation monoélectronique de thiols sont également très réactifs et peuvent en présence de O₂ conduire à des radicaux peroxydes RSOO[•] [6].

f) Stress oxydant chez l'homme

Notre organisme produit donc en permanence des ERO qui ont un rôle physiologique important en agissant à faibles concentrations comme des messagers secondaires (phénomènes d'apoptose, activation des facteurs de transcription, modulation de l'expression de gènes de structure). Cependant dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production excessive de radicaux libres ou par une insuffisance des systèmes de défense antioxydante (enzymatiques et non enzymatiques). Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs d'ERO et systèmes de défense caractérise l'état de stress oxydant. *In vivo*, plusieurs systèmes biochimiques peuvent être à l'origine de la production accrue d'ERO. Citons par exemple l'altération de la chaîne de transport d'électrons (lors du vieillissement ou d'ischémie), l'activation des globules blancs sous l'action de xénobiotiques (virus, bactéries...), l'activation de la xanthine oxydase, l'oxydation de l'hémoglobine par O₂ ou encore la libération d'ions du fer à partir de leurs protéines de transport ou de stockage. De plus, l'environnement dans lequel nous vivons mais aussi nos modes de vie peuvent contribuer à une augmentation du stress oxydant. Une exposition prolongée au soleil, aux radiations, le contact avec des agents cancérigènes (amiante), la tabagisme, la prise de médicaments (pilule contraceptive), la pratique trop intense d'un

sport, la consommation excessive d'alcool, la pollution et le stress intellectuel sont autant de phénomènes favorisant la production d'ERO.

II.1.2 Les catalyseurs métalliques

Les métaux de transition comme le fer, le cuivre, le cobalt, présents dans notre organisme et dans l'alimentation existent dans des états multivalents. Ils constituent des catalyseurs très efficaces de la peroxydation lipidique. Ils peuvent amorcer l'oxydation par différents mécanismes, soit en réagissant directement avec le substrat lipidique (LH) (ex : cycle catalytique de la lipoxigénase), soit en décomposant des hydroperoxydes préformés (LOOH).

De faibles quantités d'hydroperoxydes lipidiques sont inévitablement présentes dans la plupart des assemblages incorporant des lipides polyinsaturés (membranes, LDL, aliments...). Les ions métalliques vont provoquer leur décomposition par coupure homolytique, générant des radicaux alkoxyles (LO•) [Eq.12] et peroxydes (LOO•) en fonction de leur état de valence [Eq.13].



Dans son état de valence le plus élevé, l'ion métallique peut aussi réagir directement avec l'acide gras (LH) et ainsi conduire à la formation de radicaux alkyles (L•) [Eq.14].



Dans le cas de la peroxydation amorcée par les ions du fer, des études ont montré que le taux initial de peroxydation doit prendre en compte la cinétique de la réaction directe entre l'ion métallique et l'acide gras [Eq.14] mais que la réaction de décomposition des hydroperoxydes lipidiques [Eq.12.13] qui se trouve ainsi enclenchée rend le processus initial rapidement négligeable [1].

L'ion ferreux peut en outre transférer un électron au dioxygène pour former l'ion superoxyde selon la réaction [Eq.15]:



Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'ion superoxyde peut ensuite réagir rapidement par dismutation pour former le peroxyde d'hydrogène, ce dernier conduisant par réaction de Fenton aux radicaux hydroxyles.

II.1.3 Décomposition thermique des hydroperoxydes préformés

L'homolyse directe des hydroperoxydes, selon la réaction de l'équation [Eq.16] est un phénomène extrêmement lent (énergie d'activation très élevée). Elle peut toutefois se produire sous certaines conditions drastiques, comme des températures élevées qui favorisent les réactions endothermiques [1].



II.1.4 Les enzymes

Dans les systèmes biologiques, la peroxydation lipidique peut se dérouler au niveau cellulaire suivant des procédés enzymatiques régio- et stéréosélectifs qui conduisent à des composés impliqués dans la signalisation cellulaire.

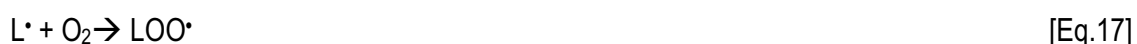
En particulier, les lipoxygénases, enzymes à fer non hémiques, présentes dans les tissus végétaux et animaux, sont capables de catalyser préférentiellement la peroxydation lipidique des acides gras non estérifiés de la série ω -6, acide linoléique pour les lipoxygénases végétales et acide arachidonique pour les lipoxygénases animales ou de la série ω -3 (acide linoléique pour les végétaux). Ce sont des dioxygénases qui incorporent O_2 en des sites spécifiques de la chaîne hydrocarbonée de l'acide gras. Ainsi, on distingue des 5-LOX, 12-LOX et 15-LOX. La 5-LOX est l'enzyme la mieux connue notamment pour son rôle dans la biosynthèse des leucotriènes [5].

Les cyclooxygénases sont des enzymes hémiques clés du métabolisme de l'acide arachidonique en eicosanoïdes (prostaglandines). On connaît plusieurs isoenzymes ; la COX1 est produite en permanence par l'organisme alors que la COX2 est produite en situation d'inflammation.

Lipoxygénases et cyclooxygénases catalysent des réactions hautement spécifiques, conduisant à la synthèse d'eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes pour les COX et leucotriènes pour les LOX), impliqués notamment dans la régulation de la contraction des muscles lisses, de l'agrégation des plaquettes et dans la médiation de la réaction inflammatoire.

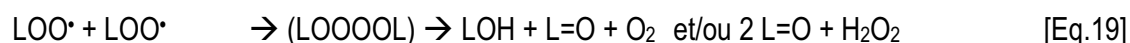
II.2 La propagation

Après l'amorçage, le mécanisme de propagation se met en place. Le radical carboné (L•) réagit rapidement avec le dioxygène pour former un radical peroxyde (LOO•) [Eq.17]. Ce dernier, très instable, réagit en arrachant un atome d'hydrogène labile à une deuxième molécule de lipide pour former un hydroperoxyde, « composé d'oxydation primaire », et de nouveau un radical carboné [Eq.18]. Un cycle de propagation est ainsi enclenché. Dans l'autoxydation à 60 °C de monocouches d'acide linoléique, il a été estimé que chaque radical formé donnait lieu à 8 à 14 cycles de propagation [1]. Ainsi, une seule espèce initiatrice peut conduire à la production de plusieurs molécules d'hydroperoxyde, ce qui illustre le caractère pernicieux de l'autoxydation non enzymatique ou chimique. Par opposition, dans le cycle redox des enzymes catalysant l'autoxydation des acides gras, le radical LOO• reste normalement séquestré dans la cavité pour y subir la réduction monoélectronique qui produit LOOH (1 seul équivalent) et replace l'enzyme dans l'état redox initial.



II.3 La terminaison

En fin de peroxydation (quand la concentration de LH devient faible), les radicaux LOO• tendent à se combiner entre eux pour former des produits non radicalaires de type alcool (LOH) ou cétones (L=O) [Eq.19]. Dans le cas d'un processus de peroxydation inhibé par un antioxydant, la terminaison peut aussi intervenir par transfert d'électron ou d'atome H de l'antioxydant vers le radical LOO• pour former LOOH [Eq.20.21]. Les antioxydants susceptibles d'extraire ainsi LOO• de son cycle de propagation sont dits 'briseurs de chaîne'.



II.4 La formation des composés volatils

Les produits d'oxydation primaires, de type hydroperoxyde (LOOH), peuvent subir sous l'effet de la chaleur ou de certains ions métalliques des réactions de coupure homolytique pour former des radicaux alkoxydes (LO•) susceptibles d'évoluer vers des dienylcétones (L=O) ou bien de se fragmenter

(clivage de liaison C-C) pour donner d'autres dérivés, dits composés secondaires, de type aldéhydes, époxydes, alcanes, alcènes et acides carboxyliques. Par ailleurs, les radicaux LO• peuvent être directement produits par addition de LOO• sur une double liaison d'un lipide insaturé suivie d'une réaction d'élimination avec formation de l'époxyde correspondant.

Très souvent, les produits d'oxydation lipidique volatils sont prélevés dans l'espace de tête des échantillons (huile, émulsion, etc...) par microextraction en phase solide (SPME). Cette méthode ne nécessite aucun solvant et permet de prélever les composés volatils à l'aide d'une fibre recouverte d'un revêtement polymérique adapté. Elle repose sur la partition des composés d'intérêt entre matrice et fibre. Une fois prélevés et après désorption, les composés volatils peuvent être identifiés et quantifiés par CG-SM. Ainsi, à partir d'huile de tournesol oxydée, de nombreux aldéhydes, responsables de l'odeur rance, ont pu être identifiés. Ils constituent la majorité des composés volatils détectés. Parmi eux, on trouve notamment le propanal, le butanal, le pentanal et l'hexanal. Dans ces mêmes échantillons, des alcools (1-octen-3-ol, pentanol) et des cétones (2-heptanone) ont aussi pu être identifiés [8-10].

Les aldéhydes sont eux même réactifs (caractère électrophile) et peuvent altérer protéines et acides nucléiques. Leur implication dans le développement de certains cancers et maladies cardiovasculaires a été suggérée dans plusieurs études [4, 11].

II.5 Exemple de l'oxydation de l'acide linoléique

L'autoxydation de l'acide linoléique conduit à la formation de 4 diénylhydroperoxydes isomères, les acides 9-hydroperoxy-(10*E*,12*Z*)-octadécadiénoïque, 13-hydroperoxy-(9*Z*,11*E*)-octadécadiénoïque, 9-hydroperoxyde-(10*E*,12*E*)-octadécadiénoïque et 13-hydroperoxy-(9*E*,11*E*)-octadécadiénoïque (Figure 5) [12].

Tout d'abord les atomes d'hydrogène en position bis-allylique (C₁₁) étant les plus labiles, ils sont cédés pour donner un radical pentadiényle délocalisé. L'addition du dioxygène en position 9 ou 13 de ce radical entraîne la conjugaison des doubles liaisons et la formation des radicaux (9*Z*,11*E*)-13-peroxyde et (10*E*,12*Z*)-9-peroxyde, puis par transfert d'hydrogène, la formation des hydroperoxydes correspondants. La rotation autour des liaisons C9-C10 et C12-C13, du radical pentadiényle permet la formation des hydroperoxydes de configuration 9- et 13-(*E,E*).

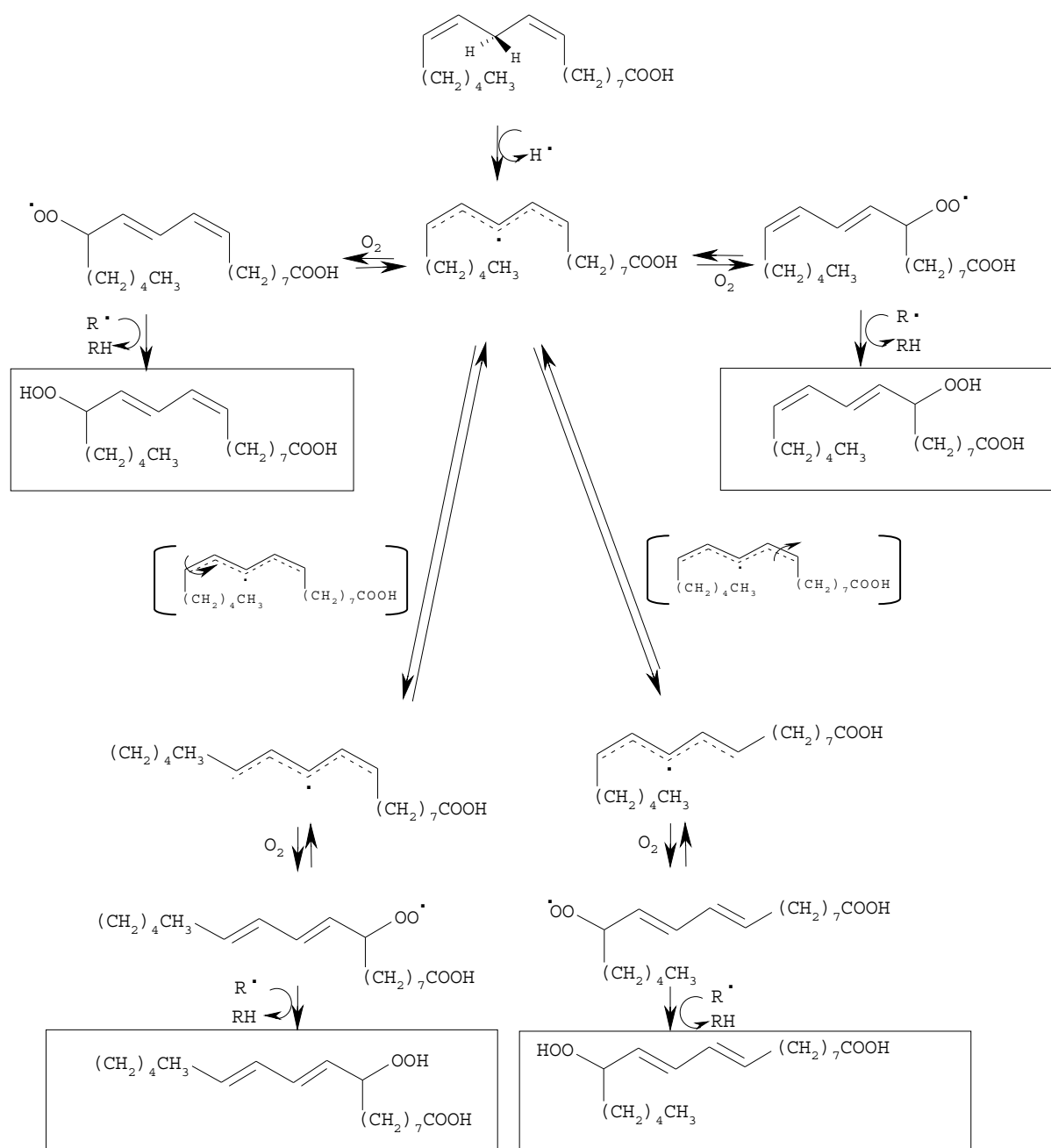


Figure 5. Mécanismes de formation des hydroperoxydes issus de l'acide linoléique.

D'après Niki *et al.* 2005 [12].

III. Absorption et transport des lipides oxydés chez l'homme : conséquences biologiques

III.1 Mécanismes de digestion et de transport des lipides chez l'homme

III.1.1 Digestion des lipides dans l'estomac et l'intestin

Les lipides constituent une source d'énergie importante dans notre alimentation occidentale puisqu'ils représentent 30 à 40% de l'apport calorique quotidien. Un adulte en consomme 60 à 120g par jour, dont 95% de triglycérides, 2 à 6 g de phospholipides et 0,2 à 0,6 g de cholestérol libre ou estérifié [13]. La digestion des lipides alimentaires débute dans l'estomac et s'achève dans l'intestin grêle avant absorption.

Dans l'estomac, les forces mécaniques de contraction péristaltique antrale mais aussi la présence de molécules amphiphiles comme les phospholipides, les protéines ou les acides gras libres, permettent la dispersion des lipides sous forme de gouttelettes dans le milieu aqueux gastrique : c'est l'étape d'émulsification. Après l'ingestion d'un repas test contenant de l'huile d'olive, des œufs et du saccharose, le contenu gastrique de 5 volontaires a été analysé après une heure de digestion. Une distribution monodale est observée avec la moitié des gouttelettes de diamètres compris entre 1 et 10 μm [14]. Dès l'estomac, une activité lipolytique a été mise en évidence, représentant 10 à 30% de l'activité lipolytique totale du pancréas. Les contributions relatives des lipases gastriques et pancréatiques durant la digestion des triglycérides alimentaires ont été estimées à 5-37% et 40-73% respectivement. L'activité de la lipase gastrique est primordiale dans la digestion des lipides pour plusieurs raisons. Elle favorise la mise en place de l'interface lipide/eau en générant des produits tensioactifs (acides gras libres) et prépare le terrain à la lipase pancréatique en générant des diglycérides, localisés davantage en surface des globules lipidiques et ainsi plus facilement hydrolysés par la lipase pancréatique [15, 16]. Les produits de dégradation intestinale des lipides (acides gras, monoglycérides, cholestérol...) sont enfin solubilisés sous forme de micelles mixtes de sels biliaires et de vésicules pour favoriser l'absorption par l'entérocyte [13].

III.1.2 Absorption des lipides et transport dans le plasma sanguin

Dans les cellules intestinales, des triglycérides sont re-synthétisés à partir des produits de dégradation intestinale (acides gras, monoglycérides, lysophospholipides, cholestérol, etc...) avant d'être transportés dans la lymphe vers le foie sous forme de lipoprotéines appelées chylomicrons.

Finalement, les triglycérides des chylomicrons sont hydrolysés en acides gras libres pour être stockés dans le tissu adipeux ou pour la production d'énergie dans les muscles par le processus de β -oxydation. La réserve d'acides gras dans le tissu adipeux peut aussi être mobilisée à des fins de production d'énergie. Les acides gras libres à longue chaîne sont alors déversés dans le sang où ils sont essentiellement associés à l'albumine, principale protéine plasmatique, pour être véhiculés jusqu'aux cellules. Ainsi, l'acide palmitique, l'acide palmitoléique, l'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique circulent dans le plasma sanguin à une concentration proche de 1 mM dont 99,9% sont liés à l'albumine. L'albumine (concentration plasmatique = 0,6 mM) lie en moyenne 1 à 2 acides gras à longue chaîne, avec des constantes d'association fortes variant de $69 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ pour l'acide stéarique à 10^7 M^{-1} pour l'acide arachidonique [17].

Les triglycérides sont véhiculés sous forme de lipoprotéines, édifices moléculaires formés d'un noyau composé de triglycérides et de cholestérol estérifié et entouré d'une monocouche de lipides (phospholipides, cholestérol) et d'une apolipoprotéine [18] (Figure 6).

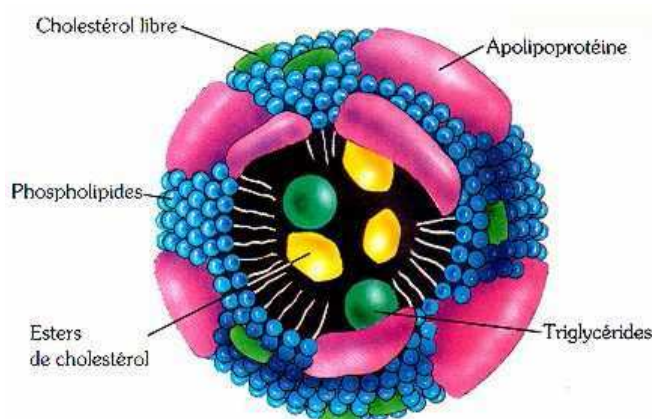


Figure 6. Représentation schématique d'une lipoprotéine.

Source : <http://www.prevention.ch/ima31305.jpg>

Plusieurs classes de lipoprotéines, différant par leur densité, ont été mises en évidence. Les chylomicrons de très faibles densités ($d < 0,94$), permettent la première étape de transport des lipides alimentaires exogènes, des entérocytes vers le foie. Les VLDL (very low density lipoprotein), d'origine hépatique, remettent ensuite en circulation les lipides (particulièrement sous forme de triglycérides) vers les tissus. Au fur et à mesure de leur circulation et de leur transport dans les fluides biologiques, les VLDL se convertissent en classes dérivées, IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein, riches en lipides, 'mauvais cholestérol') et HDL (high density lipoprotein, riches en protéines,

'bon cholestérol'). Les LDL, principaux transporteurs du cholestérol, sont les lipoprotéines les plus documentées et étudiées du fait de leur caractère athérogène [19, 20].

Ainsi la digestion, l'absorption et le transport des lipides alimentaires ont largement été étudiés et de nombreux mécanismes élucidés. Cependant, lors de la conservation des aliments, de la cuisson, et même lors des phases de digestion, les lipides alimentaires peuvent s'oxyder. Qu'en est-il de leur absorption sous cette nouvelle forme et de ses conséquences sur la santé humaine ?

III.2 Ingestion et absorption de lipides oxydés d'origine alimentaire

III.2.1 Origine des lipides alimentaires oxydés dans le tractus digestif

Les produits d'oxydation lipidique, détectés dans le tractus digestif, peuvent provenir de deux origines, exogène ou endogène.

a) Les principaux produits d'oxydation lipidique formés dans les aliments

Tous les aliments contenant des lipides (triglycérides, cholestérol) sont sensibles aux phénomènes d'oxydation lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures, à des radiations ou à des contraintes mécaniques (mélange) lors des traitements de conservation ou même lors de la cuisson. Des conditions sont atteintes qui vont permettre la production d'ERO (par exemple, par coupure homolytique de traces d'hydroperoxydes) et l'amorçage du phénomène de peroxydation lipidique. La conservation d'aliments pendant de longues périodes, en plus des effets dus aux procédés, peut également permettre une oxydation notable.

Plusieurs centaines de produits de décomposition, volatils et non volatils, ont été identifiés dans des huiles culinaires soumises à des fritures. La plupart sont des aldéhydes, produits de la coupure des hydroperoxydes en petits fragments de trois à neuf carbones (Figure 7). Parmi les 2-alcénals (aldéhydes α,β -insaturés), l'acroléine (prop-2-èneal) est un polluant de l'environnement (fumée de cigarettes, dégradation des plastiques,...), de loin le plus électrophile. L'acroléine est capable de réagir avec une variété de sites nucléophiles aussi bien sur les protéines que sur l'ADN, entraînant notamment des aberrations chromosomiques. Le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) est l'aldéhyde le plus courant, généré durant la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés $\omega 6$ (acide linoléique, acide arachidonique). L'oxydation lipidique des acides gras polyinsaturés $\omega 3$ génère, quant à elle, un

composé relativement proche, le 4-hydroxy-2-hexenal, dont la concentration dans plusieurs aliments (viande ou poisson) a été évaluée jusqu'à 120 μM . D'autres produits extrêmement réactifs, de structure di-aldéhyde et provenant de l'oxydation des acides linoléique et arachidonique sont formés durant l'oxydation des aliments. Ce sont principalement le glyoxal et le malondialdéhyde (MDA) [4], dont la concentration dans certaines viandes et poissons atteindrait 300 μM [21].

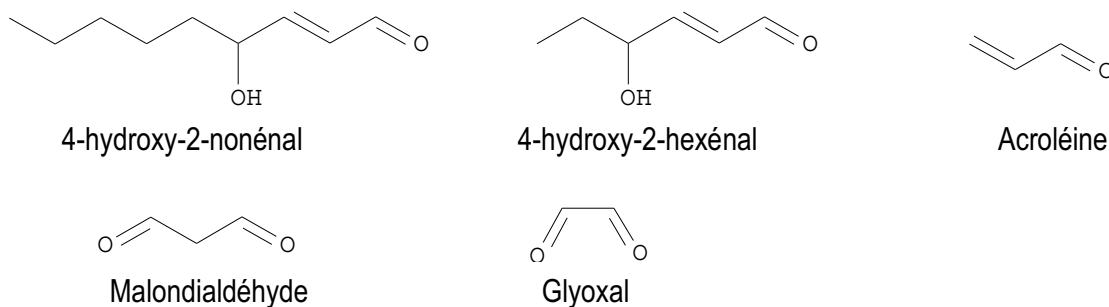


Figure 7. Structures chimiques des principaux aldéhydes réactifs, formés durant la peroxydation lipidique.

Parmi les aliments riches en cholestérol, on trouve naturellement les œufs frais et les œufs en poudre (largement utilisés dans de nombreux produits transformés), le lait en poudre (utilisé dans les formulations alimentaires infantiles et dans de nombreux autres produits industriels), le fromage et les produits laitiers, la viande rouge, les abats, etc.... Tous ces produits sont susceptibles de subir une oxydation, particulièrement les produits déshydratés soumis à des radiations ou à des hautes températures, ou ceux cuisinés en présence d'oxygène. Les procédés, mais aussi la conservation de longue durée, exposent les aliments aux espèces réactives de l'oxygène et favorisent la formation d'oxystérols, produits d'oxydation du cholestérol. Dans ce genre d'aliments déshydratés ainsi que dans les viandes précuites, la teneur en oxystérols peut atteindre 10 à 100 μM [21]. Les principales formes d'oxystérols issus de produits alimentaires sont des stérols 7-oxygénés (7-cétocholestérols, 7 α -hydroxycholestérol, 7 β -hydroxycholestérols) et des stérols 5 α ,6 α -oxygénés (5 α ,6 α -époxycholestérol, 5 β ,6 β -époxycholestérols, cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol) (Figure 8) [3].

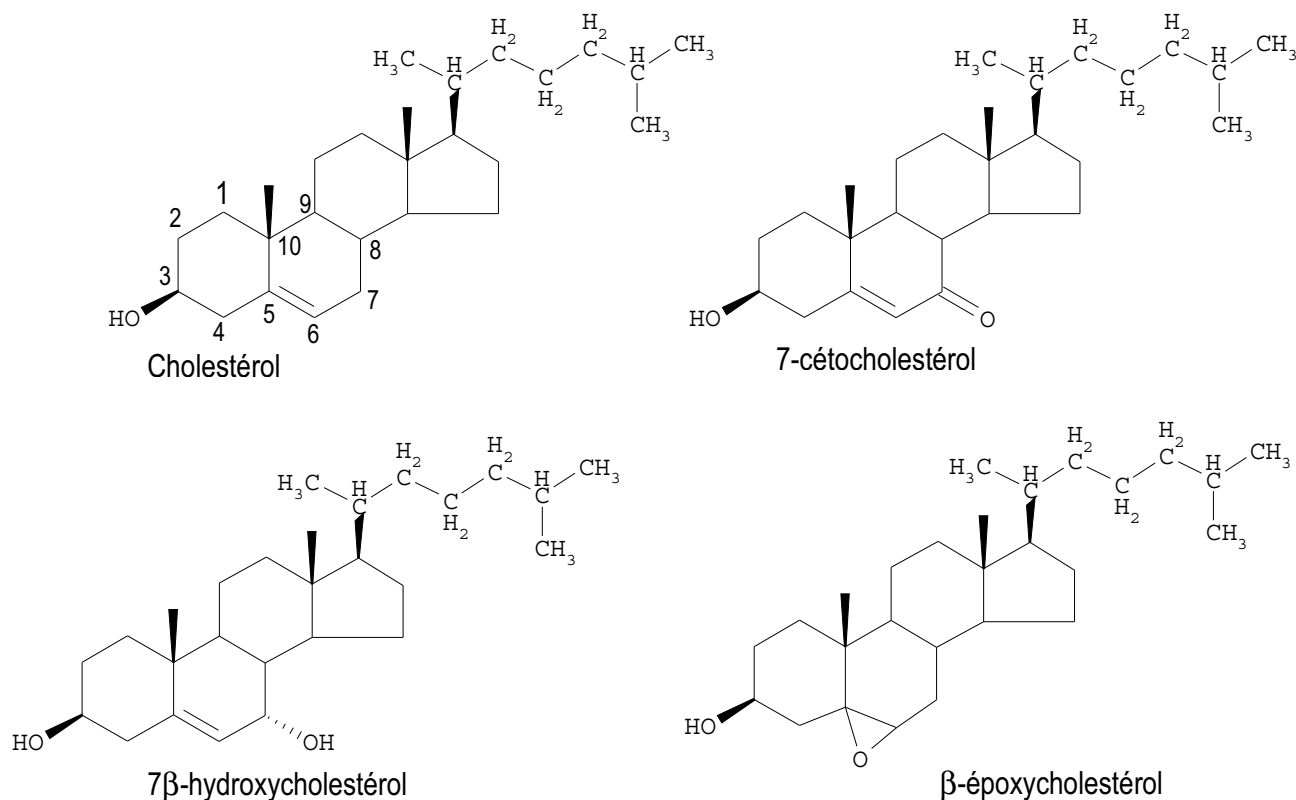


Figure 8. Structure chimique de quelques oxystérols

Une partie des produits d'oxydation lipidique détectés dans le tractus digestif provient donc des aliments contenant des triglycérides ou du cholestérol oxydés. De plus, lors de la digestion, l'estomac rassemble toutes les conditions pour favoriser l'oxydation des aliments, contribuant très certainement à l'oxydation des lipides.

b) L'estomac : un milieu prooxydant

Dans l'estomac, qualifié de "bioréacteur" par Kanner et Lapidot, toutes les conditions sont réunies pour favoriser l'oxydation. Le pH acide et la présence de dioxygène, d'ions du fer libre (faiblement complexés) ou de protéines hémiques d'origine alimentaire telles que la myoglobine (viande rouge) en font un milieu prooxydant [22]. Ainsi l'estomac, qui reçoit des aliments mastiqués et qui est en contact avec l'atmosphère durant le temps du repas représente un environnement aérobie. Il a été montré que l'incubation dans le fluide gastrique de viande rouge homogénéisée et de lipides oxydables (acide linoléique) entraînait un processus d'autoxydation générant de fortes concentrations d'hydroperoxydes (2000-5000 μM après 180 min) et de MDA (120 μM). En effet, la myoglobine et le fer libre contenus dans les tissus musculaires accélèrent les réactions d'oxydation [23]. Les lipides ingérés, déjà peroxydés ou non, sont donc soumis à un stress oxydant qui conduit à la formation de composés

d'oxydation primaire de type hydroperoxydes, puis à la formation de composés d'oxydation secondaires de type aldéhydes, alcools ou époxydes.

Des études sur le rat ont montré que les hydroperoxydes issus de la trilinoléine (TL-OOH) n'atteignent jamais l'intestin sous cette forme. Ils sont d'abord hydrolysés sous forme d'hydroperoxydes d'acide linoléique (LA-OOH), *via* les lipases gastriques, avant d'être décomposés en produits d'oxydation secondaires dans l'estomac. Les produits majoritairement formés sont des alcools dérivés de l'acide linoléique, des époxycétones et des aldéhydes (hexanal) [24].

III.2.2 Biodisponibilité et absorption des produits d'oxydation lipidique

a) Les études sur les animaux

➤ **Absorption des triglycérides oxydés**

La continuité des travaux sur le rat a montré que c'est sous la forme aldéhyde que les lipides d'origine alimentaire sont partiellement absorbés par l'intestin puisqu'une accumulation d'hexanal et de 4-hydroxynonéal a été détectée dans le foie des rats. La toxicité des produits de la peroxydation lipidique serait donc due aux aldéhydes, produits par décomposition gastrique des hydroperoxydes et des composés d'oxydation de plus haut poids moléculaire (alcools, époxycétones) [25]. D'autres études sur le rat, utilisant de l'acide linoléique oxydé et non oxydé marqué au carbone 14, ont mis en évidence que les lipides oxydés issus de l'alimentation étaient distribués dans les chylomicrons dans les mêmes ratios que des lipides non oxydés pour être ensuite délivrés au foie. L'assimilation hépatique de l'acide linoléique non oxydé et oxydé est similaire. Elle représente approximativement 15% de l'acide linoléique (non oxydé et oxydé), 30 minutes après l'administration intraveineuse de chylomicrons. L'acide linoléique oxydé et marqué au carbone 14 est alors utilisé par le foie de façon similaire à l'acide linoléique non oxydé pour la synthèse de triglycérides et de phospholipides, incorporés dans les VLDL. Il est ainsi clair que les lipides oxydés de l'alimentation peuvent affecter le niveau d'oxydation des lipoprotéines endogènes [26].

L'analyse par RMN d'urines de rats, ayant été gavés avec des aldéhydes α,β -insaturés (trans-2-nonéal et trans-2-pentéal), a permis de vérifier l'absorption intestinale des aldéhydes et de comprendre leur métabolisme [27]. Il a ainsi été montré que les trans-2-alcénals, composés issus de l'autoxydation des acides gras polyinsaturés, étaient rapidement absorbés par l'intestin pour rejoindre la circulation systémique, où ils étaient conjugués au glutathion (addition de GSH sur le centre C3 électrophile de la double liaison C=C) avant d'être excrétés dans les urines [27].

➤ **Absorption du cholestérol oxydé**

D'autres auteurs se sont penchés sur l'étude de l'absorption des différentes formes de cholestérol oxydé (7 β -hydroxycholestérol, 7-cétocholestérol, 5 α ,6 α -époxycholestérol, 5 β ,6 β -époxycholestérol) chez le rat. De façon générale, les oxystérols sont incorporés substantiellement dans les chylomicrons, mais des différences sont observées selon le type d'oxystérol [28, 29]. Par exemple, l'absorption du 7 β -hydroxycholestérol a été évaluée à environ 8%, avec un pic maximal à 3 heures alors que le 5 β ,6 β -époxycholestérol n'a pas été détecté dans les chylomicrons [29]. L'absorption à travers la barrière intestinale diffère donc selon les produits d'oxydation du cholestérol. Contrairement à l'étude précédente portant sur l'absorption de l'acide linoléique oxydé, il a été montré que l'absorption du cholestérol natif était plus efficace que celle du cholestérol oxydé. La principale raison à ce phénomène serait la présence des groupements hydroxy-, céto- ou époxy-, qui inhiberait l'étape d'estérification dans le petit intestin, étape-clé dans l'absorption des stérols. De façon surprenante, il a été remarqué que la présence des oxystérols dans un infusât gastrique, contenant également des triglycérides et du cholestérol natif, augmentait la sécrétion de triglycérides et de cholestérol natif dans les chylomicrons. Ce phénomène ne s'est pas traduit par une biosynthèse plus importante de chylomicrons (augmentation de leur nombre) mais par une modification de leur taille, passant de 179 nm à 294 nm. Une telle augmentation de taille entraînerait un retard de leur élimination et une durée d'exposition plus longue dans le plasma.

b) Les études sur l'homme

Même si elles sont plus limitées, les études sur l'homme confirment globalement les résultats observés sur les animaux. L'absorption d'acides gras et de cholestérol oxydés a ainsi été vérifiée par plusieurs études.

➤ **Absorption des triglycérides oxydés**

La première hypothèse est une absorption directe des aldéhydes au niveau du tissu gastrique. Certains auteurs ont en effet, mis en évidence la présence de HNE dès la muqueuse gastrique [30].

La seconde hypothèse plus communément vérifiée concerne l'absorption au niveau de la muqueuse intestinale.

Suite à l'ingestion d'un repas contenant de l'huile de maïs chauffée, des acides gras oxydés incorporés dans les chylomicrons postprandiaux ont été détectés, par la mesure des diènes conjugués,

en quantité proportionnelle à celles observées dans l'huile initiale [31]. Cette observation a permis de démontrer l'absorption par l'intestin grêle des acides gras oxydés et leur réarrangement dans les chylomicrons pour être transportés dans la circulation sanguine. En revanche et de façon étonnante, l'augmentation de la concentration d'acides gras oxydés observée dans les chylomicrons n'a pas été suivie par une augmentation des acides gras oxydés dans les autres fractions lipoprotéiques (VLDL, HDL et LDL).

➤ **Absorption du cholestérol oxydé**

Chez l'homme, il a été montré que l' α -époxycholestérol ingéré lors d'un repas test était absorbé au niveau de l'intestin grêle et incorporé dans les chylomicrons, puis dans les lipoprotéines LDL et HDL, contribuant ainsi directement aux lipoprotéines oxydées circulantes [32].

Après l'ingestion d'un repas naturellement riche en oxystérols (salami et parmesan), les fractions chylomicrons, VLDL, LDL et HDL ont été analysées à partir du plasma de cinq volontaires [33]. L'augmentation plasmatique des oxystérols a été observée 6 heures après l'ingestion du repas avec un maximum à 8 heures, confirmant l'absorption des produits issus de l'oxydation du cholestérol. Ces travaux ont aussi corroboré l'hypothèse d'une sélectivité dans l'absorption des oxystérols mise en évidence lors d'une étude sur le rat [29]. En effet, la comparaison de la composition du repas en oxystérols avec celle des chylomicrons a montré que le cholestanetriol, le 7-cétocholestérol et dans une proportion moindre, l' α -époxycholestérol étaient sous-représentés dans les chylomicrons contrairement au 7 β -hydroxycholestérol.

Ces études tendent donc à montrer que les produits d'oxydation lipidique issus des triglycérides ou du cholestérol de l'alimentation seraient absorbés par l'intestin avant de gagner la circulation sanguine, *via* les différentes catégories de lipoprotéines. De plus, il semble que les LDL soient les principales lipoprotéines porteuses d'hydroperoxydes lipidiques, la raison majeure étant leur forte concentration dans la plasma [34]. Depuis plusieurs années, ces composés oxydés ont reçu une attention toute particulière : en effet certains auteurs s'interrogent sur leur implication dans un certain nombre de maladies, telles que les inflammations chroniques, les maladies neurodégénératives, les syndromes de détresse respiratoire, le diabète, certains types de cancer et bien sûr l'athérosclérose.

III.2.3 Conséquences de l'absorption des produits d'oxydation lipidique chez l'homme

a) Implication dans l'athérosclérose

De nombreuses études suggèrent que les lipides oxydés issus de l'alimentation peuvent contribuer à la pathogenèse de l'athérosclérose [35, 36]. En effet, l'accumulation de lipides oxydés dans les lésions athérosclérotiques est fréquemment rapportée.

Sur ce point, les résultats les plus convaincants proviennent des expériences d'alimentation menées sur les animaux. L'ajout d'acides gras et de cholestérol oxydés à la nourriture de lapins a entraîné l'augmentation de la formation de stries lipidiques dans les aortes de lapins [31]. Un événement clé dans le processus athérosclérotique est la formation de cellules spumeuses dans l'intima de la paroi artérielle. Ces cellules spumeuses sont dérivées de macrophages transformés qui ont absorbé des LDL oxydées et modifiées (par couplage covalent entre les aldéhydes lipidiques et les sites nucléophiles de la partie protéique) *via* un récepteur non régulé ('scavenger receptor') dans le cadre d'un processus de détoxification [37].

Les LDL oxydées présentent un mélange complexe d'hydroperoxydes, d'oxystérols et d'aldéhydes. Le couplage covalent entre les aldéhydes et l'apolipoprotéine B, et en particulier les adduits HNE-histidine ou MDA-lysine localisés en surface des particules de LDL, serait responsable de modifications permettant la reconnaissance par les récepteurs des macrophages [4]. L'accumulation de cellules spumeuses dans l'espace subintimal des artères majeures conduit à des stries lipidiques et à la formation concomitante de plaques athérosclérotiques. Le dépôt intense de lipides et la nécrose de cellules perdurent pendant de longues périodes sous la couche épithéliale, mais avec le temps, il s'étend, conduisant éventuellement à des dommages irréversibles des cellules endothéliales vasculaires, à l'agrégation et à l'adhésion des plaquettes et à des événements thrombotiques (Figure 9).

L'athérosclérose est caractérisée par une inflammation intense, une toxicité locale et une fibrose exagérée. Ces phénomènes se déroulent *via* des mécanismes de régulation ou sur-régulation cellulaire et ont pu être mis en relation avec certains composés lipidiques oxydés tels que le HNE ou les oxystérols.

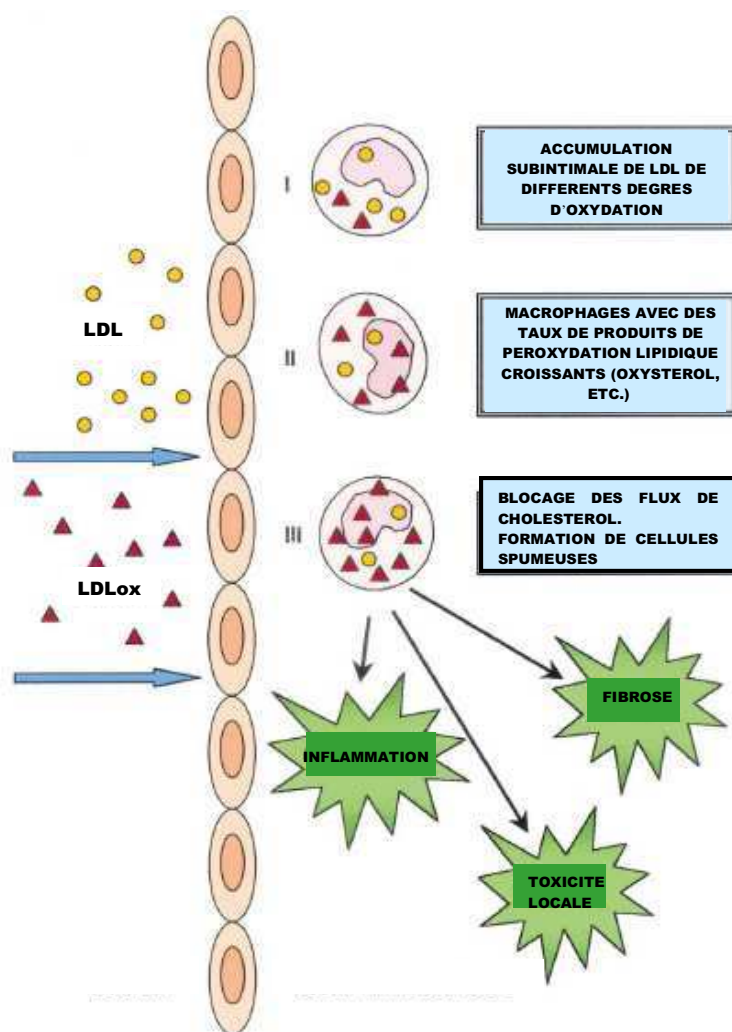


Figure 9. Diagramme schématisé de la phagocytose des particules de LDL oxydées. Dans l'espace subintimal de la majorité des artères, la phagocytose des particules de LDL, préalablement oxydées dans le lumen ou subissant une oxydation avec formation concomitante de produits d'oxydation lipidique, tels que les oxystérols, module les événements patho-biologiques qui sont corrélés au processus athérosclérotique. Par Leonarduzzi *et al.* 2002 [3].

Effets pro-inflammatoires et toxiques des oxystérols et du HNE

Les LDL oxydées sur-réguleraient l'expression de cytokines inflammatoires telles que les interleukines-1 et 8 et le facteur α de nécrose tumorale (TNF- α) dans les cellules monocytes. Dans les cellules endothéliales et les cellules des muscles lisses, c'est l'action des chimiokines (MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1) qui est intensifiée. Cependant, il reste à préciser quelles composantes des LDL oxydées sont responsables de ces effets.

Il a été montré que les oxystérols s'accumulent dans l'espace subintimal, constituant un stimulus qui induirait l'inflammation. Leur rôle pro-inflammatoire semble se manifester à différents niveaux, *via* l'adhésion cellulaire endothéliale (induction de l'expression de différentes molécules d'adhésion) et l'extravasation des leukocytes. Ils auraient aussi la capacité de modifier la mort programmée des cellules. Les oxystérols induiraient notamment la mort des macrophages, ce qui pourrait expliquer pourquoi le cholestérol et les autres lipides s'accumulent dans la paroi artérielle sans en être éliminés par phagocytose [3].

Le 4-hydroxynonéal (HNE), produit terminal de décomposition oxydante des acides gras polyinsaturés ω -6, a aussi été détecté dans les LDL oxydées et les plaques fibrotiques de l'homme. Ce composé serait impliqué dans la pathogénèse de l'athérosclérose par des mécanismes cellulaires de sur-régulation d'expression de facteurs, tels que le facteur TGF β 1 (transforming growth factor), ou le MCP-1 (monocyte chemotactic peptide-1), impliqués dans les processus d'inflammation. Il a été montré que le HNE activait à la fois les macrophages et les cellules des muscles lisses, les deux types de cellules clé dans les processus inflammatoires chroniques caractérisés par une fibrogénèse excessive [11].

b) Effet mutagène et carcinogène des lipides oxydés et des protéines hémiques

L'étude de la relation entre lipides oxydés et cancer reste moins bien établie que dans le cas des maladies cardiovasculaires. Elle se limite dans la plupart des cas à des travaux *in vitro*, sur des modèles cellulaires ou sur des animaux.

Toutefois, une étude récente a considéré le stress oxydant et le statut antioxydant de 56 patients atteints de cancer du poumon [38]. Il a été montré que deux marqueurs plasmatiques sont liés à cette forme de cancer et permettent de discriminer des patients sains de patients malades. Ainsi, une forte concentration de malondialdéhyde et une faible capacité antioxydante totale du plasma (mesurée par le radical-cation ABTS^{•+}) semblent associées à la maladie, confirmant ainsi l'implication d'un stress oxydant dans la pathologie de certaines formes de cancer chez l'homme.

Les effets mutagènes des lipides oxydés envers l'ADN et leur capacité à modifier certaines protéines pourraient être un des mécanismes impliqués dans la carcinogénèse. L'incidence, dans ce type de pathologie, des protéines hémiques, connues pour leurs effets prooxydants, confirmerait la relation entre lipides oxydés et cancer.

➤ **Effet mutagène des lipides oxydés**

Beaucoup de travaux confortent l'hypothèse du rôle des ERO dans l'amorçage, la promotion et la progression de tumeurs cancéreuses. La plupart des produits issus de la peroxydation lipidique (hydroperoxydes, aldéhydes,...) sont des agents toxiques et mutagènes potentiels et pourraient être carcinogènes en réagissant avec l'ADN. En effet, les ERO peuvent attaquer l'ADN et entraîner l'oxydation des bases azotées mais aussi des unités désoxy-D-ribose allant ainsi jusqu'au clivage de l'ADN [39].

Les protéines peuvent aussi subir des dégâts par modification des acides aminés ou des clivages de liaisons peptidiques [40]. Ceci résulte en des dysfonctionnements de nombreuses enzymes incluant la cytochrome C oxydase, la glutathione oxydase et la catalase réduisant ainsi leur capacité à éliminer les ERO. Il apparaît que les ERO peuvent aussi affecter l'activité de kinases qui catalysent la phosphorylation de diverses protéines et enzymes et qui ont un rôle clé dans la croissance et la division cellulaire.

Les produits secondaires d'oxydation lipidique, tels que les aldéhydes, les composés dicarbonylés et l'acroléine sont également des mutagènes potentiels. Leurs effets peuvent être dus autant à leur ingestion qu'à leur inhalation *via* les vapeurs produites lors des procédés de cuisson [4].

➤ **Lipides oxydés, protéines héminiques et cancers**

La consommation de viande rouge, contrairement à celle de viande blanche ou de poisson, est fréquemment associée à une augmentation des risques de cancers du côlon. La présence de protéines héminiques (myoglobine, hémoglobine), en concentration dix fois supérieure à celle de la viande blanche, et les propriétés oxydantes de ces dernières en seraient les principales raisons. Ces protéines sont digérées dans le tractus digestif supérieur, délivrant l'hème qui contient l'ion ferreux dans le côlon.

Plusieurs études sur le rat ont mis en évidence la relation entre un régime alimentaire composé d'huile de carthame et d'hémoglobine ou d'hématine et le cancer du côlon. La consommation simultanée d'huile de carthame, une des huiles végétales contenant le plus d'acides gras polyinsaturés et de ce fait, facilement oxydable, et de protéines héminiques a été choisie pour simuler l'ingestion de viande au cours d'un repas occidental [41, 42]. Chez le rat, la prise d'hématine et d'hémoglobine a entraîné une augmentation dose-dépendante de la taille des foyers de cryptes aberrantes, lésions précancéreuses du cancer du côlon. En parallèle, une augmentation des TBARS et de la cytotoxicité (évaluée par le pourcentage d'ion potassium relargué par des érythrocytes) des liquides fécaux a été

enregistrée [42]. La génération spécifique de radicaux peroxydes lipidiques LOO^{\bullet} par les protéines héminiques serait responsable de la cytotoxicité observée [41].

Enfin, certaines études, menées en parallèle sur l'homme et sur le rat, ont mis en évidence que la concentration de métabolites de produits terminaux de la peroxydation lipidique (tels que l'acide mercapturique-1,4-dihydroxynonane, un métabolite du 4-hydroxynonanal) dosés dans les excréments urinaires augmente après supplémentation de protéines héminiques, parallèlement au nombre de lésions prénéoplasiques. Ces études mettent ainsi en évidence de nouveaux bio-marqueurs du cancer du côlon associés à un processus oxydant [43].

La présence de lipides oxydés (associée ou non à celle de protéines héminiques) au sein du tractus digestif semble donc entraîner une augmentation des risques de cancer du côlon. Les mécanismes cellulaires à l'origine de ces phénomènes ne sont pas totalement élucidés. Si la génération d'ERO est corrélée avec le processus de promotion tumorale, cette dernière doit être inhibée par les antioxydants. Au cours d'expériences animales, l'ion calcium, l'huile d'olive et certains antioxydants (rutine et butylhydroxyanisole ou BHA) associés à la consommation de protéines héminiques ont clairement prévenu l'effet cancérigène potentiel dû à la viande rouge [42]. De plus, quelques études épidémiologiques suggèrent que certains composés phénoliques des aliments posséderaient un effet protecteur contre les risques de cancer humain [44]. La Figure 10 synthétise de façon très schématique l'ensemble des étapes qui pourraient relier l'exposition à des lipides oxydés d'origine alimentaire et le développement de l'athérosclérose ou des cancers chez l'homme.

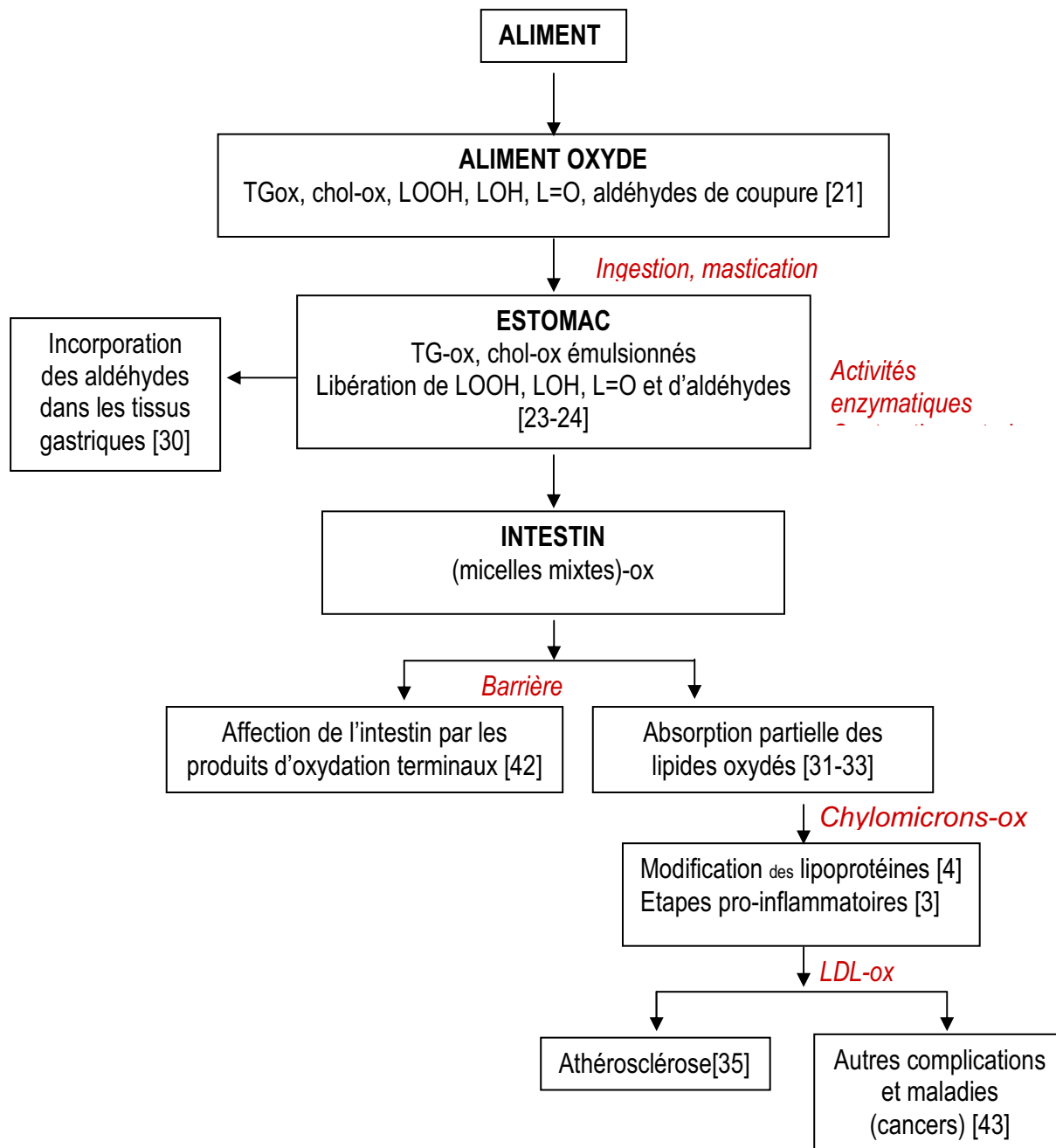


Figure 10. Principales étapes pouvant conduire au processus d'athérosclérose ou à d'autres pathologies après ingestion d'aliments riches en lipides.

IV. Les systèmes biologiques de défense antioxydante

IV.1 Qu'est ce qu'un antioxydant ?

Le terme antioxydant est souvent utilisé dans la presse et dans la littérature scientifique mais il est rarement défini. Une définition assez large est « Toute substance qui retarde ou inhibe significativement les dégâts oxydants d'une molécule cible » [45]. Pour mériter le terme d'antioxydant, la protection devra opérer à des rapports molaires molécule cible/antioxydant typiquement supérieurs à 100. Cette propriété leur permet d'agir de façon directe ou indirecte en tant que moyens de défense contre les ERO [46]. Les molécules cibles incluent chaque type de biomolécules, lipides, protéines, glucides et acides nucléiques.

Les différents types d'agents prooxydants existant dans la nature requièrent des systèmes de défense antioxydante utilisant des stratégies variées. Les antioxydants peuvent protéger leur cible par différents mécanismes en :

- piégeant les espèces réactives de l'oxygène (ERO), *via* des processus enzymatiques ou chimiques
- chélatant sous forme inerte les ions de métaux de transition, comme $Fe^{2+/3+}$ et Cu^{+2+} , capables d'entrer dans des cycles redox qui produisent des ERO (autoxydation des ions de basse valence, réaction de Fenton).
- inhibant les enzymes impliquées dans la production des ERO
- régénérant des antioxydants naturels (ex : α -tocophérol)

Les systèmes de défense antioxydante sont nombreux et de nature différente. Certaines molécules antioxydantes sont synthétisées par l'organisme comme le glutathion ou l'ubiquinol, alors que d'autres sont d'origine alimentaire, comme par exemple les vitamines antioxydantes (C et E), les caroténoïdes ou les composés phénoliques.

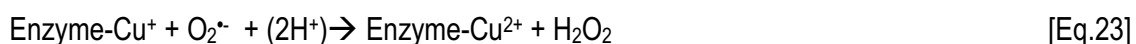
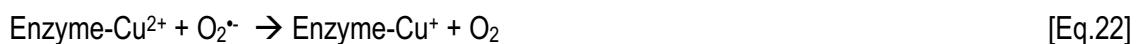
IV.1.1 Systèmes enzymatiques de défense antioxydante *in vivo*

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production de radicaux libres. Les systèmes de défense enzymatique sont reconnus parmi les plus performants. On distingue principalement la superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse la dismutation de l'ion

superoxyde ainsi que la catalase et la glutathion peroxydase, qui catalysent la réduction des hydroperoxydes [5].

a) Les superoxydes dismutases (SODs)

La SOD ou plutôt les SODs, sont présentes dans la plupart des organismes aérobies. Elles catalysent la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et dioxygène (II.1.1-b[Eq.6]). Les SODs sont des métalloenzymes à cuivre, fer ou manganèse, cofacteurs essentiels pour assurer la fonction catalytique de l'enzyme. Le mécanisme catalytique de la Cu-SOD, à titre d'exemple, est basé sur la réduction [Eq.22] puis l'oxydation [Eq.23] des ions du cuivre par les ions superoxydes. Dans les cellules animales, la Cu/Zn-SOD est présente dans le cytosol et la mitochondrie, tandis que la Mn-SOD est seulement présente dans la membrane mitochondriale [7].



b) La catalase

La catalase est une enzyme héminique, qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes. La catalase peut être inactivée par le peroxyde d'hydrogène à forte concentration (supérieure à 100 μM).

c) La glutathion peroxydase (GPx)

Dans les tissus humains, les GPx (5 isoenzymes) sont considérées comme les enzymes majeures de détoxification des hydroperoxydes. L'ensemble des GPx catalysent la réduction des hydroperoxydes en eau ou en alcool tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSG). La plupart de ces enzymes contiennent dans leurs sous-unités un atome de sélénium (sous forme de sélénocystéine) essentiel à l'activité catalytique. En plus de son rôle dans l'activité des GPx, le GSH possède lui même des propriétés antioxydantes dans les cellules et le plasma sanguin. Il est régénéré à partir de sa forme oxydée (GSSG) par la glutathion réductase qui utilise le NADPH comme réducteur [45]. Parmi les GPx, la GPx2 est localisée dans le cytoplasme des cellules du tractus gastro-intestinal. Son rôle serait alors de réduire spécifiquement les hydroperoxydes d'origine alimentaire et ceux produits au cours de la peroxydation lipidique intestinale [5].

IV.1.2 Système de défense antioxydante *in vivo*, non enzymatique

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain comprennent le glutathion, l'acide urique, l'ubiquinol ou forme réduite du coenzyme Q et les antioxydants exogènes tels que la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes.

a) Les piègeurs hydrophiles de radicaux

Dans cette catégorie, le glutathion et l'ascorbate, localisés dans le cytosol et certains organites intracellulaires (mitochondrie, noyau) sont les plus importants piègeurs de radicaux. Leurs concentrations intracellulaires sont généralement comprises entre 1 et 10 mM, ce qui est supérieur aux concentrations des autres biomolécules réductrices [7].

➤ **Le glutathion**

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly) pouvant intervenir en tant qu'antioxydant par deux types de mécanismes : la réduction directe d'espèces radicalaires et la participation à l'activité d'enzymes antioxydantes comme précédemment évoqué (Figure 11). Il est capable de réagir avec une grande variété de radicaux hydroxyle HO \cdot , alkoxyles RO \cdot , peroxydes ROO \cdot , mais aussi avec le dioxygène singulet $^1\text{O}_2$ etc... La réaction d'un radical avec GSH consiste en un transfert d'atome H vers le radical et conduit à la formation du radical thiyle GS \cdot , qui peut dimériser rapidement en GSSG mais éventuellement initier à son tour de nouvelles attaques oxydantes ou participer à l'activation de O $_2$ avec production de O $_2\cdot^-$ (effet pro-oxydant) [5].

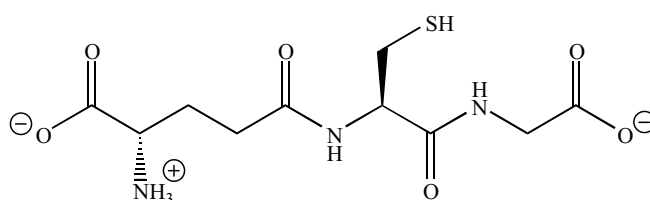


Figure 11. Structure chimique du glutathion.

➤ **L'acide ascorbique**

L'acide ascorbique ou vitamine C (Figure 12) est synthétisée par la plupart des animaux. Cependant, nos besoins essentiels en cette vitamine sont principalement assurés par un apport alimentaire quotidien.

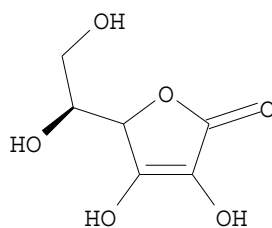
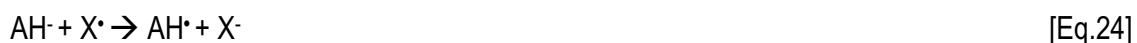


Figure 12. Structure chimique de l'acide ascorbique.

A pH physiologique, la structure ene-diol de l'acide ascorbique AH₂ est sous forme de base conjuguée AH⁻, ce qui explique pourquoi il réagit en donnant un électron dans le piégeage de radicaux libres [Eq.24]. Le radical ascorbyle AH[•] est déprotoné en A^{•-}, forme hautement stabilisée par délocalisation électronique [7]. Il conduit à l'acide déhydroascorbique par dismutation ou réduction d'un 2^{ème} radical.



➤ L'acide urique

L'acide urique, produit de la dégradation de certains éléments azotés (xanthine et hypoxanthine), circule en faible concentration dans le sang. A pH physiologique, il est majoritairement déprotoné sous forme d'urate UrH⁻, et peut ainsi réduire rapidement les radicaux, ce qui conduit à la formation d'une espèce radicalaire UrH[•], relativement stable en raison de la délocalisation des électrons sur le noyau purine. Ce radical peut être à son tour réduit par l'ascorbate, régénérant ainsi l'urate et limitant sa réaction éventuelle avec d'autres cibles. L'acide urique est aussi un piègeur du peroxyde ONOO⁻, ce qui explique son rôle protecteur vis-à-vis de la nitration des protéines. Enfin, il peut chélater des ions métalliques (fer et cuivre), sous forme de complexes peu réactifs sur le plan catalytique [5].

b) Les piègeurs hydrophobes de radicaux

Ces composés se trouvent dans les lipoprotéines et les membranes cellulaires où ils interrompent l'étape de propagation de la peroxydation lipidique, en réagissant avec les radicaux peroxydes ROO[•], ou en bloquant la formation des hydroperoxydes à partir du dioxygène singulet ¹O₂. Ils incluent la vitamine E, les caroténoïdes et probablement l'ubiquinol.

➤ La vitamine E

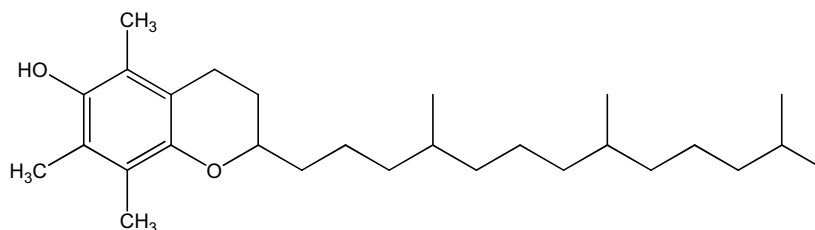


Figure 13. Structure chimique d'une des formes de la vitamine E, l' α -tocophérol.

La vitamine E, ou α -tocophérol (α -TH) (Figure 13), est le piègeur le plus efficace dans les bicouches lipidiques [Eq.25]. Le radical chromanoxyle α -T \cdot est stabilisé grâce à une importante délocalisation électronique de l'électron célibataire. Il est réduit à nouveau en α -TH par l'ascorbate ou d'autres systèmes réducteurs.



➤ L'ubiquinol

Un autre composé, présent dans les membranes et pouvant agir comme briseur de chaîne, est la forme réduite du coenzyme Q, l'ubiquinol (Figure 14). Si le rôle du coenzyme Q (ubiquinone) comme transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire est bien établi, celui de l'ubiquinol en tant qu'antioxydant reste hypothétique. Toutefois, il a été établi *in vitro* qu'il agissait comme un puissant antioxydant et était consommé avant la vitamine E. Il est aussi concevable qu'il soit impliqué dans le recyclage de l' α -tocophérol [7].

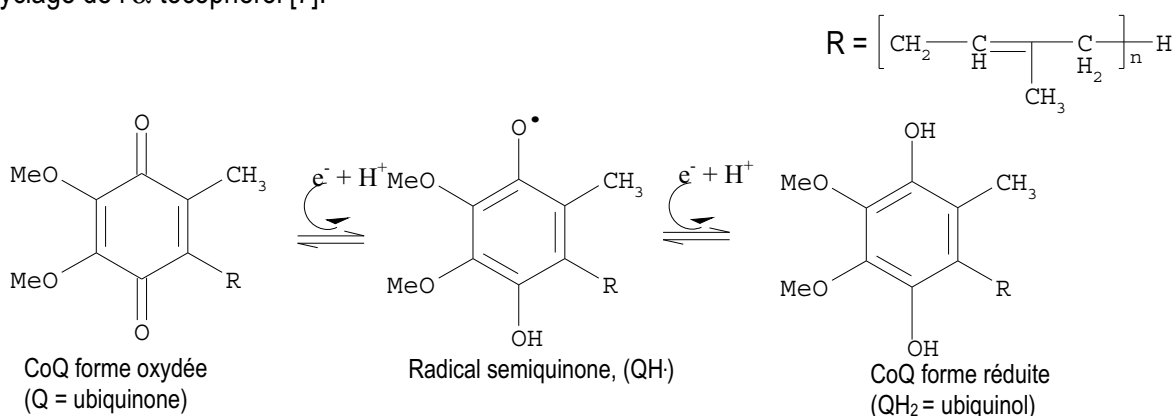


Figure 14. Structure chimique de l'ubiquinone et de l'ubiquinol. n varie de 6 à 10 chez les eucaryotes et n = 10 chez l'homme.

➤ **Les caroténoïdes**

Enfin, les caroténoïdes, composés polyéniques (C₄₀) comportant jusqu'à 11 doubles liaisons conjuguées, sont également des antioxydants des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Ils incluent les hydrocarbures tels que le lycopène et le β-carotène et des composés plus polaires, les xanthophyles, qui comportent des fonctions oxygénées sur les cycles terminaux. Leur principale propriété antioxydante consiste en la désactivation du dioxygène singulet, soit par quenching physique (production du dioxygène triplet), soit par quenching chimique avec oxydation concomitante du caroténoïde.

IV.1.2 Les antioxydants d'origine alimentaire

En parallèle de nos propres systèmes de défense antioxydante, l'alimentation joue un rôle primordial dans notre capacité à nous protéger contre la production excessive des espèces radicalaires de l'oxygène. La prévention nutritionnelle du stress oxydant et de ses conséquences implique, comme mesure première, l'optimisation des apports en antioxydants par l'alimentation. Les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes sont reconnus et attribués à la teneur élevée en antioxydants [47]. Les principaux antioxydants d'origine alimentaire sont :

- les micronutriments (vitamines E ou C, β-carotène et oligoéléments essentiels à l'activité des enzymes antioxydantes tels que le sélénium et le zinc). Leur importance nutritionnelle est avérée. Ils font l'objet d'apports journaliers recommandés.
- les microconstituants qui, à la différence des micronutriments, n'ont pas (ou pas encore) de valeur nutritionnelle clairement établie. Les principaux microconstituants à caractère antioxydant sont les composés phénoliques, grande classe de métabolites secondaires des végétaux. Ce sont les composés clés de cette étude; la partie suivante (partie IV.2) leur sera entièrement consacrée.

a) La vitamine E

Le terme générique de vitamine E désigne en fait la famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus répandue étant l'α-tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme.

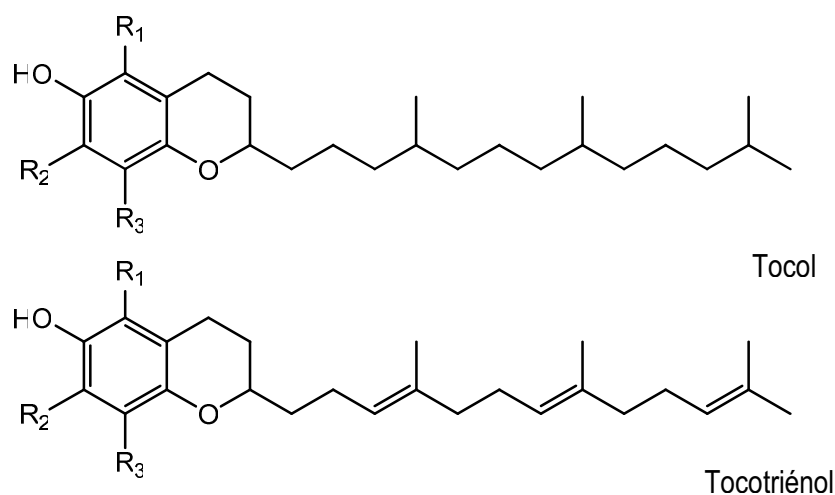
La molécule de tocol constitue la structure de base des tocophérols. Elle est formée d'un noyau hydroxychromane sur lequel est fixé une chaîne phytyle entièrement saturée (Figure 15). La différence entre les formes alpha, bêta, gamma et delta réside dans le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau chromanol. Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois

doubles liaisons sur la chaîne latérale. Ce sont des composés également rencontrés dans la nature. L' α -tocotriénol et le β -tocotriénol présentent aussi une certaine activité vitaminique alors que les deux autres sont inactifs.

➤ **Sources alimentaires**

L' α -tocophérol est un micronutriment essentiel à l'homme. La couverture des besoins de l'adulte est estimée à 12 mg/jour.

La vitamine E est synthétisée par les plantes et, de ce fait, se trouve essentiellement dans les produits d'origine végétale. Les sources les plus riches de vitamine E sont les huiles végétales (essentiellement les huiles issues de germes de blé, de maïs et de soja), la margarine, les graines de céréales (le germe de blé en particulier), les graines oléagineuses, les noix et les légumes [5]. Les produits d'origine animale (lait, viande, volaille, œufs) en contiennent en moindre mesure mais contribuent toutefois aux teneurs apportées par l'alimentation du fait de leur consommation fréquente [48].



R1	R2	R3	Dénomination	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -tocophérol (5,7,8-triméthyltolcol)	α -tocotriénol (5,7,8-triméthyltocotriénol)
CH ₃	H	CH ₃	β -tocophérol(5,8-diméthyltolcol)	β -tocotriénol (5,8-diméthyltocotriénol)
H	CH ₃	CH ₃	γ -tocophérol (7,8-diméthyltolcol)	γ -tocotriénol (7,8-diméthyltocotriénol)
H	H	CH ₃	δ -tocophérol (8-méthyltolcol)	δ -tocotriénol(8-méthyltocotriénol)

Figure 15. Formules développées des tocophérols et tocotriénols.

➤ **Biodisponibilité**

Les tocophérols sont souvent présents dans l'alimentation sous forme d'esters (acétates ou succinates). Après ingestion d'esters de vitamine E, les enzymes (estérases pancréatiques ou duodénales), en présence de bile, libèrent la vitamine E dans le duodénum et l'intestin grêle. On a

longtemps pensé que la vitamine E était absorbée par diffusion passive puis excrétée *via* les chylomicrons avant de rejoindre la circulation générale par le canal lymphatique. Toutefois, des données récentes suggèrent que son absorption serait plus complexe, mettant aussi en œuvre le transporteur SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type I) déjà impliqué dans le transport du cholestérol et fortement exprimé dans l'intestin [49]. L'absorption de la vitamine E est incomplète et a été évaluée de 21 à 74 % en fonction des études [48]. La vitamine E étant liposoluble, son absorption est facilitée par une ingestion simultanée de graisses alimentaires.

Transportée dans le sang au sein de la composante lipidique des lipoprotéines telles que les LDL, la vitamine E apparaît essentielle pour la protection des lipoprotéines circulantes et des membranes cellulaires [45]. L' α -tocophérol est la forme plasmatique majoritaire (80 à 90%), le reste étant essentiellement le γ -tocophérol. Le taux plasmatique normal d' α -tocophérol est de 5 à 16 mg/L (15 à 30 μ M) et il est étroitement corrélé à celui des lipides totaux [48]. La vitamine E s'accumule dans les tissus quand elle est consommée en forte quantité avec des teneurs variant considérablement selon les cibles. Les plus fortes concentrations de vitamine E sont mesurées dans les glandes adrénales, l'hypophyse, les testicules et les plaquettes, tandis que les tissus adipeux, le foie et les muscles sont les principaux sites de stockage [48] [50].

➤ **Mode d'action de l' α -tocophérol et propriétés biologiques**

Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' α -tocophérol est capable, d'une part de piéger chimiquement le dioxygène singulet (1O_2) avec oxydation concomitante en quinone, d'autre part de réduire rapidement le radical hydroxyle (HO^\bullet). Mais son principal rôle biologique est de réduire les radicaux peroxydes ROO^\bullet afin d'interrompre la chaîne radicalaire au stade de l'étape de propagation de la peroxydation lipidique. Il est ainsi qualifié de "briseur de chaîne".

L' α -tocophérol est régénéré essentiellement selon deux voies. D'une part, l'acide ascorbique est capable de réduire le radical tocophéryle. En effet, l'affleurement du noyau chromane relativement polaire à la surface de la membrane rend possible l'interaction de la vitamine E membranaire avec l'acide ascorbique de la phase aqueuse extra-membranaire. Cette coopération est à la base de la synergie reconnue de ces deux antioxydants, l'ascorbate étant lui-même incapable de réagir rapidement avec les radicaux peroxydes. D'autre part, la tocophéryl réductase, enzyme glutathion dépendante, est capable de réduire le radical tocophéryle en α -tocophérol [5].

b) La vitamine C

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur et à la lumière. Chimiquement parlant, il s'agit de l'acide L-ascorbique et de sa base conjuguée, l'ion ascorbate (Figure 12). L'acide L-ascorbique est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires.

➤ Sources alimentaires

Alors que la plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins, la majorité des primates (dont l'être humain), le cochon d'Inde et certains oiseaux ou poissons en sont incapables. Ceci est le résultat d'une mutation génétique, survenue il y a 40 millions d'années, bloquant la transformation du D-glucose en acide L-ascorbique. Les animaux et l'homme, dépourvus de cette capacité de synthèse de la vitamine C, doivent donc la puiser dans leur alimentation.

L'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) recommande un apport quotidien de 110 mg pour l'adulte. Une importante carence en vitamine C (moins de 10 mg/jour) provoque le scorbut. A l'inverse, des prises orales trop fréquentes et de fortes concentrations (supérieures à 500 mg/jour) peuvent entraîner des irritations gastriques, accompagnée de diarrhées et une acidification de l'urine (*via* l'accumulation d'acide oxalique), entraînant un risque de calculs rénaux [45, 51].

Les principales sources de vitamine C sont les agrumes, le poivron vert, le chou, les fraises et les légumes à feuilles vertes (Tableau 2).

Tableau 2. Teneurs de vitamine C, présentes dans quelques fruits et légumes. [48]

Fruits/Légumes	Vitamine C (mg/100 g de matière fraîche)
Orange	50
Pamplemousse	40
Banane	10
Pomme	10-30
<hr/>	
Haricots	10-30
Carotte	5-10
Pomme de terre	10-30
Epinard	50-90
Broccoli	90-150
Choux	30-60
Tomate	20-33

➤ **Biodisponibilité**

L'absorption de la vitamine C démarre dès la muqueuse buccale et se poursuit dans l'estomac et l'intestin grêle. Il est supposé que l'absorption buccale a lieu par diffusion passive à travers la membrane cellulaire des cellules mucosales. L'absorption gastrointestinale de la vitamine est rapide et efficace et se déroule très certainement *via* un système de transport actif. Ce mécanisme actif d'absorption devient saturé dès que la concentration mucosale de la vitamine C atteint 6 mM. Ceci expliquerait le fait que la proportion de vitamine C absorbée diminue lorsque la concentration de celle-ci augmente. Avant absorption, l'acide ascorbique est oxydé en déhydroascorbate ; il est alors absorbé soit par diffusion passive, soit par le biais du transporteur de glucose. Contrairement à l'acide ascorbique, le déhydroascorbate est neutre à pH physiologique et possède un potentiel de pénétration des membranes plus important que l'anion ascorbate. Cependant au sein des cellules intestinales, le déhydroascorbate est rapidement réduit en ascorbate par les déhydroascorbate-réductases glutathion dépendantes. Le taux d'absorption varie de 16% (à forte concentration de vitamine C) à 98 % (à faible concentration).

La concentration normale d'ascorbate dans le plasma humain est de 30 à 150 μM . Il n'existe pas d'organes « réservoirs » de cette vitamine, même si de fortes teneurs sont trouvées dans le thymus, les corps jaunes (formations temporaires, à l'intérieur de l'ovaire qui résulte de la transformation du follicule de De Graaf après expulsion de l'ovocyte lors de l'ovulation), la glande adrénale, les lentilles des yeux et les leucocytes. Dans le sang et les tissus, l'acide ascorbique est présent principalement sous sa forme réduite; la forme oxydée représente généralement moins de 10% de la vitamine totale. La demi-vie moyenne de la vitamine chez un adulte est d'environ 20 jours avec un turnover de 1mg/kg/jour et un réservoir corporel total de 1500 mg [50].

➤ **Mode d'action de l'acide L-ascorbique et propriétés biologiques**

L'importance biochimique de la vitamine C est liée à son potentiel réducteur. En tant que cofacteur, l'ascorbate participe à de nombreuses réactions d'hydroxylation. Plusieurs hydroxylases, impliquées dans la synthèse du collagène nécessitent, pour une activité maximale, de l'ascorbate en tant que réducteur [48]. L'acide L-ascorbique est aussi un piègeur efficace de l'anion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes et du dioxygène singulet. En piégeant les radicaux dans la phase aqueuse avant qu'ils n'amorcent la peroxydation lipidique, l'acide L-ascorbique protège les biomembranes et les lipoprotéines [5].

Comme il a été déjà mentionné, l'ascorbate est capable de régénérer efficacement l' α -tocophérol par réduction du radical α -tocophéroxyle. L'ascorbate est alors oxydé en déhydroascorbate qui peut être réduit à son tour en ascorbate *via* la déhydroascorbate réductase glutathion-dépendante.

c) Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont une classe de molécules largement représentée dans la nature, qui confère à une grande variété de plantes, fruits et légumes, des couleurs vives (rouge, orange, jaune). Une des plus anciennes fonctions connues de certains caroténoïdes est leur action en tant que provitamines A. Pendant longtemps d'ailleurs, la médecine ne s'est intéressée aux caroténoïdes (essentiellement le β -carotène) qu'en tant que précurseur alimentaire de vitamine A, et les a fait figurer à ce titre dans le groupe des vitamines. En fait, sur plus de 600 caroténoïdes identifiés, seule une cinquantaine environ sont des précurseurs de la vitamine A.

Les structures des différents caroténoïdes (IV.1.2-b) sont représentées en Figure 16 et Figure 17.

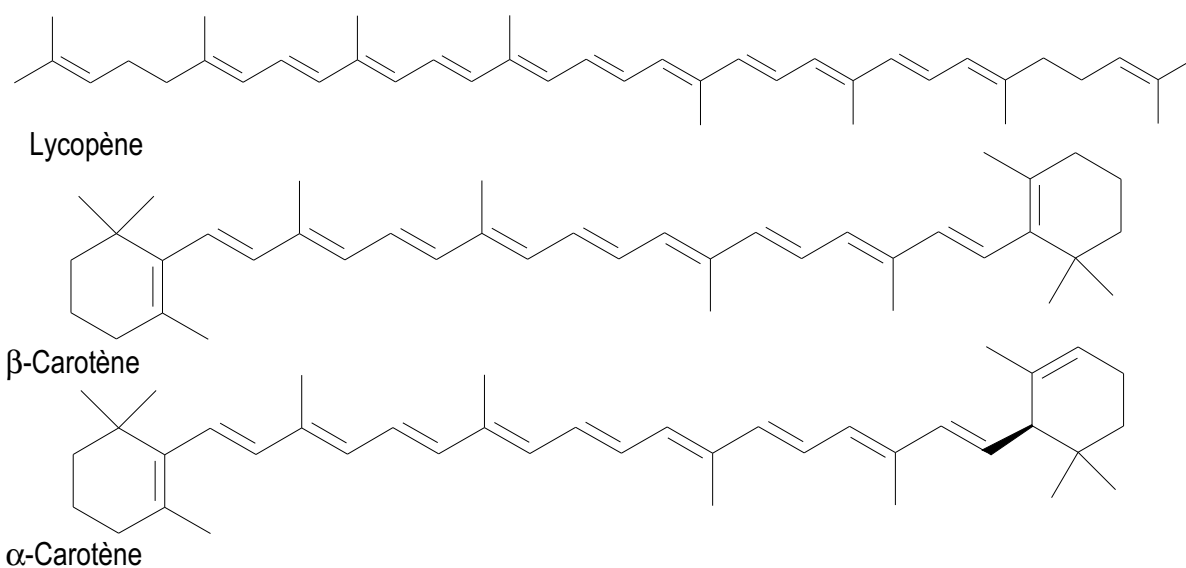


Figure 16. Structure chimique des principaux carotènes.

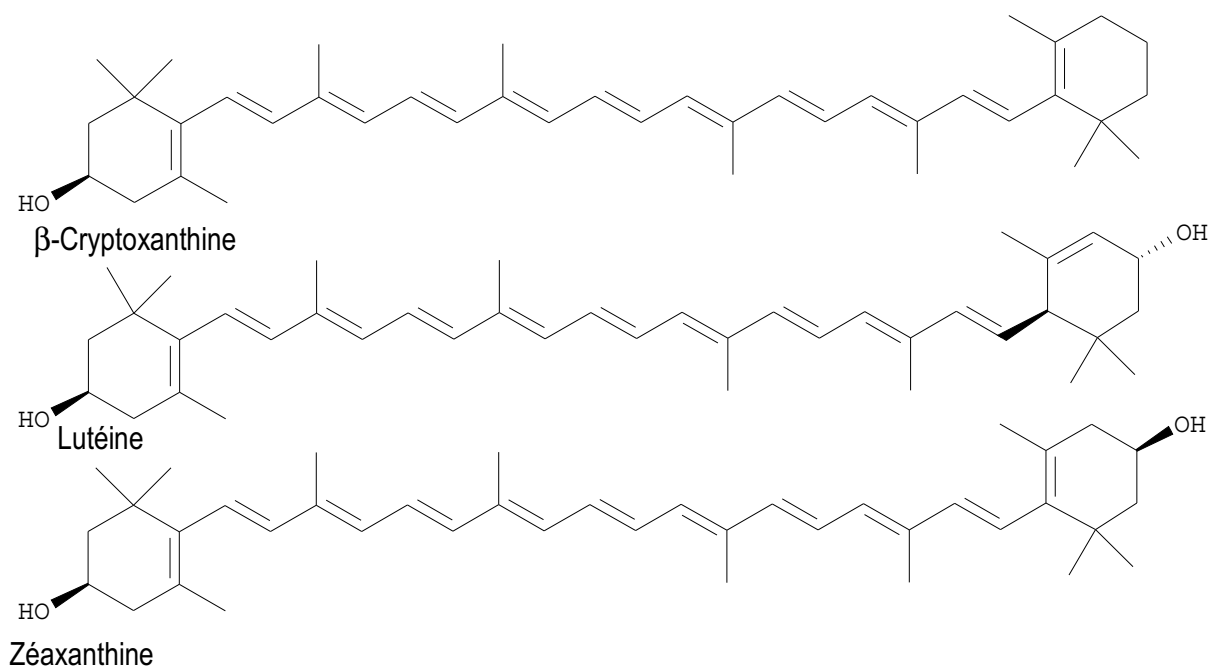


Figure 17. Structure chimique des principaux xanthophylles.

➤ **Sources alimentaires**

Les sources majeures des caroténoïdes sont les fruits et les légumes. En France, l'apport en β -carotène se situe en moyenne entre 1,5 et 2,5 mg par jour. Les carotènes sont présents dans les carottes, le lycopène dans les melons, les tomates et produits dérivés de la tomate, la lutéine dans les épinards et les haricots verts et la zéaxanthine dans le maïs.

➤ **Biodisponibilité**

Pour pouvoir être absorbés au travers de la paroi intestinale, les caroténoïdes doivent être extraits de leur matrice végétale, puis solubilisés dans des micelles mixtes incorporant des lipides et sels biliaires. Dès l'estomac, une fraction de caroténoïdes est transférée de la matrice alimentaire vers la phase lipidique du bol alimentaire [52]. La teneur en corps gras dans l'alimentation est notamment connue pour augmenter la biodisponibilité des caroténoïdes [53]. Cependant, l'augmentation de matière grasse n'influence pas de la même façon l'absorption des différentes formes de caroténoïdes. De façon logique, l'absorption des carotènes lipophiles (α - et β -carotène, lycopène) est fortement amplifiée alors que celle des xanthophylles l'est dans une moindre mesure [54].

Une fois incorporés dans des micelles mixtes dans le lumen intestinal, les caroténoïdes sont prêts à être absorbés par l'épithélium de l'intestin grêle (entérocytes). L'assimilation des caroténoïdes par les entérocytes est supposée se dérouler par diffusion passive, de façon similaire à de nombreux lipides. Cela dit, des études récentes ont rapporté que la protéine de transport, SR-BI, localisée dans la membrane apicale des entérocytes, pouvait aussi faciliter le captage du β -carotène, de la lutéine [53, 54] et du lycopène [55]. Les caroténoïdes intacts sont alors incorporés dans les chylomicrons puis dans les VLDL. Leur teneur dans les autres lipoprotéines (LDL, HDL) augmente plus tard à 24-48 heures. Les teneurs moyennes plasmatiques ont été évaluées à 0,47 μM pour le lycopène, 0,33 μM pour le β -carotène et 0,21 μM pour la β -cryptoxanthine [56].

➤ **Mode d'action et propriétés biologiques**

Le rôle protecteur des caroténoïdes dans les systèmes biologiques implique la désactivation physique ou chimique du dioxygène singulet $^1\text{O}_2$ et, éventuellement, la capture d'ERO comme les radicaux peroxyles ROO^\bullet . L'activité antioxydante des caroténoïdes dépend principalement du nombre de doubles liaisons conjuguées et, dans une moindre mesure, de la présence de cycles terminaux. Les radicaux et radicaux-cations dérivés de caroténoïdes sont assez stables pour ne pas réagir avec les molécules biologiques situées dans leur environnement proche. Ainsi, la capture des radicaux peroxyles dans les membranes cellulaires pourraient être un mécanisme antioxydant important *in vivo* [56]. Cependant, l'activité antioxydante n'opérerait qu'à faible pression partielle de O_2 pour éviter l'addition de ce dernier sur les radicaux de caroténoïdes qui conduit à des radicaux peroxyles beaucoup plus réactifs (effet pro-oxydant potentiel).

Les caroténoïdes protègent également contre les réactions de photo-oxydation (en présence de divers sensibilisateurs) grâce à leur capacité à désactiver par un processus de transfert d'énergie des espèces qui se trouvent soit dans un état excité triplet, soit dans un état excité singulet.

Le β -carotène ou des mélanges de caroténoïdes, de par leurs effets antioxydants, protégeraient de l'oxydation les LDL isolés (études *ex vivo*) [57]. Les caroténoïdes, tout particulièrement le lycopène, auraient aussi un rôle important dans la prévention des cancers du tractus digestif (cavité orale et pharynx, œsophage, estomac, prostate, côlon et rectum), notamment lors de l'étape de prolifération des tumeurs. Les caroténoïdes sont en effet capables de rétablir une communication intercellulaire *via* les protéines de jonction communicante (gap junction), ce qui a été associé à une inhibition de la prolifération de cellules transformée [56].

d) Le sélénium

Au sein des oligoéléments essentiels, le sélénium apparaît comme un micronutriment primordial dans le maintien des défenses antioxydantes. Le sélénium de l'alimentation existe principalement sous les formes sélénométhionine et sélénocystéine. De plus, dans certains végétaux, il peut être présent sous forme inorganique (sélénite, H_2SeO_2 et sélénate, H_2SeO_4). Son pourcentage d'absorption (forme organique ou inorganique) est généralement compris entre 50 et 100%. Suite à son absorption, le sélénium est lié à des protéines qui le transportent dans le sang vers le foie et les autres tissus où il est converti en sélénocystéine quelle que soit sa forme initiale [50].

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathion peroxydases sélénodépendantes et à l'activité biologique antiradicalaire des sélénoprotéines. Ces activités sont complétées par ses propriétés immunomodulatrices. En effet, le sélénium permet de maintenir un pool intralymphocytaire de glutathion réduit, ce qui protège la membrane et ses groupements thiols et permet aux cellules immunocompétentes de maintenir leur réponse. D'autres fonctions essentielles complètent le rôle antioxydant actif du sélénium, en particulier, la détoxification des métaux lourds et l'activation de la métabolisation des xénobiotiques organiques.

Le sélénium est présent dans les aliments riches en protéines animales (viandes, oeufs, poissons, lait), dans les céréales et certains fruits secs [5].

d) Le zinc

Le zinc joue un rôle antioxydant de façon indirecte, principalement en assurant la stabilisation de la Cu-Zn superoxyde dismutase. Certaines études mentionnent aussi d'autres mécanismes d'action. L'ion Zn^{2+} pourrait entrer en compétition avec les ions du fer et du cuivre dans la réaction de Fenton et inhiberait ainsi la production d'ERO. En effet, sa valence est fixée à 2 et il ne peut entrer dans des cycles redox générateurs d'ERO. Il pourrait aussi protéger par complexation les groupements thiols des protéines empêchant ainsi leur oxydation en ponts disulfure.

Le zinc alimentaire est essentiellement lié à des protéines et, en premier lieu, doit être libéré avant l'absorption intestinale. L'ion Zn^{2+} est absorbé principalement depuis le duodénum par un transporteur régulé. Depuis l'entérocyte, Zn^{2+} est transféré à la circulation portale en association à la sérum albumine mais aussi à des globulines et transferrines. Le taux moyen d'absorption est de 20% [50].

IV.2 Les composés phénoliques

Depuis une quinzaine d'années, chercheurs et industriels de l'agro-alimentaire s'intéressent de plus en plus à une catégorie d'antioxydants, les polyphénols. La reconnaissance des propriétés antioxydantes de ces composés, leur abondance dans l'alimentation et leur rôle probable dans la prévention des maladies associées à un stress oxydant sont les principales raisons de cet engouement.

Le terme "polyphénol" est aujourd'hui communément utilisé pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. Initialement, il désignait surtout les tannins, composés présentant un grand nombre d'unités phénoliques en raison de leur caractère oligomérique. Dans ce manuscrit, nous utiliserons le terme "polyphénol" dans son sens le plus large, y compris pour désigner (par abus de langage) des composés ne possédant éventuellement qu'un seul groupement phénolique

IV.2.1 Définition

A côté des métabolites dits primaires, tels que les glucides, lipides et protéines, les végétaux accumulent des métabolites "secondaires" dont la fonction physiologique n'est pas toujours définie. Les composés phénoliques appartiennent à cette dernière catégorie et sont présents en quantités variables dans la plupart des végétaux. Malgré la diversité de ces composés (plus de 8000 composés phénoliques identifiés dans les végétaux), ils présentent toutefois une structure commune, constituée d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Chez la plante, les composés phénoliques sont notamment impliqués dans la défense contre les radiations ultraviolet ou contre l'agression par les pathogènes [58].

IV.2.2 Les différents composés phénoliques et leurs principales sources

Au sein de la famille des composés phénoliques, plusieurs classes de molécules peuvent être différenciées par leur squelette de base.

a) les acides hydroxybenzoïques (squelette carboné C6-C1)

Sous forme libre (non estérifiée), ces composés sont généralement présents en faible teneur dans les plantes. Ils sont toutefois présents dans certains végétaux, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais [59]. Les principaux exemples d'acides

hydroxybenzoïques sont les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique et gallique (Figure 18).

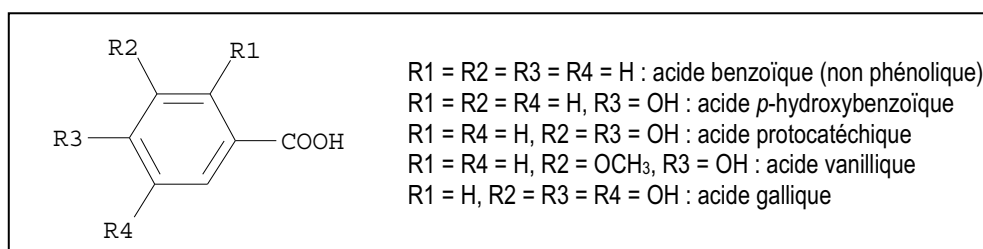


Figure 18. Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.

b) les acides hydroxycinnamiques (squelette carboné C6-C3)

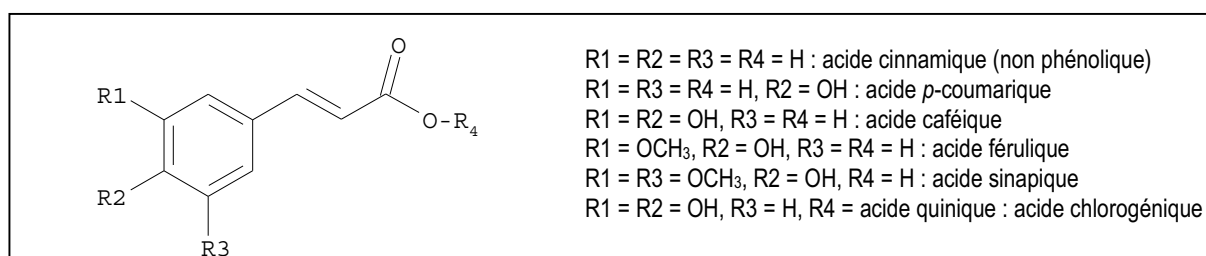


Figure 19. Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques.

Ils constituent une catégorie très importante dont la structure de base dérive de celle de l'acide cinnamique (Figure 19).

L'acide férulique est le composé phénolique le plus abondant des céréales (0,8-2 g/kg de matière sèche) et peut représenter jusqu'à 90% des polyphénols totaux, comme c'est le cas dans les grains de blé. L'acide caféique reste toutefois le principal représentant de cette catégorie. Il est présent de façon ubiquiste dans les végétaux (tomate, olive, pomme, graine de caféier ...), mais principalement sous forme d'ester de l'acide quinique (acide chlorogénique). L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans le café; une seule tasse peut en contenir de 70 à 350 mg. L'acide caféique est l'acide hydroxycinnamique le plus abondant, que ce soit sous sa forme libre ou sous sa forme estérifiée. Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits [59]. C'est notamment le cas dans la pomme où la concentration d'acide chlorogénique peut atteindre 430 mg/kg pour certaines variétés [60]

c) Les stilbènes (squelette carboné C6-C2-C6)

Ces composés (ex : le resvératrol) sont essentiellement présents dans la vigne, où ils s'accumulent en réponse à des attaques parasitaires. Le resvératrol a longuement été étudié pour ses propriétés anticarcinogènes. Cependant, dans l'alimentation, ce composé est présent en très faible quantité, excluant un effet protecteur dans le cas de prises alimentaires nutritionnelles normales.

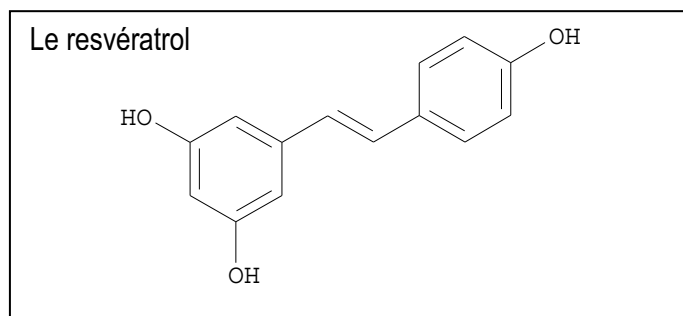


Figure 20. Un exemple de stilbène : le resvératrol.

d) Les flavonoïdes (squelette carboné C6-C3-C6)

Cette classe, caractérisée par un squelette de type 2-phénylbenzopyrane (Figure 21), regroupe à elle seule plusieurs milliers de composés qui se répartissent en plus de 10 sous-classes et que l'on retrouve dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin....).

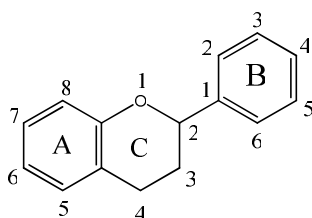


Figure 21. Motif chimique caractéristique des flavonoïdes.

C'est la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes sous-classes de flavonoïdes : flavones et flavonols, anthocyanidines (stables en milieu acide sous forme de cation flavylum), flavanones, flavanes. A l'intérieur de chaque sous-classe, le degré d'hydroxylation des différents cycles et le niveau de méthylation et de glycosylation des OH phénoliques constituent les différentes variations possibles.

Les principales sous-classes de flavonoïdes sont donc:

➤ **les flavanones.**

Dans l'alimentation humaine, les flavanones sont présents dans les tomates et certaines plantes aromatiques comme la menthe mais c'est dans les agrumes qu'elles sont présentes en les plus fortes concentrations. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hésperitine dans les oranges et l'ériodictyol dans le citron (Figure 22).

Les flavanones sont le plus souvent glycosylées en position 7 par un disaccharide, comme le néohésperidose qui confère un goût amer au pamplemousse ou le rutinose sans flaveur particulière. A titre indicatif, un jus d'orange contient entre 200 et 600 mg d'hésperitine/L et 15-85 mg de narirutine/L [59].

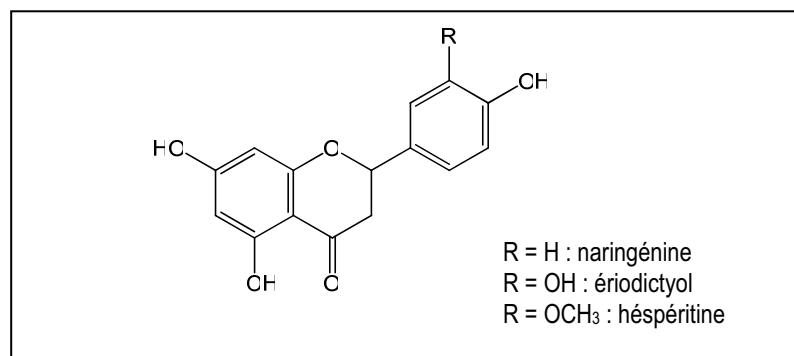


Figure 22. structure chimique des flavanones.

➤ **les flavonols**

Ce sont les flavonoïdes les plus répandus dans les aliments. Leurs principaux représentants sont la quercétine et le kaempférol. Les flavonols s'accumulent dans les tissus extérieurs ou aériens des végétaux comme la peau ou les feuilles car leur biosynthèse est stimulée par la lumière. Les sources les plus riches de quercétine sont les oignons, (environ 350 mg/kg de matière fraîche et jusqu'à 1200) [61, 62], les brocolis, le poireau, le chou et les baies comme le cassis (115 mg/kg de matière fraîche) [63]. Le vin rouge et le thé contiennent aussi des flavonols à hauteur de 45 mg/L [64]. Ces composés sont principalement présents sous forme de glycosides et les sucres associés sont souvent le glucose et le rhamnose (ex : rutine = quercétine-3-O-rhamnosylglucose) mais d'autres sucres peuvent aussi être impliqués (galactose, arabinose, xylose) (Figure 23).

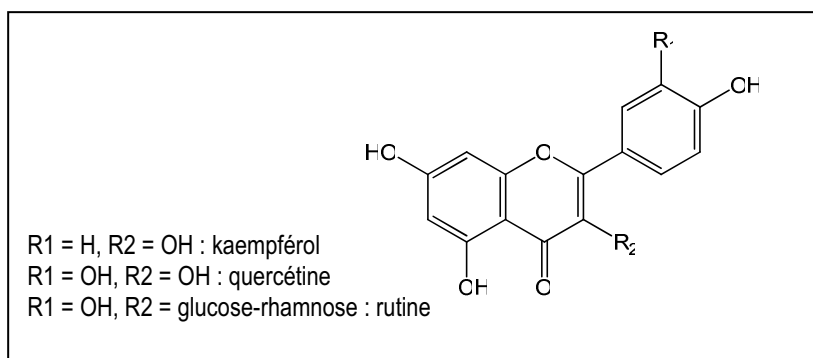


Figure 23. Structures chimiques de flavonols.

➤ **les flavanols ou dérivés de catéchine**

Ces composés existent à la fois sous forme de monomères comme la (+)-catéchine ou la (-)-épicatéchine et sous forme d'oligomères voire de polymères (proanthocyanidines). Les catéchines sont présentes dans beaucoup de fruits comme l'abricot, mais le thé (jusqu'à 120 mg de (+)-catéchine dans le thé noir de Chine), le vin rouge (environ 50 mg/L de (+)-catéchine dans les vins de Bordeaux) et le chocolat (jusqu'à 132,4 mg/kg de matière fraîche de (+)-catéchine pour le chocolat noir) constituent les sources les plus riches [65, 66] (Figure 24). A l'opposé des autres catégories de flavonoïdes, les flavanols ne sont pas glycosylés dans les aliments. Les proanthocyanidines, connues sous le nom de tanins condensés, sont des dimères, oligomères et polymères de catéchines et d'épicatéchine, les unités étant liées par des liaisons C-C de type C4-C8 et C4-C6.

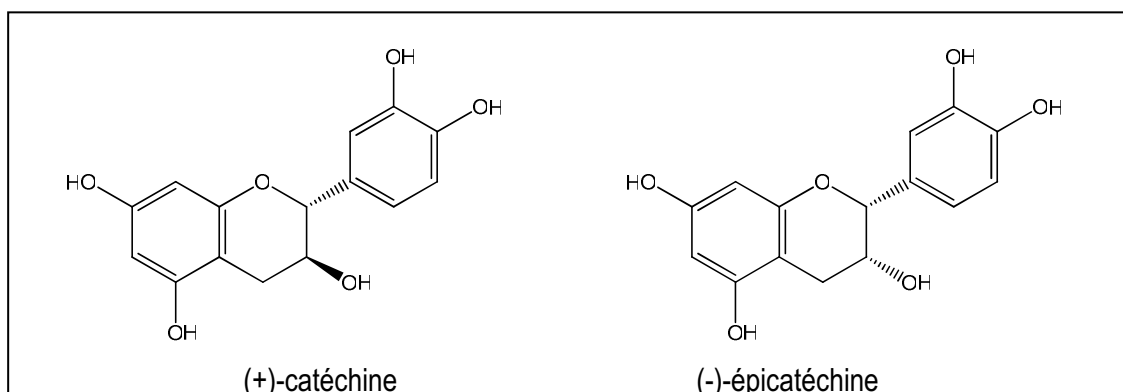


Figure 24. Structures chimiques de flavan-3-ols.

➤ **les anthocyanes**

Dissoutes dans la vacuole des tissus de l'épiderme des fleurs et des fruits, elles confèrent aux végétaux des couleurs rose, rouge, bleu ou violet. Sous leur forme aglycone (anthocyanidines), elles sont instables et particulièrement sensibles à la lumière et aux variations de pH et de température. Dans les plantes, la glycosylation en position 3 et 5 et l'esterification par des acides organiques (acide malique ou citrique) leur assurent une bien meilleure stabilité. Les anthocyanes sont aussi stabilisées par la

formation de complexes d'empilement avec d'autres flavonoïdes (copigmentation) voire par complexation métallique. Dans les aliments, les anthocyanes sont présents de façon remarquable dans le vin rouge issu de cépage Cabernet Franc, Merlot ou Pinot Noir (420, 412 et 340 mg de malvidine-3-glucoside par litre) [67]. De nombreux glucosides de cyanidine et deux dérivés de pélagonidine ont aussi été caractérisés dans l'oignon rouge [68] (Figure 25).

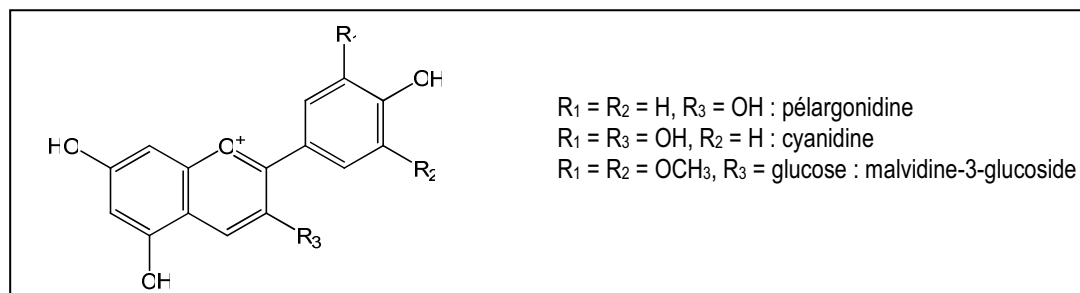


Figure 25. Structures chimiques de quelques anthocyanes.

e) Les lignanes (squelette carboné (C6-C3)₂)

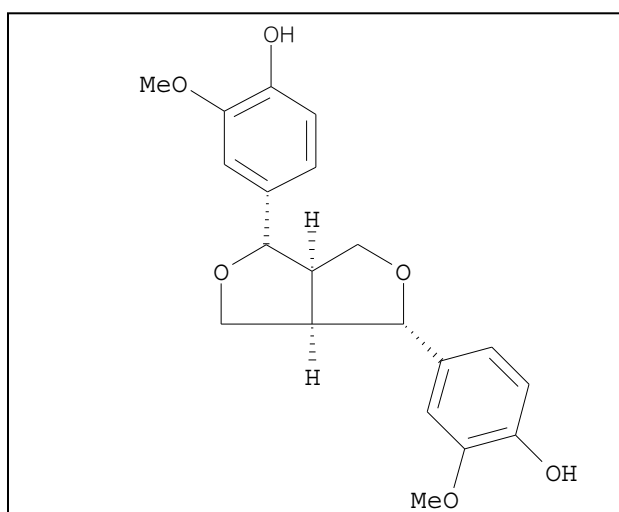


Figure 26. Un exemple de lignane, le (+)-pinorésinol.

La source la plus riche de lignane est la graine de lin. D'autres céréales, fruits et légumes contiennent aussi des lignanes mais les concentrations dans la graine de lin sont environ 1000 fois supérieure à celle des autres sources alimentaires.

f) les lignines (squelette carboné (C6-C3)_n)

Compte tenu de l'importance quantitative et biologique des lignines dans les plantes terrestres, ces composés sont intermédiaires entre métabolites primaires et métabolites secondaires. Ils sont notamment présents dans le bois ou les noyaux de fruit.

g) Les tanins (squelette carboné (C15)_n)

Les tanins sont utilisés depuis l'antiquité pour le tannage des peaux d'animaux. Cette utilisation est liée à leur capacité à former des liaisons entre les fibrilles de collagène du tissu animal, conduisant à un ensemble peu accessible à l'eau et aux bactéries et donc imputrescible. Les mécanismes mis en jeu sont une complexation irréversible des tanins avec les protéines animales avec formation de liaisons covalentes résultant de l'attaque de résidus d'acides aminés nucléophiles sur les noyaux ortho-quinones des tanins oxydés.

En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêches, pommes, poires, etc...) et de certaines boissons (vin, cidre, thé, etc...) et de l'amertume du chocolat.

IV.2.3 Consommation journalière de polyphénols

La consommation journalière de polyphénols est une donnée difficile à estimer. Elle dépend de deux facteurs principaux : les habitudes alimentaires des populations étudiées et le contenu en polyphénols des aliments, lui-même sujet à de grandes variabilités.

a) Variabilité des teneurs en polyphénols au sein des aliments

De façon générale, il est admis que les boissons comme le thé, le café ou le vin constituent la principale source alimentaire de polyphénols. Certains polyphénols, comme la quercétine ou l'acide caféique sont présents dans tous types d'aliments consommés (fruits, légumes, céréales, légumineuses, jus de fruits, thé, café, vin, etc, ...) alors que d'autres restent plus spécifiques d'un aliment donné. Au sein d'un même fruit, d'importantes variations de teneurs en polyphénols peuvent exister entre plusieurs variétés. La pomme est un des rares fruits pour lequel des données précises sur la composition en polyphénols existent. Une étude portant sur dix variétés commerciales de pomme a souligné que la teneur en acide chlorogénique pouvait varier de 30 à 430 mg/kg de matière fraîche

(variété Eldstar et Papierowka, respectivement) tandis que celle de la (+)-catéchine évoluait entre 4 et 21 mg/kg (Variété Boskoop et Elstar respectivement) [60]. Pour beaucoup d'autres produits, la composition est bien moins connue ou limitée à quelques variétés. D'autre part, de nombreux facteurs autres que la variété influence le contenu polyphénolique des plantes ; ils incluent les facteurs environnementaux, le stade de maturité, la transformation et le mode de conservation des aliments.

Les facteurs environnementaux ont un effet majeur sur le contenu polyphénolique. Ces facteurs sont de différentes nature : pédo-climatique (type de sol, exposition au soleil, pluviosité), agronomique (culture « bio », rendement de fruits par arbre, nutrition azotée etc). En général, les concentrations d'acides hydroxycinnamiques diminuent durant la maturité alors que les concentrations d'anthocyanes augmentent.

La conservation est aussi un paramètre fondamental dans la teneur en composés phénoliques des aliments. Une conservation au frais ($T = 4\text{ °C}$) ou sous atmosphère contrôlée ($T = 1,5\text{ °C}$; 1,2% O_2 , 2,5% CO_2) n'affecterait pas le contenu en polyphénols de différentes variétés de pommes [69].

La méthode de préparation culinaire choisie a également un impact sur le contenu en polyphénols des aliments. Le simple fait de peler certains fruits et légumes peut éliminer une proportion conséquente de polyphénols car ces composés sont souvent présents dans les parties externes des végétaux. La cuisson est aussi un processus qui altère la teneur en polyphénols. Une étude comparant les différents procédés de cuisson des tomates et des oignons a montré que la cuisson dans de l'eau bouillante (15 minutes) était la plus néfaste, entraînant une perte de 75 et 80% de leur contenu initial respectif en quercétine. La cuisson par microonde (800 W; 1,3 et 5 min) a entraîné une perte de 65 % contre 30% pour la friture des produits (3 et 5 min) [70].

Enfin, les procédés industriels vont également entraîner des dégradations du contenu en polyphénols des végétaux, principalement par des phénomènes d'oxydation résultant de la décompartmentation cellulaire et du contact entre les composés phénoliques et les polyphénol oxydases cytoplasmiques [59].

b) Estimation de la consommation journalière de polyphénols

Une étude de 1976 menée aux Etats-Unis a établi à 1 g/jour la prise de flavonoïdes (glycosides) soit 0,65 g/ jour (aglycones) répartis entre flavonols, flavones et flavanones (16%), anthocyanes (17%),

catéchines (20%) et « biflavones » (45%) [71]. Malgré le peu de précisions apportées sur les conditions de cette étude et au vu des difficultés d'une estimation, cette valeur a largement été considérée comme « valeur de référence » pour des personnes consommant plusieurs portions de fruits et légumes par jour [58]. Toutefois cette valeur de référence est certainement surestimée puisque plus récemment la prise journalière des polyphénols et tanins a été évaluée à 0,5 g/jours (aglycones) en prenant en compte les modifications associées aux procédés et aux préparations domestiques des aliments [72]. D'autres études illustrent très clairement l'importante variabilité entre les habitudes culturelles (Tableau 3).

Tableau 3. Consommation quotidienne des différentes catégories de composés phénoliques par pays, en mg par jour [44, 59, 62].

mg/jour	USA	Danemark	Hollande	Italie	Finlande	Espagne	Allemagne	Japon
Flavones et flavonols	13	28	33 23	5-125 23-34	3-10			65
Flavanones					28			
Anthocyanes	180- 215				82			
Catéchines et proanthocyanidines			50			18-31		
Acides hydroxycinnamiques							211	
Acides hydroxybenzoïques							11	

Une étude française récente a cherché à corréliser le contenu en polyphénols totaux (méthode Folin-Ciocalteu) d'un grand nombre de fruits et légumes avec les quantités consommées quotidiennement. Il apparaît ainsi que les fruits et légumes comportant les plus hautes teneurs en polyphénols (fraises, lychees, raisins, artichauts, persil, choux de Bruxelles) ne sont pas nécessairement les principales sources alimentaires au regard des quantités consommées. En revanche, les pommes et pommes de terre, moins riches en composés phénoliques, mais consommées fréquemment et en plus grande quantité, seraient les principales sources de polyphénols du régime alimentaire français (jusqu'à 47 % des polyphénols totaux journaliers) [73].

IV.2.4 Biodisponibilité, absorption et métabolisme des polyphénols

Les composés phénoliques les plus consommés à travers l'alimentation humaine ne sont pas nécessairement ceux qui entrent dans la circulation sanguine en plus forte concentration, soit parce qu'ils sont faiblement absorbés, soit parce qu'ils sont hautement métabolisés et rapidement éliminés.

a) L'absorption des composés phénoliques

Les aglycones de polyphénols peuvent être notablement absorbés dès le petit intestin par diffusion passive [74]. Il a même été montré que l'estomac du rat possède une activité uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférase (UGT) permettant une absorption partielle de la quercétine dès l'estomac [75].

Cependant, dans les aliments, la plupart des composés phénoliques se trouvent sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères et ne peuvent être absorbés sous leur forme native. Ces composés doivent être hydrolysés par les enzymes intestinales et surtout par les enzymes de la microflore du côlon avant de pouvoir être absorbés. Par exemple, dans le cas des anthocyanes, il a été montré que les bactéries du côlon possèdent des activités rhamnosidase et glucosidase permettant la libération des aglycones (anthocyanidines). La microflore colonique est également capable de rompre l'hétérocycle des anthocyanes pour former des composés phénoliques de petite taille comme l'acide protocatéchique [76].

Les glycosides (contenant par exemple un rhamnose) sont absorbés moins rapidement que le sont les aglycones et les glucosides, parce que l'absorption est moins facile dans le côlon que dans l'intestin grêle. Les principales raisons sont la surface d'échange plus limitée dans le côlon et les systèmes de transport de plus faible densité.

Dans le cas des glucosides de quercétine, une absorption directe au stade de l'intestin grêle est possible *via* le transporteur de glucose sodium-dépendant (SGLT) [72]. Elle est suivie par l'hydrolyse des glucosides dans le cytosol [77]. Un autre mécanisme impliquant la lactase phloridzine hydrolase (LPH), une glucosidase de la bordure en brosse de l'intestin qui catalyse l'hydrolyse extracellulaire des glucosides, a aussi été démontré [78]. Il est suivi par l'absorption de l'aglycone ainsi libéré par diffusion passive. Contrairement aux autres glucosidases des mammifères, localisées à l'intérieur des cellules, la LPH a la particularité d'agir du côté luminal de la bordure en brosse. Elle hydrolyse *via* son site lactase la plupart des glucosides de quercétine (quercétine-3-glucoside, quercétine-4'-glucoside,...). La Figure 27 récapitule les différents mécanismes possibles de l'absorption des glycosides de quercétine.

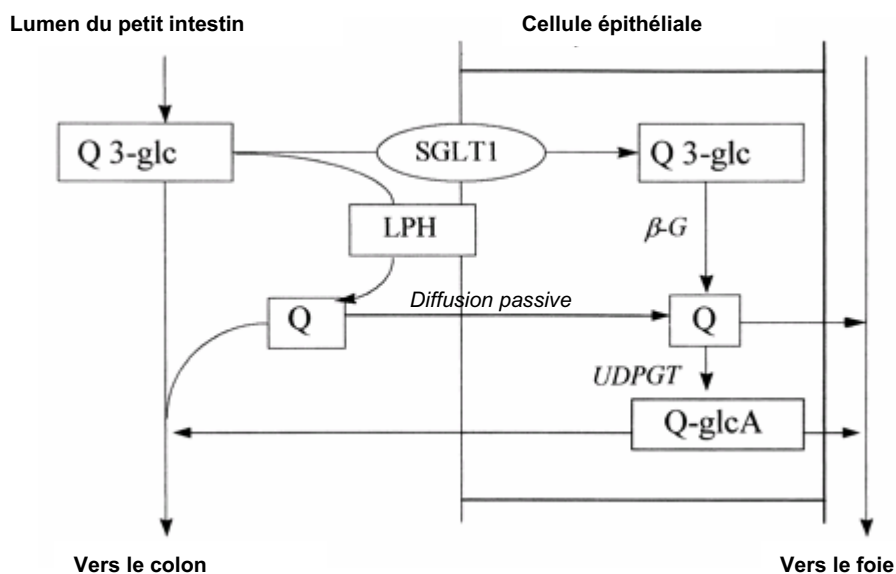


Figure 27. Mécanismes possibles pour l'absorption des glycosides de quercétine dans le petit intestin. Abréviations : Q 3-glc = quercétine-3-glucoside, Q = quercétine, SGLT1 = transporteur de glucose sodium dépendant, LPH = lactase phloridzine hydrolase, Q-glcA = glucuronides de quercétine, UDPGT = uridine-diphospho-D-glucose glucuronosyltransférase, β -G = β -glucosidase du cytosol. Par Gee et al. 2000 [77].

b) L'effet de la matrice alimentaire sur l'absorption

L'effet de la matrice alimentaire est aussi un paramètre déterminant dans la biodisponibilité des composés phénoliques. Des interactions directes entre les composés phénoliques et les protéines ou les polysaccharides peuvent avoir lieu et modifier l'absorption des composés phénoliques. Il a été également suggéré que la présence d'éthanol pouvait augmenter le pourcentage d'absorption intestinale de la quercétine en augmentant sa solubilité. En fait, l'absorption de la quercétine chez le rat n'augmente que pour des concentrations d'éthanol trop importantes pour être atteintes *via* l'alimentation (30% vol) [79]. Dans cette même étude, il a toutefois été montré que la combinaison de lipides (lécithine de soja) et d'émulsifiants (taurocholate de sodium, esters gras de saccharose) permettant une meilleure solubilité de la quercétine augmentait significativement son absorption. Chez l'homme il a été montré que l'ajout d'une faible quantité d'huile (3 g) à un repas (185 g) contribuait à une meilleure absorption de flavonols issus de baies [80].

Dans d'autres études, un système *in vitro* de digestion, incluant un traitement enzymatique à base de pepsine, pancréatine, lipase, sels biliaires et α -amylase pour isoler les composés indigestibles, suivi d'une fermentation colonique dans des conditions anaérobies, a été développé pour estimer la bio-accessibilité intestinale de composés phénoliques issus d'un repas complet de type méditerranéen (céréales, légumes, noix et fruits) ou d'aliments céréaliers [81, 82]. La bio-accessibilité correspond à la

quantité de polyphénols libérés de la matrice alimentaire et ainsi disponibles pour l'absorption intestinale. Il a été ainsi évalué que 48% des polyphénols totaux du repas de type méditerranéen sont disponibles pour le passage du petit intestin et que 42% deviennent bio-accessibles uniquement à partir du côlon. Seuls 10% des composés phénoliques totaux seraient inaccessibles, piégés par la matrice alimentaire après la totalité du processus de digestion. Les antioxydants seraient relargués tout au long du processus de digestion, permettant une absorption au niveau des différentes régions de l'intestin. En premier lieu, les composés libres de la matrice alimentaire seraient disponibles dans le tractus digestif par simple solubilisation. Puis les conditions acides et l'hydrolyse partielle des sucres et protéines faciliteraient la libération des composés liés plus ou moins fortement à la matrice [82].

c) Conjugaison des composés phénoliques

Durant l'étape d'absorption intestinale, les composés phénoliques sont conjugués dans les entérocytes avant d'atteindre le foie où ils sont à nouveau métabolisés [83].

Citons l'exemple de la catéchine qui est hautement métabolisée dans le foie. Après avoir été administrée directement dans l'intestin de rats, la moitié de la catéchine introduite et circulant dans le plasma mésentérique est retrouvée sous forme O-méthylée avant d'atteindre le foie. En revanche, 99% de la catéchine excrétée dans la bile était sous forme O-méthylée [83]. Les métabolites circulants de la (+)-catéchine ont été en partie identifiés. Ainsi après ingestion de vin, il a été montré que la (+)-catéchine circulait principalement sous forme de glucuronides et sulfoglucuronides de 3'-O-méthylcatéchine. Moins de 2% de la catéchine et de la 3'-O-méthylcatéchine plasmatique circulent sous forme libre une heure après absorption [84].

De nombreux métabolites de quercétine, incluant des glucuronides et sulfates de quercétine et de son 3'-O-méthyléther, ont été identifiés à partir de plasmas de rats et d'hommes [85]. Une étude *in vitro* portant sur l'activité de UDP-glucuronosyltransférase a mis en évidence que la glucuronidation de la quercétine s'effectuait préférentiellement en position 4', suivie par les positions 3', 7 et 3 [86]. Pourtant, dans une étude plus récente *in vivo*, la quercétine-3-O- β -D-glucuronide s'est révélée le métabolite majeur identifié dans le plasma de volontaires ayant consommés des oignons [87]. Les réactions de méthylation, sulfatation et glucuronidation se déroulent *via* l'action de différentes enzymes cellulaires (glucuronyltransférases, sulfotransférases, catéchol O-méthyl transférases ou COMT). C'est un procédé métabolique de détoxification commun à beaucoup de xénobiotiques qui restreint leurs effets toxiques potentiels et facilite leur élimination biliaire et urinaire en augmentant leur hydrophilie.

La plupart des études menées sur des animaux ou sur des hommes s'accordent à montrer que les anthocyanes sont détectées rapidement dans le plasma suggérant une absorption dès l'estomac sous leur forme native de glycosides [88]. Leur mécanisme d'absorption au travers du compartiment gastrique reste encore inconnu [89]. Dans la muqueuse intestinale, la COMT et les glucuronyltransférases entraînent la méthylation et la glucuronidation des formes absorbées. Quelques glycosides d'anthocyanes intacts seraient toutefois présents dans ces tissus [89, 90]. Dans le plasma et dans les urines, les anthocyanes apparaissent donc comme un mélange de différentes formes natives et conjuguées. En dépit de leur instabilité à un pH physiologique, quelques formes aglycones, résultant de l'activité des β -glucosidases, auraient aussi été mises en évidence dans les échantillons de plasma [89]. Enfin dans le côlon, les anthocyanes exposées à la flore microbienne seraient dégradées en acides phénoliques puis absorbées sous ces formes [88].

Les acides hydroxycinnamiques sont rapidement absorbés à travers le petit intestin puis glucuronidés. L'analyse du plasma et de l'urine de 3 volontaires deux heures après l'ingestion de prunes, fruits connus pour leurs fortes teneurs en acides hydroxycinnamiques, montre que les formes majoritaires circulantes puis excrétées sont des glucuronides et sulfates. Quelques traces d'acide caféique libre et d'acide chlorogénique seraient toutefois présentes dans les échantillons analysés [91]. Dans une autre étude, après consommation de café, importante source d'acide chlorogénique, les glucuronides des acides féruliques et isoféruliques sont détectés dans le plasma [92]. Lors de l'absorption, il y a donc clivage de la liaison ester puis méthylation du noyau catéchol et glucuronidation. Ainsi, très peu d'acide chlorogénique est absorbé intact depuis l'intestin grêle. Le seul site significatif pour l'absorption de ce composé serait la microflore du côlon qui possède une activité estérase. Plus récemment, une étude a contesté ces résultats. L'analyse du plasma de sujets ayant ingéré du café a révélé la présence majoritaire de formes natives, telles que l'acide chlorogénique, soulignant ainsi la possibilité d'une absorption de ces composés chez l'homme dès l'estomac et l'intestin grêle [93].

d) Concentrations plasmatiques et élimination

La concentration plasmatique atteinte après consommation de polyphénols varie en fonction de la nature du polyphénol et de sa source alimentaire.

Après un repas riche en glycosides de quercétine, il a été montré par plusieurs études que la concentration plasmatique de métabolites de quercétine était comprise entre 0,1 et 10 μ M [85, 94]. Cela

dit, quand la quantité de polyphénols ingérés n'excède pas celle naturellement fournie par notre alimentation, la concentration de flavonoïdes dans le plasma humain n'excède jamais 1 μM [72, 95]. Les concentrations maximales sont très souvent atteintes 1 à 2 heures après ingestion [80, 84], sauf pour les polyphénols qui sont absorbés après dégradation partielle par la microflore intestinale. Pour la rutine, par exemple, la concentration maximale de quercétine (mélange de formes conjuguées) trouvée dans le plasma est atteinte 9 heures après ingestion [95]. A contrario, l'absorption des acides phénoliques de la bière (acides caféique, férulique, *p*-coumarique, 4-hydroxyphénylacétique et vanillique) s'est révélée très rapide puisque la concentration maximale des métabolites a été atteinte 30 minutes seulement après l'ingestion de bière, suggérant une absorption dans la partie proximale de l'intestin [96]. Pour la plupart des flavonoïdes absorbés par le petit intestin, la concentration plasmatique diminue ensuite rapidement (période de demi-vie d'élimination de 1 à 2 heures). Cette excrétion rapide est facilitée par la conjugaison de l'aglycone. L'élimination de la quercétine est plus longue (24 heures) et pourrait s'expliquer par la haute affinité des métabolites de la quercétine pour l'albumine du plasma, des études ayant indiqué qu'ils sont liés à l'albumine à hauteur de 80% [97, 98]. Le maintien d'une concentration significative requiert donc une ingestion de polyphénols répétée dans le temps [83].

Plus récemment, il a été montré que des métabolites de la quercétine (glucuronides et sulfates) étaient retrouvés non seulement dans le plasma mais aussi dans la lymphe de rats [75]. Cette découverte indique que les métabolites de quercétine sont transportés à la fois par la veine porte et par les veines lactées, capillaires lymphatiques situés dans les villosités du petit intestin et absorbant les graisses alimentaires pour former la chyle (mélange blanchâtre de lymphe et de graisses). Le mécanisme déterminant le choix du mode de transport des métabolites (système veineux ou système lymphatique) est encore inconnu mais il semblerait que la composition du repas ait une influence sur celui-ci. Il a été par exemple suggéré que la co-administration de quercétine et de lipides faciliterait le transfert des métabolites dans la lymphe. Ce nouveau mécanisme de transport des flavonoïdes depuis la muqueuse gastrointestinale, *via* la circulation lymphatique, en parallèle au transport veineux, nécessite d'être étudié plus en détails mais il indique de nouvelles pistes concernant la biodisponibilité et les tissus cibles des flavonoïdes.

IV.2.5 Mécanismes d'action antioxydante des polyphénols

En plus de leurs rôles biologiques au sein des plantes, les polyphénols ont été largement étudiés pour leurs effets possibles sur la santé et leur implication probable dans la prévention des cancers, des maladies cardio-vasculaires et de la neurodégénérescence. Quelque soit les mécanismes

mis en jeu, la plupart peut être associée aux propriétés fondamentales des polyphénols telles que leurs propriétés antioxydantes et leurs interactions avec des protéines spécifiques (kinases, facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression génétique), ces derniers pouvant notamment entraîner une inhibition des enzymes productrices d'ERO ou stimuler l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes [99, 100].

Plusieurs propriétés des polyphénols sont à l'origine des effets antioxydants observés *in vitro* : (i) le piégeage des espèces réactives de l'oxygène, (ii) la chélation des ions métalliques initiateurs des phénomènes d'oxydation et (iii) l'inhibition d'enzymes impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène.

a) Relation structure/pouvoir réducteur

➤ **Les flavonoïdes**

Chez les flavonoïdes, le nombre et la position sur le squelette en C15 des groupements OH influencent considérablement leur capacité à piéger les radicaux.

(i) La présence de groupements hydroxyles en positions 3' et 4' (noyau catéchol) augmente fortement le pouvoir réducteur des flavonoïdes, c'est-à-dire leur aptitude à réduire les ERO (propriétés antioxydantes) mais aussi, le cas échéant, leur instabilité au dioxygène (autoxydation), qui peut entraîner la production d'ERO (propriétés pro-oxydantes). L'oxydation à 1 électron d'un flavonoïde dont le cycle B est de type catéchol conduit à un radical *ortho*-semiquinone relativement stable grâce à une délocalisation des électrons et une stabilisation par liaison hydrogène intramoléculaire [101, 102]. La présence d'un groupement catéchol est le déterminant majeur de l'activité redox des polyphénols en général.

(ii) L'extension de la délocalisation électronique du cycle B au cycle A *via* une unité énone (O=C-C=C) sur le cycle C permet une stabilisation supplémentaire du radical aryloxy. Dans ce cas, la présence additionnelle d'un groupement hydroxyle en position 3 (groupement énonol sur le cycle C) abaisse fortement le potentiel redox.

(iii) L'activité redox des flavonoïdes étant gouvernée par certains OH libres critiques, leur O-méthylation ou O-glycosylation diminue fortement leur activité antioxydante [103].

Ainsi, la quercétine est intrinsèquement un antioxydant puissant (plus fort que la catéchine, par exemple) qui présente 3 OH labiles (facilement dissociables) sur les positions 3, 3' et 4'. Son caractère

réducteur est accentué à pH neutre par la déprotonation des OH les plus acides (en positions 4' et 7) [104, 105].

➤ **Les acides phénoliques**

Outre le groupement catéchol déterminant, la position du groupement CO₂H en ortho ou para d'un groupement hydroxyle facilite la dissociation homolytique de ce dernier et augmente donc le pouvoir antioxydant intrinsèque [104].

L'insertion d'un groupement éthylénique entre le noyau catéchol et le groupement carboxylate a un effet favorable sur les propriétés réductrices du groupement OH en para de la chaîne en permettant une meilleure stabilisation par résonance du radical aryloxy correspondant [104]. Ainsi, dans des systèmes lipidiques, les acides hydroxycinnamiques caféique, sinapique, férulique et *p*-coumarique se sont montrés des inhibiteurs de peroxydation plus efficaces que leurs homologues phénoliques (acides protocatéchiq, syringique, vanillique et *p*-hydroxybenzoïque).

Cependant, en milieu biphasique lipide-eau, l'activité antioxydante des composés phénoliques et leur mode d'action dépendent aussi de leur balance hydrophile-lipophile (BHL) qui gouverne la partition des antioxydants entre les 2 phases. Dans le cas de l' α -tocophérol, une phase de latence bien définie a été observée dans l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique initiée par le dérivé azoïque AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride). Ce comportement est typique d'un antioxydant amphiphile briseur de chaînes radicalaires par réduction des radicaux LOO[•] en phase lipidique. En ce qui concerne un antioxydant hydrophile tel que la quercétine, la peroxydation n'est que ralentie sans phase de latence bien définie. Ce comportement peut s'interpréter par une action antioxydante dans la phase aqueuse par réduction des radicaux peroxydes hydrosolubles dérivés du AAPH [106, 107].

b) Les propriétés chélatrices des polyphénols

Les propriétés chélatrices des polyphénols contribuent à leur activité antioxydante. Cette contribution est souvent difficile à distinguer du pouvoir réducteur car les critères structuraux qui permettent un fort pouvoir chélatant sont aussi ceux qui permettent un fort pouvoir réducteur. La réduction du peroxyde d'hydrogène par les ions Fe²⁺ et Cu⁺ génère le radical hydroxyle, qui peut alors oxyder les biomolécules environnantes (réaction de Fenton).

La réaction de Fenton est fortement inhibée par les flavonoïdes comportant des groupements catéchol (3',4'-diOH), 3-hydroxy-4-oxo et 5-hydroxy-4-oxo [101, 105] permettant la chélation des ions métalliques.

Les mesures de constantes de stabilité effectuées pour une série de trois flavones indiquent que le pouvoir complexant de Fe^{3+} diminue selon l'ordre : 3',4'-dihydroxyflavone > 3-hydroxyflavone > 5-hydroxyflavone [108]. Cependant des travaux théoriques récents suggèrent que le site optimal pour la complexation des ions du fer par la quercétine est le groupement 3-hydroxy-4-oxo. Cette tendance s'applique à la lutéoline et au kaempférol. Il a été également montré qu'un complexe de deux molécules de quercétine avec un ion fer est plus stable que les complexes comprenant 1 ou 3 molécules de quercétine. La Figure 28 représente les différents complexes quercétine/Fe possibles [109]. Le groupement 3-hydroxy-4-oxo serait également le site privilégié pour la complexation des ions du cuivre.

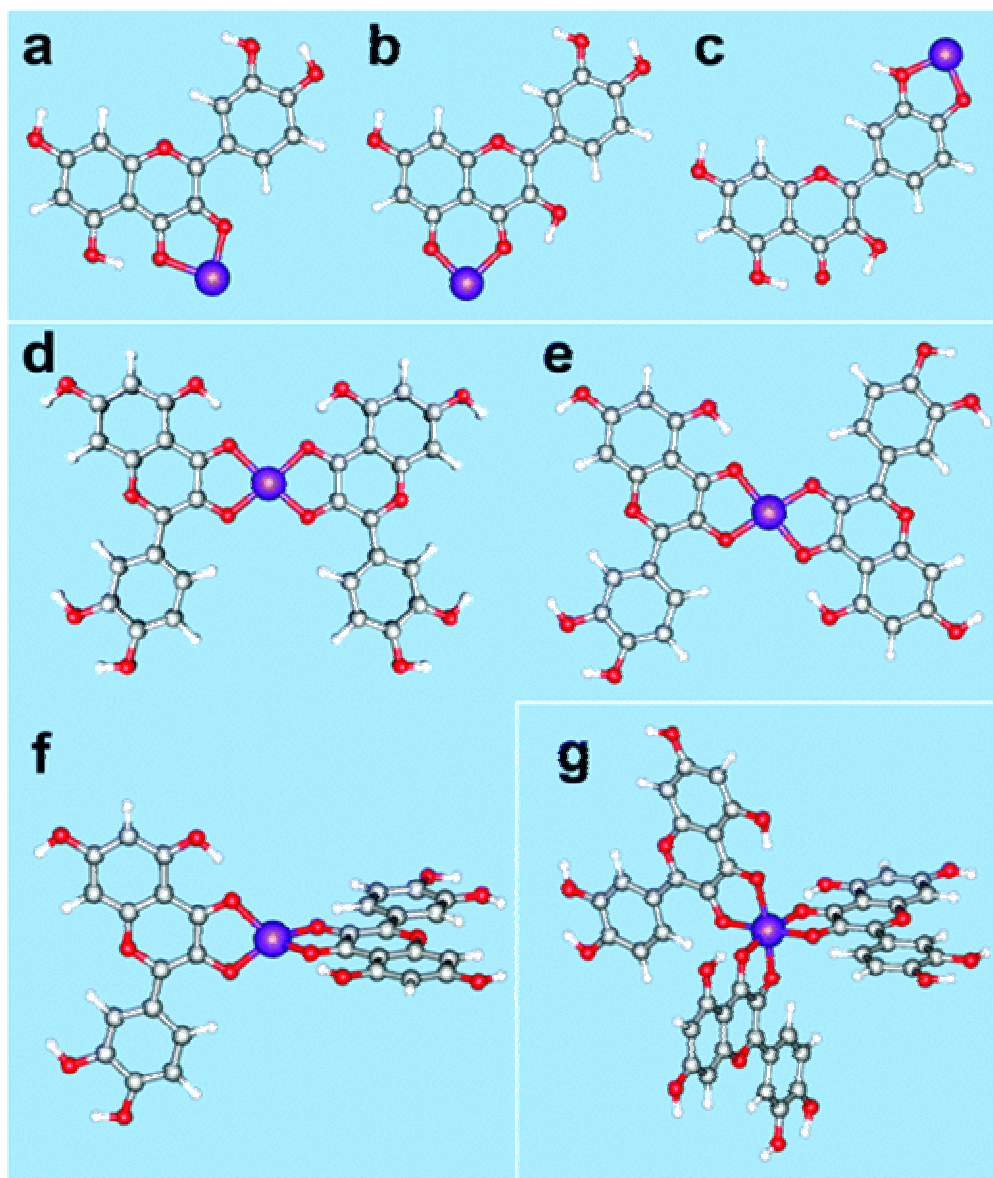


Figure 28. Configuration des différents complexes quercétine/Fer. Sphère bleue = Fer a) Fe-Que (site 3-4); b) Fe-Que (site 4-5); c) Fe-Que (site 3'-4'); d) Fe-2Que, structure planaire avec symétrie de réflexion; e) Fe-2Que, structure planaire avec symétrie d'inversion; f) Fe-2Que, structure avec 2 molécules dans des plans orthogonaux; g) Fe-3Que, avec 6 liaisons covalentes pour le Fer. Par Ren *at al.* [109].

Dans une étude portant sur la capacité des catéchines à inhiber la peroxydation de l'acide linoléique dans des micelles de SDS (initiée par le 2,2-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile), AMVN), il a été montré que certains ions (Cu^{2+} et Mn^{2+}) augmentaient l'activité antioxydante de la (-)-épigallocatechine gallate (EGCG), alors que d'autres (Fe^{2+}) l'inhibaient. Dans les deux cas, les valeurs de pKa de l'EGCG sont diminuées. En revanche, les modifications du potentiel redox induites par la formation des complexes métalliques (impliquant le noyau B et/ou le résidu gallique) consistent en une diminution dans le cas de Cu^{2+} et en une augmentation dans le cas de Fe^{2+} , ce qui pourrait expliquer les effets observés [110].

La formation de complexes peut aussi avoir un impact sur la solubilité des composés phénoliques et des ions métalliques. Ainsi une précipitation des complexes peut avoir lieu. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des tanins et peut s'expliquer par (i) la formation de complexes non chargés à partir du cation métallique, (ii) la réduction de la polarité du tanin et (iii) la formation de complexes de haut poids moléculaire. Dans une moindre mesure, ce phénomène a aussi été observé avec des composés phénoliques de faibles poids moléculaires (pyrogallol, acide gallique, catéchol, (+)-catéchine, acide *p*-hydroxybenzoïque) et les ions du cuivre [111]. La précipitation des complexes est de grande importance d'un point de vue nutritionnel, puisqu'elle contribue à réduire l'absorption intestinale non seulement d'ions métalliques essentiels à l'organisme mais aussi de composés phénoliques antioxydants potentiels.

d) Les composés phénoliques : une action pro-oxydante ?

Tandis que les propriétés antioxydantes des flavonoïdes corroborent l'hypothèse d'un rôle positif dans la nutrition humaine et la prévention de maladies, certains auteurs invoquent l'activité prooxydante de ces composés *in vitro* [103]. Peu d'informations existent sur le mécanisme de l'activité prooxydante. Certains auteurs suggèrent que les produits d'oxydation à un ou deux électrons des composés phénoliques (radicaux aryloxy, *o*-quinones, *p*-méthylènequinones), produits par exemple en présence de dioxygène et d'ions métalliques, pourraient endommager l'ADN, les lipides et d'autres biomolécules de par leurs caractères oxydant et électrophile. Leur formation dans des processus d'autoxydation peut par ailleurs s'accompagner de la production d'ion superoxyde et par conséquent de peroxyde d'hydrogène [112]. Cette capacité prooxydante pourrait être responsable des effets cytotoxiques et proapoptiques des flavonoïdes [113].

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux définir la frontière entre effets prooxydants et effets antioxydants.

Quoi qu'il en soit, les nombreux effets positifs sur la santé attribués aux composés phénoliques ne mettent pas uniquement en jeu les propriétés antioxydantes mais aussi des propriétés plus spécifiques impliquant leur interaction avec diverses protéines au sein de la cellule.

IV.2.6 Propriétés biologiques et effets santé des polyphénols

Les régimes alimentaires de type méditerranéen, caractérisés par une consommation importante de fruits et légumes, céréales, et produits transformés d'origine végétale sont inversement corrélés aux risques de maladies cardiovasculaires [114] et éventuellement de cancers [115]. Ces effets

bénéfiques, attribués en partie aux microconstituants de ces aliments, sont à l'origine de l'intérêt grandissant porté aux composés phénoliques.

Ces derniers possèdent des activités biologiques très variées. Outre les activités antimicrobiennes et antiinflammatoires attribuées aux polyphénols, ils pourraient jouer un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires et du cancer.

a) Les différentes propriétés biologiques associées aux composés phénoliques

Propriétés antimicrobiennes, antivirales, antiinflammatoires, antitumorales, anticancers, et bien d'autres encore!!! Les propriétés biologiques *in vitro* attribuées aux polyphénols sont en effet très nombreuses [113]. Elles sont souvent corrélées à leur capacité antioxydante et à leur capacité à chélater les ions métalliques.

Par exemple, il a été montré *in vitro* que certains flavonoïdes (quercétine, catéchine, cyanidine), grâce à leurs propriétés antioxydantes, possèdent un rôle protecteur vis-à-vis de l'oxydation de l'ADN à des concentrations proches des concentrations physiologiques (0,1 et 1 μM) [116].

Les polyphénols peuvent aussi moduler voir inhiber l'activité de métalloenzymes impliquées dans le stress oxydant (xanthine oxydase et lipoxygénase). De nombreux flavonoïdes sont notamment des inhibiteurs de la 15-lipoxygénase. Les mécanismes d'action présumés sont multiples. Les propriétés réductrices ou chélatantes pourraient être mises en jeu au niveau du site actif de l'enzyme, laissant supposer une incorporation des flavonoïdes au sein de la cavité hydrophobe des enzymes. La formation d'adduits covalents entre les produits d'oxydation des flavonoïdes (*o*-quinones, *p*-méthylènequinones) et des groupes amines ou sulfhydryles du site actif de l'enzyme serait aussi une explication à l'inactivation irréversible de l'enzyme [117].

Cependant, les données récentes sur cellules et animaux suggèrent que les mécanismes en jeu ne sont vraisemblablement pas de type antioxydant mais procèdent par régulation de l'expression de certains gènes codant par exemple pour les enzymes cytochromes P450 (impliquées dans la détoxification des xénobiotiques mais aussi dans l'activation de certains composés pro-carcinogènes), les enzymes antioxydantes (gènes de la famille AERE ou *antioxidant/electrophile responsive element*), les protéines kinases (impliquées dans la régulation de la croissance et de la division cellulaire)...

Les effets antiinflammatoires de la quercétine, observés au sein des cellules épithéliales de la barrière intestinale, sont un autre exemple de ces mécanismes cellulaires spécifiques. La quercétine

stimulerait ainsi la fonction de la barrière intestinale *via* l'induction directe de l'expression d'une protéine claudine-4) des jonctions serrées (qui scellent les cellules épithéliales et endothéliales entre elles). La régulation de ce mécanisme cellulaire représente un rôle protecteur important contre les troubles de la barrière impliqués dans l'inflammation intestinale [118].

De la même façon, de nombreux flavonols, dont la quercétine, pourraient réguler le facteur de transcription NF- κ B, activé par les ERO et responsable de phénomènes d'inflammation *via* l'expression de gènes codant pour les cytokines, la NO (oxyde nitrique) synthase et les molécules d'adhésion. En modulant ou supprimant l'activation du facteur nucléaire NF- κ B, la quercétine bloquerait la production de médiateurs nocifs impliqués notamment dans la pathologie d'hypertension portale [119]. Les flavonols inhiberaient aussi, de cette façon, l'expression génétique du facteur TNF α , facteur α de nécrose tumorale, présent dans les globules blancs et impliqué dans l'inflammation systémique et dans les réactions de phase aiguë [101, 120].

b) Les activités biologiques des métabolites de composés phénoliques

Les activités biologiques des polyphénols sont souvent évaluées *in vitro*, sur des enzymes purifiées, des cultures cellulaires ou des tissus isolés en utilisant les composés sous forme d'aglycones, ou les glycosides présents dans les aliments. Peu d'informations existent sur les propriétés biologiques des formes conjuguées présentes dans le plasma ou les tissus du fait de lacunes dans l'identification précise des formes conjuguées et de la nécessité de les synthétiser par voie chimique ou enzymatique. Pourtant, le métabolisme des polyphénols peut avoir un impact considérable sur leur activité. Par exemple, la glucuronidation et la sulfatation rendent les polyphénols plus hydrophiles, ce qui peut affecter leur site d'action et leurs interactions avec les protéines. De plus, les propriétés réductrices des polyphénols peuvent être modifiées par conjugaison (le plus souvent, fortement diminuées). Ainsi, la nature et la position des substitutions peuvent réduire voire abolir les activités observées pour les aglycones.

Dans certaines études *in vitro*, les métabolites des composés phénoliques maintiennent une activité biologique équivalente à celle du composé aglycone. Ainsi, la quercétine 3-O-glucuronide se révèle aussi efficace que la quercétine dans la prévention de l'hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires induites par l'angiotensine II [121]. En revanche, après conjugaison de la quercétine par l'UGT (UDP-glucuronosyltransférase) du foie humain, il s'est avéré que seules la quercétine-3'-glucuronide et la quercétine-4'-glucuronide, parmi les 5 glucuronides formés, restaient des inhibiteurs potentiels de la xanthine oxydase. Cependant, tous les glucuronides de la quercétine, à l'exception de

la quercétine-3-glucuronide, inhibent la lipoxgénase du soja, mais de façon modérée par rapport à la quercétine [86].

Dans une étude plus récente, il a été montré qu'au sein de macrophages activés, les métabolites de quercétine pouvaient être déconjugés en leur forme aglycone plus active, laquelle était ensuite méthylée en position 3' [87]. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la prévention de l'athérosclérose par les flavonoïdes. Il sera développé dans le paragraphe suivant consacré à l'effet santé des composés phénoliques.

La distribution, la concentration et les interactions des formes conjuguées de composés phénoliques au sein du plasma sont aussi des facteurs pouvant moduler les propriétés biologiques de ces formes métabolisées. Les métabolites de quercétine, circulant sous formes liées à l'albumine après consommation d'un régime riche en quercétine [97], pourraient jouer un rôle contre l'oxydation des LDL. Cela dit, cette activité n'a été observée que pour des fortes concentrations de métabolites de quercétine et n'a pas été vérifiée après ingestion d'un repas riche en oignons, très certainement à cause des faibles concentrations de métabolites et de leur pouvoir réducteur bien plus faible que celui de la quercétine [98].

c) L'effet santé des composés phénoliques

➤ **Maladies cardiovasculaires et athérosclérose**

Les différentes études épidémiologiques portant sur la relation entre alimentation et maladies cardiovasculaires, s'accordent à reconnaître le rôle bénéfique des polyphénols de l'alimentation dans la protection contre ces maladies [122, 123]. Plusieurs études de cohortes ont montré que la prise de flavonols et de flavones était inversement corrélée aux taux de mortalité des maladies coronariennes [124]. Il s'avère notamment que de fortes prises de quercétine et de kaempférol réduisent le taux de mortalité due à des accidents cardiaques de type ischémie, dans lesquels peuvent être mises en cause les plaques d'athérome [125].

Les mécanismes d'action des polyphénols, impliqués dans la prévention de ce type de pathologies, incluent l'inhibition de l'oxydation des LDL, l'inhibition de l'aggrégation des plaquettes et l'inhibition de la formation de cellules spumeuses dans les artères [123].

Comme cela a déjà été mentionné, l'oxydation des LDL est un phénomène précurseur de l'athérosclérose. De nombreux travaux se sont donc penchés sur l'étude de l'oxydation des

lipoprotéines et de sa modulation par des composés phénoliques apportés par l'alimentation (expériences *ex vivo*) ou ajoutés aux LDL après leur isolation (expérimentations *in vitro*) [126] [127]. Dans la plupart des cas, le rôle préventif d'aliments riches en polyphénols (vin, thé) et des polyphénols eux-mêmes (extraits de végétaux) à l'égard de l'oxydation des LDL a pu être vérifié. *Via* leur pouvoir antioxydant, les polyphénols augmenteraient le statut antioxydant du plasma et la résistance des LDL aux modifications oxydantes [128, 129].

L'agrégation des plaquettes sanguines est provoquée par divers inducteurs (collagène, thrombine, ADP) et associée à la formation de thrombus ou caillot sanguin. La formation du thrombus est un événement responsable d'accidents comme l'infarctus du myocarde ou l'angine de poitrine (angor) à l'origine des cardiopathies. Des études *in vitro* ont vérifié l'inhibition de l'agrégation des plaquettes par des polyphénols d'origine alimentaire. Le pouvoir d'antiagrégation des polyphénols est associé à leur pouvoir antioxydant mais aussi à des mécanismes de régulation cellulaire, *via* leur capacité à interagir avec des protéines et enzymes impliquées dans le réseau de signalisation conduisant à l'agrégation des plaquettes. Dans ces études *in vitro*, les composés phénoliques testés correspondent aux composés natifs (et non aux métabolites) et les concentrations utilisées sont parfois extrêmes, pouvant aller jusqu'à 1 mM. Dans ce contexte, l'évaluation des effets physiologiques réels s'avère difficile et nécessitera des études *in vivo* [130].

Plus récemment, un nouveau mécanisme dans la prévention de l'athérosclérose a été mis en évidence par des chercheurs japonais. Ces derniers ont montré que les macrophages activés (ou cellules spumeuses) pouvaient être la cible directe des flavonoïdes alimentaires au niveau de l'aorte. Ainsi par des études immunohistochimiques, il a été démontré que la quercétine-3-glucuronide (Q3GA), métabolite plasmatique majeur de la quercétine, s'accumulait dans les lésions athérosclérotiques mais pas dans des aortes normales. Après internalisation dans les macrophages activés, Q3GA est déglucuronidée en quercétine, laquelle est ensuite partiellement convertie en son 3'-O-méthyléther. De plus, Q3GA aurait la capacité d'inhiber l'expression de l'ARNm des récepteurs « scavengers » (SR) des LDL oxydés impliqués dans la formation des cellules spumeuses (Figure 29). Ces résultats suggèrent que les métabolites de quercétine peuvent inhiber la formation des cellules spumeuses. Les artères inflammées contenant des macrophages activés seraient ainsi la cible directe des métabolites de la quercétine [87].

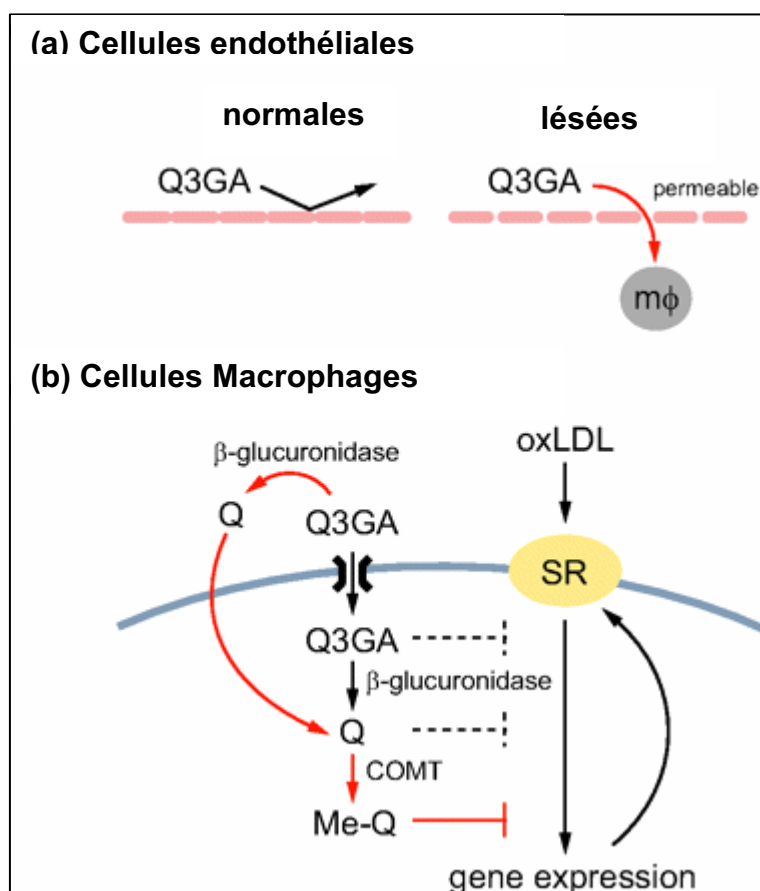


Figure 29. Mécanismes proposés pour l'action de Q3GA dans les cellules vasculaires. a) Infiltration de la Q3GA à travers les cellules endothéliales lésées dans l'intima. b) actions de la Q3GA et des métabolites cellulaires dans les macrophages. MΦ : macrophage, SR : « Scavenger receptor », Q : quercétine aglycone, Me-Q : 3'-O-méthylquercétine, COMT : catéchol-O-méthyl-transférase. La couleur rouge indique les mécanismes majeurs dans les cellules endothéliales (infiltration) et les macrophages (inhibition de SRs). Par Kawai *et al.*, 2008 [87].

➤ Propriétés anticancéreuses

Les propriétés anticancéreuses des polyphénols ont été mises en évidence dans de nombreuses études *in vitro*, utilisant des cultures cellulaires cancéreuses ou des animaux prétraités par des réactifs chimiques carcinogènes.

Ainsi, à l'aide des lignées cellulaires cancéreuses du côlon, HT-29 et Caco-2, il a pu être mis en évidence qu'un extrait phénolique de raisin inhibait la croissance cellulaire des deux types de lignées. La fraction riche en anthocyanes présente l'activité inhibitrice la plus marquée en comparaison à la fraction contenant les acides phénoliques. Elle induirait la fragmentation de l'ADN, provoquant ainsi l'apoptose des cellules tumorales [131]. De la même façon, à partir de diverses lignées cellulaires tumorales humaines (cellules de la cavité buccale (KB, CAL-27), du sein (MCF-7), du côlon (HT-29,

HCT116) et de la prostate (LNCaP)), les pouvoirs anti-cancer et pro-apoptotiques d'extraits de baies et riches en anthocyanes, flavonols, flavanols, tanins et acides phénoliques ont pu être vérifiés [132].

L'inhibition de l'expression d'enzymes clés, impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire lors de la carcinogénèse (cycloxygénase-2, protéines kinases), l'inhibition de l'activation du facteur NF- κ B (déjà mentionnée dans la paragraphe « activités biologiques »), l'inhibition de l'activation d'agents pro-carcinogènes (par exemple, les hydrocarbures polycycliques) par les enzymes de type cytochromes P450 et l'inhibition de l'oxydation de l'ADN sont les principales propriétés (observées *in vitro*) attribuées aux polyphénols pour expliquer leur rôle dans la prévention des cancers [123, 133]. Dans le cas des cytochromes P450, les polyphénols peuvent directement inhiber les enzymes (formation de complexes enzyme-inhibiteur) mais aussi leur expression (par interaction dans le cytosol avec un facteur de transcription appelé 'récepteur des hydrocarbures polycycliques').

Les effets anticancer des polyphénols observés *in vitro* sont donc attribués à différents mécanismes biochimiques incluant principalement l'inhibition de la prolifération des cellules, l'initiation de l'apoptose des cellules tumorales et la modulation de l'expression d'enzymes clé. Cependant, si ces études cellulaires *in vitro* sont intéressantes, les études épidémiologiques sont plus nuancées.

De nombreuses études épidémiologiques ont cherché à mettre en relation la consommation de polyphénols et la prévention de divers types de cancers (poumon, prostate, estomac, rectum, etc...). Pour la plupart, elles se déroulent sur plusieurs années (5-6 ans) et utilisent les données de consommation de fruits et légumes des populations étudiées pour calculer leurs prises moyennes en composés phénoliques et tenter de les corrélés à leur état de santé [125, 134]. Les nombreuses études et revues scientifiques faisant état de ces travaux mettent en évidence la controverse des résultats entre études biologiques et études épidémiologiques portant sur des régimes alimentaires riches en antioxydants (fruits et légumes, thé, vin). Ainsi si certains auteurs observent une association entre la consommation de café, de thé ou de certains polyphénols et la diminution du risque de cancers de l'estomac et du côlon, la plupart des études épidémiologiques ne confirment pas ces effets [120, 122, 124, 125, 135].

Les données des études épidémiologiques « polyphénols vs. cancer » se révèlent donc peu concluantes et difficiles à mettre en relation avec les résultats observés *in vitro*.

IV.3 Les différentes méthodes de mesure de pouvoir antioxydant

Les données récentes sur la biodisponibilité et les effets santé potentiels des polyphénols montrent clairement la nécessité de reconsidérer leur activité antioxydante. Elle ne pourrait être que marginale dans les effets biologiques post-absorption en raison même des faibles concentrations circulantes (au mieux 1 μM) au regard de la capacité antioxydante totale du plasma (de l'ordre de 1 mM) mais aussi en raison de la forte conjugaison intestinale et hépatique des polyphénols qui typiquement abaisse fortement leur pouvoir réducteur. C'est la raison pour laquelle notre travail est focalisé sur la modélisation d'effets antioxydants avant absorption intestinale, c'est-à-dire dans le tractus digestif. Notre hypothèse est que c'est en ce site, où les formes natives peuvent s'accumuler en fortes concentrations, que l'étude de l'activité antioxydante des polyphénols prend tout son sens.

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour déterminer l'activité antioxydante d'aliments, d'extraits ou de composés individuels. Ces tests peuvent se diviser en deux catégories : les tests mesurant le transfert d'électrons ou d'hydrogène vers un radical coloré stable facile à détecter et ceux faisant intervenir une compétition entre l'antioxydant et une cible à protéger (pigments, lipides). Seuls les tests les plus courants seront développés dans cette partie.

IV.3.1 Mesure du transfert d'électrons et/ou d'atomes H vers un radical stable

a) Test de réduction du radical stable DPPH \cdot

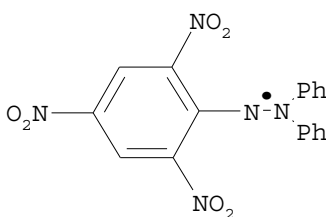


Figure 30. Structure du radical stable DPPH \cdot

Le DPPH \cdot (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Figure 30) est un radical stable qui présente une bande d'absorption maximale à 515 nm dans le méthanol. Cette bande disparaît lors de la réduction du DPPH (en l'hydrazine correspondante) par un composé donneur d'atomes H (AH) [Eq. 26].



Le composé à tester est ajouté à une solution méthanolique ou éthanolique de DPPH• en grand excès. Dans la version la plus simple du test, après 10 à 30 min de réaction dans le noir (durée nécessaire pour le transfert de tous les atomes H labiles), l'absorbance résiduelle à 515 nm est enregistrée. La procédure est répétée en modifiant les concentrations du composé à tester.

Le potentiel donneur d'atomes H d'un échantillon est le plus souvent exprimé par le paramètre EC₅₀ qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration initiale de DPPH•. Plus le EC₅₀ est faible, plus l'antioxydant est efficace (plus grand nombre d'atomes H labiles), ce qui permet de déterminer des relations entre structure chimique et activité [136, 137].

Une analyse plus fine permet également de caractériser les antioxydants par des paramètres cinétiques. On peut ainsi déterminer la stoechiométrie totale (n_{tot} , inversement proportionnelle à EC₅₀) de la réaction, soit le nombre de radicaux DPPH• réduits par molécule antioxydante mais aussi la constante de vitesse de transfert du premier atome H vers le DPPH• [138].

D'un point de vue méthodologique, ce test est reconnu comme simple et approprié à la mesure de l'activité antioxydante de jus de fruits et légumes ou d'extraits. Les résultats sont très reproductibles et comparables à d'autres méthodes telles que le TEAC (même stoechiométrie pour le Trolox), même si le DPPH s'avère plus spécifique à l'évaluation d'antioxydants donneurs d'atomes H. En revanche, cette méthode n'est pas appropriée pour le mesure de l'activité antioxydante de plasma, les protéines étant précipitées dans le solvant alcoolique [139].

b) Test TEAC de réduction du radical-cation ABTS^{•+}

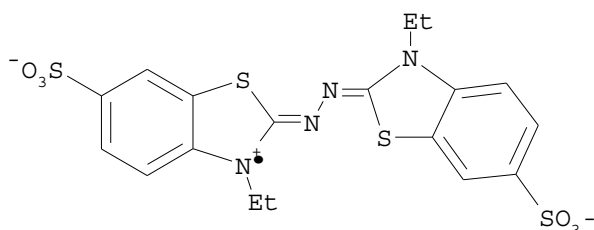


Figure 31. Structure du radical-cation ABTS^{•+}

Parmi toutes les méthodes utilisant un radical stable, le test TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) est le plus populaire. Le principe de cette méthode est d'enregistrer la consommation du radical ABTS^{•+} (Figure 31) suite à l'addition d'un échantillon contenant l'antioxydant. Le radical ABTS^{•+} est formé par oxydation du 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) ou ABTS par divers systèmes oxydants (metmyoglobine + H₂O₂, MnO₂, K₂S₂O₈). C'est un radical-cation relativement stable qui possède une forte absorption dans l'intervalle 600-750 nm et qui peut ainsi être

facilement suivi par spectrophotométrie. Un antioxydant réagit avec ABTS^{•+} (en excès) par transfert d'électron pour redonner l'ABTS incolore. La concentration d'ABTS^{•+} consommée durant la réaction avec l'échantillon est alors déterminée et exprimée en équivalent Trolox (équivalent hydrophile de l' α -tocophérol), ce qui correspond à la concentration de Trolox donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration 1 mM du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est faible, plus l'antioxydant est efficace.

L'avantage de ce test est la simplicité, ce qui permet son application en routine dans tout laboratoire. La solubilité du radical dans de nombreux solvants aqueux ou organiques permet aussi de travailler avec des antioxydants hydrophiles ou lipophiles et même avec les fluides biologiques (plasma sanguin) [140].

Toutefois, l'inconvénient principal des tests DPPH et ABTS^{•+} est de mettre en oeuvre un radical structurellement sans rapport avec les ERO typiquement produites dans un stress oxydant biologique.

IV.3.2 Les tests de compétition

a) Test ORAC

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) est très utilisé pour mesurer la capacité d'échantillons botaniques ou biologiques à réagir avec des radicaux peroxydes. Il met en jeu un composé naturellement fluorescent (initialement la protéine β -phycoérythrine remplacée par la fluorescéine pour un test plus robuste et moins coûteux [141]) et d'un générateur de radicaux libres hydrosoluble, le AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, noté R-N=N-R). Les radicaux ROO[•], issus de la décomposition thermique du AAPH en milieu aérobie, oxydent la fluorescéine en des produits non fluorescents. En général, le déclin de la fluorescence ($\lambda_{exc} = 485 \text{ nm} / \lambda_{em} = 525 \text{ nm}$) est suivi à 37°C pendant environ 30 minutes.

En présence d'antioxydants, la diminution de la fluorescence est ralentie. En effet, les antioxydants réagissent préférentiellement avec les radicaux peroxydes, protégeant ainsi la fluorescéine. Les données sont calculées en aire sous la courbe et standardisées par rapport à des concentrations connues de Trolox. Les résultats sont donc exprimés en TEAC, (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), c'est-à-dire en μmol d'équivalent Trolox par litre de solution.

Le test ORAC est appliqué dans des milieux aqueux et ne permet pas d'évaluer la capacité antioxydante d'extraits lipophiles. D'autres tests ont alors été développés pour mesurer le pouvoir antioxydant de caroténoïdes ou de tocophérols. Ils reposent sur deux principes : la solubilisation des

antioxydants lipophiles en solution aqueuse grâce à des cyclodextrines méthylées ou l'utilisation d'une sonde fluorescente et d'un générateur de radicaux peroxydes lipophiles tous deux solubles en solvant organique [142, 143].

b) Test de décoloration de la crocine (« crocin bleaching »)

La crocine est un caroténoïde hydrosoluble du safran présentant une forte bande d'absorption dans le visible ($\lambda_{\max} = 443 \text{ nm}$). Elle est décolorée par oxydation sous un flux de radicaux peroxydes. L'addition d'un antioxydant permet la protection de la crocine ralentissant ainsi sa décoloration. Pratiquement, la réaction se déroule en milieu aqueux. Initialement la décoloration de la crocine était initiée par des radicaux alkoxydes dérivés d'hydroperoxydes [144]. Actuellement le générateur de radicaux peroxydes AAPH est préféré.

L'analyse cinétique des données obtenues permet de déterminer le ratio k_a/k_c (constantes de vitesse des réactions de capture des radicaux par l'antioxydant et la crocine respectivement) qui mesure l'efficacité de l'antioxydant. Une application de ce test sera plus particulièrement développée dans le chapitre 5.

Le principal avantage de ce test par rapport au test ORAC est de ne nécessiter qu'un spectrophotomètre. Les limites de cette méthode sont toutefois nombreuses. La crocine absorbe à 450 nm comme beaucoup de pigments alimentaires. Elle est en fait constituée d'un mélange de pigments issus du safran et de ce fait peut subir des variations de composition lors de sa préparation. Tous ces problèmes limitent la répétabilité et l'utilité de cette méthode [143].

c) Test de décoloration du β -carotène (« β -carotene bleaching »)

Ce test est basé sur l'oxydation couplée du β -carotène et de l'acide linoléique solubilisés dans une solution aqueuse du tensioactif Tween-40. Il consiste à mesurer la décoloration du β -carotène ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$) résultant de son oxydation par les radicaux peroxydes issus de l'acide linoléique. L'addition d'un antioxydant dans ce système retarde la décoloration du β -carotène. Ainsi, ce test ne permet de déterminer qu'un pourcentage d'inhibition. L'autoxydation de l'acide linoléique n'étant pas toujours répétable, une amélioration est apportée en utilisant le AAPH comme amorceur de peroxydation lipidique [140].

Ces tests de compétition ont donc l'avantage de permettre l'utilisation d'échantillons biologiques comme le plasma, ce qui n'était pas le cas des tests TEAC ou DPPH.

d) Dosage des TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)

Ce test est communément utilisé dans le suivi de la peroxydation lipidique. Il est basé sur la détection du malondialdéhyde et des alcénals, produits secondaires de la réaction. En présence d'acide thiobarbiturique, un pigment rose est formé qui présente un maximum d'absorption à 532 nm et peut être facilement dosé par spectrophotométrie.

Cependant, ce test n'est pas un test spécifique. Beaucoup d'autres composés comme les protéines, l'urée, le saccharose peuvent plus ou moins réagir avec l'acide thiobarbiturique et former des espèces colorées interférant avec le test [145].

e) Oxydation des LDL

L'oxydation des LDL est considérée comme un événement important dans l'athérogénèse. De ce fait, le suivi cinétique de l'oxydation des LDL a été développé en tant que méthode de mesure de pouvoir antioxydant. L'oxydation, initiée par Cu^{2+} ou le AAPH, est suivie en spectrophotométrie en détectant l'accumulation des diènes conjugués (mélange d'hydroperoxydes et d'alcools lipidiques) [146]. La durée de la phase de latence (correspondant à la consommation des antioxydants endogènes ou ajoutés) et la pente de la courbe dans la phase de propagation sont les deux paramètres permettant de discriminer les antioxydants testés. Ce test est couramment pratiqué *in vitro*, mais il est aussi utilisé *ex vivo*, pour quantifier l'impact d'aliments ingérés (vin, café, oignons ...) sur l'oxydabilité des LDL [126, 128, 129].

Le test *in vitro* est généralement effectué avec des antioxydants natifs (non métabolisés) et à des concentrations nettement supérieures à celles trouvées *in vivo* [147, 148]. Ainsi, il perd toute pertinence biologique. Seules quelques études s'appliquent à tester des formes conjugués de composés phénoliques [149]

De plus, l'isolation des LDL par ultracentrifugation requiert beaucoup de temps et la conservation des LDL isolées est souvent délicate et de courte durée, rendant cette méthode fastidieuse.

f) Exemples de modèles chimiques simples basés sur l'inhibition de la peroxydation lipidique

Ces modèles ont l'avantage de la simplicité. Ils tendent à reproduire avec plus ou moins de pertinence des situations biologiques.

➤ **Le modèle micellaire.**

Ce modèle très courant met en jeu des solutions d'acide linoléique dans des micelles de tensioactifs usuels (SDS, Tween 20), afin de mimer grossièrement les membranes cellulaires ou les émulsions alimentaires [106, 150]. La réaction d'oxydation lipidique en présence ou en absence d'antioxydant est amorcée par ajout de AAPH. Les pentes des droites exprimant l'absorbance à 234 nm en fonction du temps correspondent aux vitesses de peroxydation R_p^0 (avant ajout de l'antioxydant) et R_p (après l'ajout de l'antioxydant).

Ce test permet à la fois d'évaluer quantitativement la capacité antioxydante de composés et de mettre en évidence certains aspects mécanistiques (modes d'inhibition, partition des antioxydants entre les phases aqueuse et micellaire). Le rapport R_p/R_p^0 , exprimé en fonction de la concentration d'antioxydant, permet la détermination graphique du paramètre IC_{50} . Cette concentration évaluée à $R_p/R_p^0 = 0,5$ correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour inhiber la peroxydation lipidique de 50%. Ainsi, il a été montré que la quercétine, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et des phénols typiques de l'huile d'olive (hydroxytyrosol et tyrosol) agissent comme simples « retardateurs » par réduction des radicaux initiateurs en phase aqueuse, contrairement à l' α -tocophérol qui se comporte comme un briseur de chaîne [151].

➤ **Le modèle de peroxydation lipidique initiée par la metmyoglobine et son inhibition par des antioxydants d'origine végétale**

Le principe de ce modèle est d'étudier, dans des conditions proches du milieu gastrique, l'oxydation des lipides de l'alimentation en présence d'agents pro- ou antioxydants également d'origine alimentaire. Ce modèle permet d'évaluer (i) l'activité d'antioxydants introduits dans le modèle sous forme native et à des concentrations compatibles avec celles ingérées dans l'alimentation, (ii) la protection des acides gras polyinsaturés essentiels apportés par l'alimentation et (iii) la prévention de la formation de produits d'oxydation lipidique biodisponibles et potentiellement toxiques, à l'origine de maladies cardiovasculaires et dégénératives.

Dans un premier temps, un modèle simple a été développé par Emmanuelle Vulcain au cours de sa thèse (2001-2005) dans l'unité SQPOV [107, 152]. Il est constitué de solutions tamponnées

d'acide linoléique en présence de Tween 20 (pH 4 à 5,8, 37 °C) dans lesquelles l'oxydation est amorcée par la metmyoglobine, principale forme de fer alimentaire, et inhibée par une variété d'antioxydants lipophiles ou hydrophiles d'origine végétale. L'oxydation est suivie par la mesure de l'absorbance des diènes conjugués (principalement les hydroperoxydes LOOH) à 234 nm au cours du temps. La capacité antioxydante est évaluée par différents paramètres : la durée de la phase d'inhibition, la vitesse de peroxydation dans la phase de propagation et un paramètre IC₅₀. Cet indice est déterminé graphiquement. Il prend en compte la période T correspondant au temps nécessaire à l'accumulation d'une concentration donnée de LOOH en présence de concentrations variables d'antioxydants. L'IC₅₀ est alors déterminé comme la concentration d'antioxydants correspondant à une période T deux fois plus longue que la période contrôle sans antioxydant (T₀). Ainsi, plus l'IC₅₀ est faible, plus l'antioxydant est efficace.

Une analyse cinétique quantitative des courbes de peroxydation (exprimant l'absorbance à 234 nm en fonction du temps) et de la réactivité des formes hypervalentes de la metmyoglobine (produites par réaction avec les hydroperoxydes) avec les antioxydants a déjà permis de mettre en évidence des comportements distincts dans l'action antioxydante. Les composés phénoliques hydrophiles (quercétine, catéchine, anthocyanes) exercent leur activité antioxydante en phase aqueuse en réduisant les espèces hypervalentes de la metmyoglobine, inhibant ainsi la phase d'initiation. Les antioxydants lipophiles (α -tocophérol, β -carotène), en revanche, agissent en phase lipidique par réduction des radicaux peroxydes, inhibant ainsi la phase de propagation.

Les avantages d'un tel modèle sont nombreux. Outre son adaptation aux conditions gastriques (concentrations d'antioxydants raisonnables, peroxydation induite par une métalloprotéine d'origine alimentaire, acidité compatible avec celle du bol alimentaire), il permet de mesurer simultanément le pouvoir antioxydant de composés hydrophiles et lipophiles. Il permet aussi une étude quantitative des mécanismes d'oxydation et d'inhibition.

Toutefois, la concentration initiale des hydroperoxydes de l'acide linoléique (qui contaminent en concentrations variables les échantillons du commerce) détermine la vitesse initiale de peroxydation et des problèmes de reproductibilité sont observés avec différents lots d'acide linoléique. En outre, le tensioactif utilisé (Tween 20), s'il permet d'accéder à des solutions transparentes permettant les études spectroscopiques, n'a rien de naturel. Enfin, l'acide linoléique n'est pas adapté à la modélisation du bol alimentaire, les acides gras étant rarement ingérés sous forme libre, mais à plus de 90% sous forme de triglycérides. Ces observations indiquent que des améliorations sont indispensables pour arriver à un modèle plus biomimétique.

En conclusion, de nombreuses méthodes de mesure de pouvoir antioxydant existent. Elles diffèrent de par la composition du système, le substrat oxydable et l'amorceur d'oxydation. Par conséquent, les résultats obtenus par différentes méthodes ne sont pas systématiquement comparables. Parce qu'ils mettent en évidence des mécanismes réactionnels différents, ces tests sont jugés complémentaires et il apparaît judicieux d'en utiliser plusieurs pour une interprétation fine de l'activité antioxydante. Toutefois, le point le plus délicat reste l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* aux processus se déroulant dans l'organisme humain. C'est pour répondre à cette problématique que la priorité doit être de mettre au point des systèmes biochimiques modélisant au plus près les conditions prévalant *in vivo*.

V. Objectifs de l'étude

Dans nos régimes alimentaires occidentaux, l'apport lipidique est extrêmement important puisqu'il constitue plus du tiers de l'apport calorique total, réparti entre protéines (16%), glucides (46 %) et lipides (38%) [14]. La peroxydation lipidique, fréquente dans les aliments riches en corps gras, conduit à des altérations des qualités sensorielles et nutritionnelles mais aussi à la formation de composés d'oxydation potentiellement toxiques. Ainsi, lors de la digestion, le tractus gastro-intestinal est constamment exposé à des lipides oxydés issus des aliments et qui sont potentiellement absorbables depuis la muqueuse gastrique. De plus, les conditions gastriques (émulsion lipide/eau, présence de dioxygène) et l'exposition à divers agents prooxydants (Fe^{2+}/Fe^{3+} , protéines héminiques) font de l'estomac un véritable « bioréacteur » [22], favorisant l'apparition de nouveaux composés d'oxydation lipidiques. Une fois dans l'intestin, plusieurs études ont montré que ces composés pouvaient être en partie absorbés et se retrouver dans la circulation plasmatique, incorporés aux différentes lipoprotéines et principalement aux LDL. Or, la modification oxydante des LDL entraîne alors des dysfonctionnements endothéliaux et des phénomènes pro-inflammatoires amorçant l'athérosclérose ou d'autres complications.

D'un autre côté, les régimes alimentaires de type méditerranéen, caractérisés par une consommation importante en fruits et légumes, céréales et produits transformés d'origine végétale (vin, thé, huiles végétales), seraient inversement corrélés aux risques de maladies cardiovasculaires et éventuellement de cancers. Ces effets bénéfiques seraient attribués aux microconstituants (caroténoïdes, vitamines C et E, polyphénols) présents en fortes concentrations dans ce type de régime. Cependant, les polyphénols, principaux microconstituants alimentaires et objets de cette étude, sont faiblement absorbés et fortement métabolisés lors de leur passage dans l'intestin et dans le foie, sous forme de glucuronides et/ou sulfates, partiellement méthylés. En raison de ces modifications structurales qui généralement abaissent leur pouvoir réducteur, la possibilité d'une action antioxydante au delà du tractus digestif demeure confuse et équivoque. En revanche, les composés phénoliques et notamment les flavonoïdes, présents dans le plasma à des concentrations maximales de 1 μM , se trouvent dans l'estomac et dans le lumen intestinal à des concentrations bien plus importantes après la consommation d'aliments et boissons riches en ces composés. Dans le tractus digestif, ils pourraient donc exercer directement des effets protecteurs, ce qui permettrait d'expliquer au moins en partie les bienfaits des régimes alimentaires contenant de fortes concentrations d'antioxydants [153, 154].

Les études chez l'homme demeurant difficiles à mettre en oeuvre, l'objectif de ce travail est d'étudier *in vitro* les mécanismes d'oxydation pouvant se produire dans des conditions proches de celles de l'estomac et leur inhibition par des polyphénols d'origine alimentaire ainsi que par des préparations à base de fruits et légumes. Les chapitres de ce manuscrit détaillent les différentes étapes de cette approche.

Ainsi, le premier chapitre relate la mise au point de modèles chimiques du compartiment gastrique, constitués d'émulsions huile/eau, stabilisées, soit par la sérum albumine bovine (SAB), soit par des phospholipides issus du jaune d'œuf. Ces modèles biomimétiques doivent permettre de préciser la stabilité et le pouvoir antioxydant de polyphénols dans des conditions gastriques d'acidité variable (pH 3-6).

Le chapitre 2 abordera la peroxydation lipidique amorcée par la metmyoglobine, protéine héminique de la viande rouge, dans les modèles biomimétiques mis au point. D'autres systèmes d'initiation (ions du fer, hématine) seront aussi considérés dans ces modèles et comparés entre eux. La capacité à inhiber l'oxydation lipidique de polyphénols représentatifs des différentes familles de composés phénoliques communément consommés sera ensuite évaluée dans ces différents systèmes. En parallèle, la dégradation oxydante des polyphénols sera suivie et la structure des produits d'oxydation néoformés sera au moins partiellement élucidée.

Afin de comprendre les phénomènes se produisant à l'interface des émulsions, la partie suivante, plus fondamentale, s'attachera à étudier les protéines des modèles (sérum albumine et metmyoglobine), leurs interactions, leur réactivité en présence d'hydroperoxydes (H_2O_2 , hydroperoxydes lipidiques) et d'antioxydants. En particulier, la dégradation de la SAB dans les émulsions sera étudiée.

Le quatrième chapitre détaillera les applications sur aliments réels des modèles gastriques développés. La complexification des modèles avec des enzymes digestives sera également évoquée dans le cadre d'essais préliminaires incluant la lipase gastrique, responsable de la lipolyse des triglycérides en diglycérides.

Enfin, le dernier chapitre présentera une étude de relations structure-activité antioxydante pour une série de 4-méthylcoumarines et impliquant deux tests distincts (Crocine bleaching, oxydation des

LDL). Ce travail a été réalisé à l'INRAN (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione) de Rome sous la direction de Cristina Scaccini, lors d'un stage de deux mois.

A terme, l'objectif de ce travail de thèse est donc de mettre au point un test pertinent de mesure de pouvoir antioxydant des microconstituants de l'alimentation dans le compartiment gastrique, c'est-à-dire en le site même où ils ont le plus de chance d'exercer une activité antioxydante. Dans ce test, l'activité antioxydante dépend non seulement du caractère réducteur des microconstituants, mais aussi de leur environnement chimique (phase lipidique ou phase aqueuse) et des interactions qu'ils développent.

Références bibliographiques

1. Pryor WA, editor. **Free Radicals in Biology Volume V**. Londres: Academic Press, Inc.; 1982.
2. Spiteller G. **Peroxy radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products**. *Free Radical Biology and Medicine* 2006,41:362-387.
3. Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. **Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review)**. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002,13:700-710.
4. Uchida K. **Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases**. *Free Radical Biology and Medicine* 2000,28:1685-1696.
5. Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D, editors. **Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques**. Paris: Editions Tec & Doc / Editions Médicales Internationales; 2005.
6. Gilbert DL, Colton CA, editors. **Reactive Oxygen Species in Biological Systems : An Interdisciplinary Approach**. New-York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 1999.
7. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. **Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms**. *Food and Chemical Toxicology* 1999,37:949-962.
8. Jelen HH, Obuchowska M, Zawirska-Wojtasiak R, Wasowicz E. **Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000,48:2360-2367.
9. van Ruth SM, Roozen JP. **Aroma compounds of oxidised sunflower oil and its oil-in-water emulsion: volatility and release under mouth conditions**. *European Food Research and Technology* 2000,210:258-262.
10. Keszler A, Heberger K, Gude M. **Identification of volatile compounds in sunflower oil by headspace SPME and ion-trap GC/MS**. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* 1998,21:368-370.
11. Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. **4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis**. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005,49:1044-1049.
12. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. **Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005,338:668-676.
13. Ros E. **Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk**. *Atherosclerosis* 2000,151:357-379.
14. Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, et al. **Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach**. *American Journal of Physiology* 1994,266:G372-G381.
15. Fave G, Peyrot J, Hamosh M, Armand M. **Dietary fat digestion: interest of human gastric lipase**. *Cahiers de Nutrition et de Dietétique* 2007,42:183-190.
16. Armand M. **Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand?** *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2007,10:156-164.
17. Peters T. **All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications.**: Academic Press; 1995.
18. Sablonnière B. **Biochimie et biologie moléculaire. Pour les sciences de la vie et de la santé**: Omniscience; 2006.
19. Lusis AJ. **Atherosclerosis**. *Nature* 2000,407.
20. Proctor SD, Pabla CK, Mamo JCL. **Arterial intimal retention of pro-atherogenic lipoproteins in insulin deficient rabbits and rats**. *Atherosclerosis* 2000,149:315-322.
21. Kanner J. **Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health**. *Molecular Nutrition & Food Research* 2007,51:1094-1101.

22. Kanner J, Lapidot T. **The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants.** *Free Radical Biology and Medicine* 2001,31:1388-1395.
23. Lapidot T, Granit R, Kanner J. **Lipid hydroperoxidase activity of myoglobin and phenolic antioxidants in simulated gastric fluid.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:3391-3396.
24. Kanazawa K, Ashida H. **Catabolic fate of dietary trilinoleoylglycerol hydroperoxides in rat gastrointestinal tract.** *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism* 1998,1393:336-348.
25. Kanazawa K, Ashida H. **Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body.** *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism* 1998,1393:349-361.
26. Staprans I, Rapp JH, Pan X, Feingold KR. **Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats.** *Journal of Lipid Research* 1996,37:420-430.
27. Grootveld M, Atherton MD, Sheerin AN, Hawkes J, Blake DR, Richens TE, *et al.* **In vivo absorption, metabolism, and urinary excretion of a,b-unsaturated aldehydes in experimental animals - Relevance to the development of cardiovascular diseases by the dietary ingestion of thermally stressed polyunsaturate-rich culinary oils.** *Journal of Clinical Investigation* 1998,101:1210-1218.
28. Osada K, Sasaki E, Sugano M. **Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats.** *Lipids* 1994,29:555-559.
29. Vine DF, Croft KD, Beilin LJ, Mamo JCL. **Absorption of dietary cholesterol oxidation products and incorporation into rat lymph chylomicrons.** *Lipids* 1997,32:887-893.
30. Yelisyeyeva O, Cherkas A, Zarkovic K, Semen K, Kaminsky D, Waeg G, Zarkovic N. **The distribution of 4-hydroxynonenal-modified proteins in gastric mucosa of duodenal peptic ulcer patients.** *Free Radical Research* 2008,42:205-211.
31. Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR. **The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis.** *Molecular Nutrition & Food Research* 2005,49:1075-1082.
32. Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR. **Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum.** *Journal of Lipid Research* 2003,44:705-715.
33. Linseisen J, Wolfram G. **Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans.** *Annals of Nutrition and Metabolism* 1998,42:221-230.
34. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Ling KLE, Wolff SP. **Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma.** *Biochemical Journal (London)* 1996,313:781-786.
35. Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bon GB, Sevanian A. **Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis.** *Free Radic Biol Med* 1998,25.
36. Kubow S. **Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation-products in foods.** *Free Radical Biology and Medicine* 1992,12:63-81.
37. Kubow S. **Lipid oxidation-products in food and atherogenesis.** *Nutrition Reviews* 1993,51:33-40.
38. Sener DE, Gonenc A, Akinci M, Torun M. **Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer.** *Cell Biochemistry and Function* 2007,25:377-382.
39. Kehrer JP, Smith CV. **Free radical in biology : sources, reactivities, and role in the etiology of human diseases.** In: *Natural antioxidant in human health and disease.* Edited by Frei B. Londres: Academic Press; 1994:25-62.
40. Lau ATY, Wang Y, Chiu JF. **Reactive oxygen species: Current knowledge and applications in cancer research and therapeutic.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2008,104:657-667.

41. Sawa T, Akaike T, Kida K, Fukushima Y, Takagi K, Maeda H. **Lipid peroxy radicals from oxidized oils and heme-iron: Implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis.** *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1998,7:1007-1012.
42. Pierre F, Tache S, Petit CR, Meer Rvd, Corpet DE. **Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats.** *Carcinogenesis* 2003,24:1683-1690.
43. Pierre F, Peiro G, Tache S, Cross AJ, Bingham SA, Gasc N, *et al.* **New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2006,15:2274-2279.
44. Yang C. S. LJM, Huang M.-T. and Newmark H. L. **Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds.** *Annu. Rev. Nutr.* 2001,21:381-406.
45. Gutteridge JM, Halliwell B. **Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease.** New-York: Oxford University Press Inc.; 1994.
46. Galan P, Preziosi P, Triol I, Valeix P, Vasquez C, Alfarez M-J, Hercberg S. **Antioxydants et prévention.** *Cah. Nutr. Diet.* 1997,32:359-370.
47. Prior RL. **Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage.** *American Journal of Clinical Nutrition* 2003,78:570S-578S.
48. Frei B, editor. **Natural Antioxidants in Human Health and Disease.** Londres: Academic Press; 1994.
49. Reboul E, Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, *et al.* **Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte.** *Journal of Biological Chemistry* 2006,281:4739-4745.
50. Basu TK, Donaldson D. **Intestinal absorption in health and disease: micronutrients.** *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology* 2003,17:957-979.
51. Massey LK, Liebman M, Kynast-Gales SA. **Ascorbate increases human oxaluria and kidney stone risk.** *Journal of Nutrition* 2005,135:1673-1677.
52. Tyssandier V, Lyan B, Borel P. **Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2001,1533:285-292.
53. Borel P, Draï J, Faure H, Fayol V, Galabert C, Laromiguiere M, Le Moel G. **Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids.** *Annales De Biologie Clinique* 2005,63:165-177.
54. Yonekura L, Nagao A. **Intestinal absorption of dietary carotenoids.** *Molecular Nutrition & Food Research* 2007,51:107-115.
55. Moussa M, Landrier JF, Reboul E, Ghiringhelli O, Comera C, Collet X, *et al.* **Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1.** *Journal of Nutrition* 2008,138:1432-1436.
56. Stahl W, Sies H. **Lycopene: A biologically important carotenoid for humans?** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1996,336:1-9.
57. Krinsky NI. **Carotenoids as antioxidants.** *Nutrition* 2001,17:815-817.
58. Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C, editors. **Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.** Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes; 2005.
59. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *American Journal of Clinical Nutrition* 2004,79:727-747.
60. Podsedek A, Wilska-Jeszka J, Anders B, Markowski J. **Compositional characterisation of some apple varieties.** *European Food Research and Technology* 2000,210:268-272.
61. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. **Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands,.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992,40:2379-2383.

62. Manach C. **Biodisponibilité des flavonoïdes** [Thèse]. Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal; 1998.
63. Hakkinen SH, Karenlampi SO, I.M. H, H.M. M, A.R. T. **Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999,47:2274-2279.
64. Hertog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B. **Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1993,41:1242-1246.
65. Arts ICW, Van de Putte B, Hollman PCH. **Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000,48:1746-1751.
66. Arts ICW, Van de Putte B, Hollman PCH. **Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit juices and chocolate milk**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000,48:1752-1757.
67. Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B. **Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999,47:4009-40017.
68. Fossen T, Andersen OM, Ovstedal DO, Pedersen AT, Raknes A. **Characteristic anthocyanin pattern from onions and other Allium spp**. *Journal of Food Science* 1996,61.
69. van der Sluis AA, Dekker M, de Jager A, Jongen WMF. **Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001,49:3606-3613.
70. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. **Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997,45:590-595.
71. Kuhnau J. **The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition**. *World Rev Nutr Diet* 1976,24:117-191.
72. Clifford M, Brown JE. **Dietary flavonoids and health - broadening the perspective**. In: *Flavonoids : chemistry, biochemistry and applications*. Edited by Andersen O, Markham K. Boca Raton: CRC Press; 2006:319-360.
73. Brat P, George S, Bellamy A, Chaffaut Ld, Scalbert A, Mennen L, *et al*. **Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables**. *Journal of Nutrition* 2006,136:2368-2373.
74. Walgren RA, Walle UK, Walle T. **Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells**. *Biochemical Pharmacology* 1998,55:1721-1727.
75. Murota K, Terao J. **Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach**. *FEBS Letters* 2005,579:5343-5346.
76. Aura AM, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, Santos-Buelga C. **In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora**. *European Journal of Nutrition* 2005,44:133-142.
77. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. **Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway**. *Journal of Nutrition* 2000,130:2765-2771.
78. Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, *et al*. **Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase**. *FEBS Letters* 2000,468:166-170.
79. Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J. **Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:1706-1712.
80. Suomela JP, Ahotupa M, Yang B, Vasankari T, Kallio H. **Absorption of flavonols derived from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors**

- for cardiovascular disease in humans.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006,54:7364-7369.
81. Saura-Calixto F, Serrano J, Goni I. **Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet.** *Food Chemistry* 2007,1:372-378.
82. Nagah AM, Seal CJ. **In vitro procedure to predict apparent antioxidant release from wholegrain foods measured using three different analytical methods.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005,85:1177-1185.
83. Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C. **Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health.** *Biomedecine & Pharmacotherapy* 2002,56:276-282.
84. Donovan JL, Bell JR, Kasim-Karakas S, German JB, Walzem RL, Hansen RJ, Waterhouse AL. **Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine.** *Journal of Nutrition* 1999,129:1662-1668.
85. Murota K, Terao J. **Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003,417:12-17.
86. Day AJ, Bao Y, Morgan MRA, Williamson G. **Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity.** *Free Radical Biology and Medicine* 2000,29:1234-1243.
87. Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, *et al.* **Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries - Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids.** *Journal of Biological Chemistry* 2008,283:9424-9434.
88. McGhie TK, Walton MC. **The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding.** *Molecular Nutrition & Food Research* 2007,51:702-713.
89. Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Remesy C. **Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:3902-3908.
90. Ichiyanagi T, Shida Y, Rahman MM, Hatano Y, Matsumoto H, Hirayama M, Konishi T. **Metabolic pathway of cyanidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:145-150.
91. Cremin P, Kasim-Karakas S, Waterhouse AL. **LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001,49:1747-1750.
92. Rechner AR, Spencer JPE, Kuhnle G, Hahn U, Rice-Evans CA. **Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo.** *Free Radical Biology and Medicine* 2001,30:1213-1222.
93. Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. **Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans.** *Journal of Nutrition* 2007,137:2196-2201.
94. Lotito SB, Frei B. **Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?** *Free Radical Biology and Medicine* 2006,41:1727-1746.
95. Scalbert A, Williamson G. **Dietary intake and bioavailability of polyphenols.** *Journal of Nutrition* 2000,130:2073S-2085S.
96. Nardini M, Natella F, Scaccini C, Ghiselli A. **Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans.** *Journal of Nutritional Biochemistry* 2006,17:14-22.
97. Dufour C, Dangles O. **Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy.** *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 2005,1721:164-173.
98. Murota K, Hotta A, Ido H, Kawai Y, Moon J-H, Sekido K, *et al.* **Antioxidant capacity of albumin-bound quercetin metabolites after onion consumption in humans.** *J Med Invest* 2007,54:370-374.

99. Dangles D, Dufour C. **Flavonoid - protein interactions**. In: *Flavonoids : chemistry, biochemistry and applications*. Edited by Andersen O, Markham K. Boca Raton: CRC Press; 2006:443-469.
100. Dangles D, Dufour C. **Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health**. In: *Recent Advances in Polyphenol Research*. Edited by Lattanzio V, Daayf F. London: Blackwell; 2008:67-87.
101. Wang L, Tu Y, Lian T, Hung J, Yen J, Wu M. **Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006,54:9798-9804.
102. Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, Simic MG. **Reduction potentials of flavonoid and model phenoxy radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?** *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 1996:2497-2504.
103. Fukumoto LR, Mazza G. **Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds**. *J. Agric. Food Chem.* 2000,48:3597-3604.
104. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids**. *Free Radical Biology and Medicine* 1996,20:933-956.
105. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships**. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002,13:572-584.
106. Dangles O, Dufour C, Fargeix G. **Inhibition of lipid peroxidation by quercetin and quercetin derivatives: antioxidant and prooxidant effects**. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 2000,6:1215-1222.
107. Vulcain E, Goupy P, Caris-Veyrat C, Dangles O. **Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: action in the aqueous vs. lipid phase**. *Free Radical Research* 2005,39:547-563.
108. Engelmann MD, Hutcheson R, Cheng IF. **Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3',4'-dihydroxyflavone**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:2953-2960.
109. Ren J, Meng S, Lekka CE, Kaxiras E. **Complexation of flavonoids with iron: Structure and optical signatures**. *Journal of Physical Chemistry B* 2008,112:1845-1850.
110. Kumamoto M, Sonda T, Nagayama K, Tabata M. **Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins**. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2001,65:126-132.
111. McDonald M, Mila I, Scalbert A. **Precipitation of metal ions by plant polyphenols: optimal conditions and origin of precipitation**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996,44.
112. Fordtran JS, Walsh JH. **Gastric acid secretion rate and buffer content of the stomach after eating. Results in normal subjects and in patients with duodenal ulcer**. *Journal of Clinical Investigation* 1973,52.
113. Lule SU, Xia WS. **Food phenolics, pros and cons: A review**. *Food Reviews International* 2005,21:367-388.
114. Vincent-Baudry S, Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, et al. **The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet**. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005,82:964-971.
115. Riboli E, Norat T. **Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk**. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003,78:559S-569S.
116. Min K, Ebeler SE. **Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels**. *Food and Chemical Toxicology* 2008,46:96-104.
117. Sadik CD, Sies H, Schewe T. **Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action**. *Biochemical Pharmacology* 2003,65:773-781.

118. Amasheh M, Schlichter S, Amasheh S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. **Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells.** *Journal of Nutrition* 2008,138:1067-1073.
119. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, *et al.* **Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappa B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats.** *Biochemical Pharmacology* 2004,68:1939-1946.
120. Boots AW, Haenen G, Bast A. **Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical.** *European Journal of Pharmacology* 2008,585:325-337.
121. Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzuki Y, Kirima K, Kyaw M, Moon J-H, *et al.* **Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002,293:1458-1465.
122. Kris-Etherton P. M. HKD, Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. R., Hilpert K. F., Griel A. E., Etherton T. D. **Biactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer.** *American Journal Medicine* 2002,113:71S-88S.
123. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. **Dietary polyphenols and the prevention of diseases.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005,45:287-306.
124. Hollman PC, Katan MB. **Dietary flavonoids : intake, health effects and bioavailability.** *Food and Chemical Toxicology* 1999,37:937-942.
125. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, *et al.* **Flavonoid intake and risk of chronic diseases.** *American Journal of Clinical Nutrition* 2002,76:560-568.
126. O'Reilly JD, Sanders TAB, Wiseman H. **Flavonoids protect against oxidative damage to LDL in vitro: Use in selection of a flavonoid rich diet and relevance to LDL oxidation resistance ex vivo?** *Free Radical Research* 2000,33:419-426.
127. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. **Inhibition of oxidation of human LDL by phenolic substances in red wine.** *The Lancet* 1993,341:454-457.
128. Natella F, Belevi F, Gentili V, Ursini F, Scaccini C. **Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:7720-7725.
129. Natella F, Ghiselli A, Guidi A, Ursini F, Scaccini C. **Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation.** *Free Radical Biology and Medicine* 2001,30:1036-1044.
130. Natella F, Nardini M, Virgili F, Scaccini C. **Role of dietary polyphenols in the platelet aggregation network - A review of the in vitro studies.** *Current Topics in Nutraceutical Research* 2006,4:1-21.
131. Yi WG, Fischer J, Akoh CC. **Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:8804-8812.
132. Seeram NP, Adams LS, Zhang YJ, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D. **Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006,54:9329-9339.
133. Gee JM, Johnson IT. **Polyphenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health.** *Current Medicinal Chemistry* 2001,8:1245-1255.
134. Cui Y, Morgenstern H, Greenland S, Tashkin DP, Mao JT, Cai L, *et al.* **Dietary flavonoid intake and lung cancer - A population-based case-control study.** *Cancer* 2008,112:2241-2248.
135. Syed DN, Suh Y, Afaq F, Mukhtar H. **Dietary agents for chemoprevention of prostate cancer.** *Cancer Letters* 2008,265:167-176.

136. Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. **Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical.** *Talanta* 2007,71:230-235.
137. Ordoudi SA, Tsimidou MZ, Vafiadis AP, Bakalbassis EG. **Structure-DPPH scavenging activity relationships: parallel study of catechol and guaiacol acid derivatives.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006,54:5763-5768.
138. Goupy P, Dufour C, Loonis M, Dangles O. **Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003,51:615-622.
139. Sanchez-Moreno C. **Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.** *Food Science and Technology International* 2002,8:121-137.
140. Roginsky V, Lissi EA. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** *Food Chemistry* 2005,92:235-254.
141. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. **Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.** *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 2001,49:4619-4626.
142. Huang DJ, Ou BX, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. **Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:1815-1821.
143. MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML. **Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006,86:2046-2056.
144. Bors W, Michel C, Saran M. **Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin. A rapid test for quantifying antioxidant activity.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1984,796:312-319.
145. Bohm V, Schlesier K. **Methods to evaluate the antioxidant activity.** *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops, Vol 3* 2004,3:55-71.
146. Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. **Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999,47:1453-1459.
147. Yeomans VC, Linseisen J, Wolfram G. **Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of human low density lipoproteins.** *Eur J Nutr* 2005,44:422-428.
148. Bergmann AR, Ramos P, Esterbauer H, Winklhofer-Roob BM. **RRR-alpha-tocopherol can be substituted for by Trolox in determination of kinetic parameters of LDL oxidizability by copper.** *Journal of Lipid Research* 1997,38:2580-2588.
149. Janisch KM, Williamson G, Needs P, Plumb GW. **Properties of quercetin conjugates: Modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin.** *Free Radical Research* 2004,38:877-884.
150. Pryor WA, Cornicelli JA, Devall LJ, Tait B, Trivedi BK, Witiak DT, Wu MD. **A Rapid Screening-Test to Determine the Antioxidant Potencies of Natural and Synthetic Antioxidants.** *Journal of Organic Chemistry* 1993,58:3521-3532.
151. Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. **Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry.** *Organic & Biomolecular Chemistry* 2005,3:423-430.
152. Goupy P, Vulcain E, Caris-Veyrat C, Dangles O. **Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism.** *Free Radical Biology and Medicine* 2007,43:933-946.

153. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. **Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?** *American Journal of Clinical Nutrition* 2005,81:268S-276S.
154. Halliwell B, Zhao KC, Whiteman M. **The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action?** *Free Radical Research* 2000,33:819-830.

CHAPITRE 1.

MODELISATION CHIMIQUE DU BOL ALIMENTAIRE

« Une confrontation permanente entre théorie et expérience est une condition nécessaire à l'expression de la créativité. »

Pierre Joliot, La Recherche Passionnément

<i>I. Etat des connaissances</i>	93
I.1 Caractéristiques physico-chimiques du bol alimentaire dans le compartiment gastrique	93
I.1.1 Emulsification	93
I.1.2 Volume	94
I.1.3 pH du bol alimentaire au sein de l'estomac	95
I.1.4 Teneur en oxygène dans l'estomac	96
I.2 Systèmes de digestion <i>in vitro</i>	96
I.3 Conclusions	97
<i>II. Matériels et Méthodes</i>	98
II.1 Matériels	98
II.1.1 Produits chimiques	98
II.1.2 Equipements	101
II.2 Méthodes	102
II.2.1 Purification de l'huile de tournesol commerciale	102
II.2.2 Préparation des émulsions	103
II.2.3 Caractérisation des émulsions : distribution de taille des gouttelettes d'huile	105
<i>III. Résultats et discussion</i>	107
III. 1 Caractéristiques des deux modèles	107
III.1.1 Détermination de la taille des gouttelettes lipidiques	107
III.1.2 Caractéristiques de l'interface	111
III.2 Stabilité au cours de l'oxydation	112
III.2.1 Stabilité du modèle-SAB	112
III.2. Stabilité du modèle-PL	113
III.3 Conclusions	114
<i>Références bibliographiques</i>	115
<i>ANNEXES</i>	117

I. Etat des connaissances

I.1 Caractéristiques physico-chimiques du bol alimentaire dans le compartiment gastrique

Le bol alimentaire est une masse alimentaire mastiquée, imprégnée de salive, prête à être digérée. Depuis l'isthme du gosier jusqu'à l'entrée dans l'estomac, les aliments prennent de cinq à dix secondes pour descendre le long de l'œsophage. Ils séjournent entre 2 et 6 heures dans l'estomac pour être partiellement digérés. L'estomac est un milieu complexe dont les caractéristiques, pH, volume et composition varient en fonction de son état (à jeun ou postprandial) et du repas ingéré.

I.1.1 Emulsification

Dans notre régime alimentaire occidental, la part des lipides ingérés représente plus de 30 % de l'apport calorique total. Un adulte consomme en moyenne 100-150 g de triglycérides, 2-10 g de phospholipides et 500 mg de cholestérol par jour [1, 2].

Depuis longtemps, les études portant sur la digestion des lipides suggèrent que l'estomac pourrait jouer un rôle dans l'émulsification des lipides [2]. Cette hypothèse a pu être vérifiée plus récemment par Armand *et al.* [1]. Les forces mécaniques de contraction antrales (péristaltiques), mais aussi la présence de molécules amphiphiles comme les phospholipides, de protéines et d'acides gras libres ou de monoglycérides en quantité plus limitée, permettent l'émulsification des lipides au cours de l'étape gastrique (Figure-I-1). De plus, l'émulsification est favorisée par la lipolyse gastrique qui génère des produits amphiphiles (acides gras, etc...) diminuant ainsi les diamètres des gouttelettes lipidiques au sein de l'estomac.

Après l'administration d'un repas test contenant de l'huile d'olive, des œufs et du saccharose, l'analyse du contenu gastrique une heure après l'ingestion a montré que la majorité des gouttelettes lipidiques (50 %) avaient un diamètre compris entre 1 et 10 μm [1]. Les autres catégories de particules sont plus minoritaires : 5% ont un diamètre supérieur à 100 μm , 25 % ont un diamètre compris entre 10 et 100 μm et 12 % ont un diamètre inférieur à 1 μm .

Les résultats d'une autre étude considérant des repas tests à base de légumes vont dans ce sens [3]. L'analyse du contenu gastrique de 10 volontaires a révélé que les distributions de taille des gouttelettes lipidiques étaient monodales conduisant à un diamètre moyen de 15, 6 et 8 μm pour les repas à base de carottes, de tomates et d'épinards respectivement.

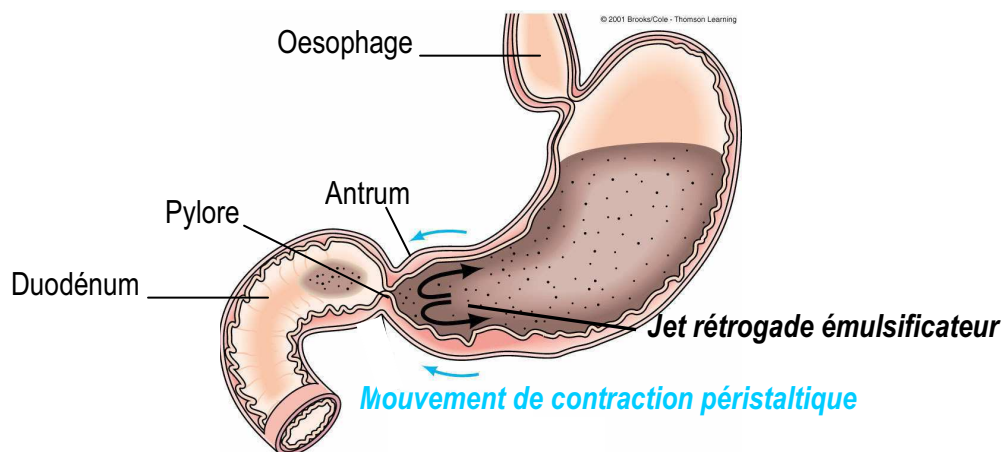


Figure-I-1. Anatomie et motricité de l'estomac

I.1.2 Volume

L'estomac est un réservoir extensible d'une capacité de 1 à 1,5 L et mesurant chez l'adulte 25 cm de haut sur 12 cm de large et 8 cm d'épaisseur environ.

Des mesures du volume de l'estomac ont été entreprises par une technique d'imagerie en 3-D, la « tomographie d'émission par simple photon » (SPECT). Chez l'adulte, le volume de l'estomac est d'environ 200 mL à jeun. Le volume moyen passe à 787 mL 15 minutes après l'ingestion d'un repas de 368 mL. La différence entre le volume de l'estomac après ingestion du repas et le volume à jeun (419 mL) est supérieure au volume du repas. Elle est attribuée à l'air avalé ainsi qu'aux diverses sécrétions gastriques (HCl, pepsine, lipase, mucus, autres enzymes). Quatre heures après l'ingestion du repas, le volume mesuré de l'estomac est quasiment retourné à son niveau basal (320 mL), ce qui indique que la vidange gastrique est totale [4].

La vidange gastrique a aussi été estimée à partir de la digestion de pain chez le porc. Dans ce cas précis, après 4 heures de digestion gastrique, le pain avait complètement quitté l'estomac du cochon. La vidange était extrêmement rapide puisque durant la première heure, environ 56% ($\pm 5\%$) du contenu total avait quitté l'estomac du porc [5].

I.1.3 pH du bol alimentaire au sein de l'estomac

Les repas sont connus pour tamponner l'acidité intra-gastrique. Ainsi, après l'ingestion d'un repas, le pH intra-gastrique augmente durant les trente premières minutes, jusqu' à 5 ou 6 avant de diminuer rapidement [6].

Par exemple, après un repas composé d'huile de tournesol et de purées de légumes, le pH stomacal a rapidement augmenté en moins de 30 minutes. Ainsi il est passé de 1,8 à 5,4 ; 5,8 ; 6,2 dans le cas de purées de tomates, d'épinard ou de carottes respectivement, avant de redescendre à son pH basal inférieur à 2 dans l'état postprandial [3].

L'influence d'autres types d'aliments sur le pH intra-gastrique a aussi été évaluée. Par exemple, celui-ci a été suivi pendant 4 heures après l'ingestion de 130 g de pain et 430 mL d'eau par 8 personnes intubées d'une électrode de pH dans l'estomac. Comme dans l'étude précédente, le pH maximal moyen a été enregistré 30 minutes après l'ingestion du repas et atteint une valeur moyenne de 5,1 (± 2). Ce pH maximal correspond au remplissage complet de l'estomac. Une heure après l'ingestion du repas, le pH décroît à 2 pour atteindre son niveau basal de 1,7 ($\pm 0,2$), environ 80 minutes après l'ingestion du repas [5].

L'administration intra-gastrique de solutions protéiques de pH initial 7 a conduit à une diminution du pH gastrique plus progressive. Pendant les 30 premières minutes, celui-ci a diminué jusqu'à 6 avant d'atteindre une valeur d'environ 4, une heure après le début de la digestion [7].

Enfin, Armand *et al.* ont également étudié en détail le contenu gastrique de cinq volontaires après ingestion d'un repas test à base d'huile d'olive, d'œufs et de saccharose (volume = 400 mL, pH = 7,5). Les variations de pH ont été mesurées toutes les heures. A jeun, le pH stomacal est très faible (pH 1,5). Sa valeur maximale est obtenue après une heure de digestion (pH 4) avant de diminuer progressivement durant la vidange (environ 4 heures) [1]. Compte tenu du pH initial du repas et des résultats des études précédentes, la valeur de pH maximale enregistrée au cours de ces travaux peut paraître faible. Son protocole (analyse toutes les heures) ne permet pas de connaître la valeur du pH gastrique 30 minutes après l'ingestion du repas qui pourrait être supérieure.

Le pH gastrique dépend donc de la composition du repas ingéré, ce qui explique les variations observées entre les différentes études portant sur les légumes, le pain, les protéines ou encore les

lipides. Les résultats au sein d'une même étude sont souvent eux-même sujets à une grande fluctuation, soulignant ainsi la variabilité inter-individuelle.

I.1.4 Teneur en oxygène dans l'estomac

Peu d'études se sont intéressées à la mesure de la teneur en dioxygène de l'estomac. Toutefois, celui-ci est ouvert à l'air durant le temps du repas et il reçoit des aliments mastiqués. Une expérience réalisée à partir de 20 g de pain mastiqués, puis placés dans une eau désoxygénée, a entraîné une concentration en dioxygène dissous de 250 μM , c'est-à-dire à une saturation de la solution [8]. Ainsi, la mastication des aliments participe à l'apport en dioxygène et l'estomac peut être perçu comme un environnement aérobie.

I.2 Systèmes de digestion *in vitro*

Pour limiter les études sur l'homme, souvent onéreuses et difficiles à mettre en place, des systèmes de digestion *in vitro*, qui modélisent les diverses étapes de la digestion, ont été mis au point.

De nombreux chercheurs ont ainsi utilisé un dispositif mis en place par Gil-Izquierdo *et al.* [9-12], lui même adapté de Miller *et al.* [13]. Ce dispositif est constitué de deux étapes. Brièvement, une digestion initiale est réalisée à l'aide d'un mélange de pepsine et d'HCl, pendant deux heures, à 37°C, pour simuler les conditions gastriques. Elle est suivie d'une digestion en présence de sels biliaires et de pancréatine pendant 2 heures à 37°C, pour simuler les conditions régnant dans le petit intestin. Ce genre d'expérimentations est très utilisé pour estimer la « bioaccessibilité » des composé phénoliques ou d'antioxydants, c'est-à-dire leur relargage hors de la matrice alimentaire (jus de fruits, fruits) et leur disponibilité pour l'absorption à travers l'intestin. Il est aussi utilisé pour étudier la stabilité ou la transformation de microconstituants au cours de la digestion.

Si ces modèles chimiques représentent fidèlement la digestion d'un point de vue physiologique (enzymes, pH, durées), ils ne prennent pas en considération certains éléments importants de la phase gastrique. Ainsi, les différents macroconstituants apportés par un repas, les modifications physiques du bol alimentaire (structuration en émulsion) et les variations du pH entre début et fin de digestion n'y sont pas reproduits. Conçus pour prédire la bioaccessibilité de nutriments, ces dispositifs ne modélisent pas le potentiel antioxydant du tractus digestif lui même.

I.3 Conclusions : choix des modèles chimiques du contenu gastrique

Les aliments se retrouvent dans l'estomac principalement sous la forme d'une émulsion de lipides dispersés dans une phase aqueuse et contenant des enzymes, des ions métalliques, du dioxygène, des protéines et des polysaccharides. Le pH décroît au cours de la phase gastrique, variant d'environ 6 immédiatement après l'ingestion d'un repas à 1,5 quatre heures plus tard. Le dioxygène y est présent en quantité non limitante.

Pour étudier les processus d'oxydation lipidique pouvant se produire lors de la digestion et en particulier lors de la phase gastrique, nous nous proposons de mettre au point de nouveaux modèles chimiques du contenu gastrique. Ces modèles seront basés sur des émulsions d'huile de tournesol/eau à deux pH, 5,8 et 4, simulant deux phases de digestion (début et milieu de digestion). Elles seront stabilisées, soit par des protéines, soit par des phospholipides d'origine alimentaire.

Ce premier chapitre relate la mise au point des émulsions, leur caractérisation et l'étude de leur stabilité physique au cours de l'oxydation lipidique.

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Produits chimiques

Des émulsions huile dans eau (h/e) ont été choisies pour modéliser chimiquement le bol alimentaire dans le tractus digestif. L'étude sera conduite sur deux modèles, l'un stabilisé par des protéines, l'autre par des phospholipides. Deux pH seront étudiés, l'un à 5,8 et l'autre à pH 4, simulant l'oxydation à différents stades de la digestion gastrique (pH 5,8 : début de digestion gastrique et pH 4 : milieu de digestion gastrique).

a) Phase lipidique

Afin de modéliser au mieux le bol alimentaire, l'huile de tournesol, première huile consommée en France a naturellement été choisie comme la phase lipidique des émulsions. Elle est utilisée à une concentration de 10 % (p/p) soit une concentration représentative de celle atteinte lors d'un repas (150 g de triglycérides sont consommés par jour, soit 50 g dans un repas de volume 500 mL → 10%).

Sa composition en acides gras, majoritairement polyinsaturés, doit permettre une oxydation facilement détectable (Tableau-I-1).

Tableau-I-1. Composition moyenne de l'huile de tournesol.

<u>Nature</u>	<u>% Acides gras totaux</u>
C16 : 0	5-7
C16 : 1	≤0,4
C17 : 0	≤0,1
C18 : 0	4-6
C18 : 1	15-25
C18 : 2	62-70
C18 : 3	≤0,2
C20 : 0	<1
C20 : 1	<0,5
C22 : 0	<1

Plusieurs bouteilles d'huile de tournesol commerciale, de qualité alimentaire (Carrefour, France), provenant du même lot, ont été achetées au début de ces travaux, aliquotées en fractions

d'environ 100 g et conservées sous N₂ à -20°C pendant les trois ans. Selon les indications fournies par le distributeur, 100 g d'huile de tournesol contiennent 12 g d'acides gras saturés, 26 g d'acides gras monoinsaturés et 62 g d'acides gras polyinsaturés. Cette huile a une teneur garantie en vitamine E de 50 mg pour 100 g d'huile. La même huile (même type et même distributeur) a été utilisée dans des travaux similaires [14]. Sa composition a été analysée à partir de différents lots. Peu de variabilité dans la composition a été observée à partir de ces différents lots. Cette huile est composée très majoritairement de triglycérides (99,6 g pour 100 g d'huile), les 0,4 g restant étant attribués aux diglycérides, monoglycérides et acides gras libres. La concentration en vitamine E est de 68 mg d' α -tocophérol pour 100 g d'huile. Les résultats de cette étude sont donc en accord avec les données des fournisseurs et les tables de composition moyenne de l'huile de tournesol.

Avant utilisation cette huile est purifiée par chromatographie d'adsorption sur alumine neutre (Aluminiumoxide, Akt-I, neutre, Merck, Darmstadt, Allemagne) pour la débarrasser principalement de ses antioxydants naturels, les tocophérols (vitamine E). L'élution est réalisée avec du pentane de qualité analytique (*n*-pentane, Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France). L'acétonitrile et l'isopropanol (2-propanol) utilisés lors de l'analyse CLHP de l'huile après sa purification sont de qualité analytique et proviennent aussi de Fischer Scientific Bioblock.

b) Phase aqueuse

La phase aqueuse est constituée de tampons aqueux. Les tampons phosphate de sodium (NaH₂PO₄·2H₂O, 98%, Merck, Darmstadt, Allemagne) 5 mM (pH 5,8) ou acétate de sodium (CH₃CO₂Na·3H₂O, 99%, Merck, Darmstadt, Allemagne) 5 mM (pH 4) ont été préparés avec de l'eau déminéralisée, obtenue à l'aide d'un système Millipore® QPak 2 (Millipore Corporation, Bedford, USA). Ils sont mis en contact pendant 12 heures avec une résine Chelex-100® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) pour éliminer les traces métalliques, puis ajustés au pH correspondant à l'aide d'un pH-mètre électronique MetrOhm 744, préalablement étalonné avec des solutions tampons du commerce (pH 4 et pH 7).

c) Emulsifiants

Deux modèles d'émulsion sont réalisés au cours de cette étude; ils se différencient par le type d'émulsifiants assurant la stabilité des émulsions réalisées.

➤ **La sérum albumine bovine**

Le premier émulsifiant choisi est la sérum albumine albumine (SAB). L'albumine est extrêmement soluble dans l'eau en particulier à des pH proches de la neutralité. D'un point de vue alimentaire, elle est principalement apportée par le lait de vache à des teneurs de 0,4 g/L [15].

D'une structure parfaitement définie, disponible commercialement et permettant la préparation d'émulsions stables, la SAB a été choisie dans cette étude en tant que protéine modèle. La SAB, type A-9647, Fraction V selon Cohn, provient de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Elle est garantie d'une pureté minimale de 96 % (PM = 66500 Da).

➤ **Les phospholipides du jaune d'oeuf (PL)**

Le second émulsifiant est la lécithine du jaune d'oeuf. Les phospholipides sont en effet connus en agro-alimentaire pour assurer la stabilité de systèmes émulsionnés. Le produit fourni par Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; Steinheim, Allemagne) est à base de L- α -phosphatidylcholine (L- α -PC, p5394) type-XE, de pureté 51%. Nous avons donc cherché à identifier les autres composés présents dans le produit. Pour cela, l'analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase normale, couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DDL Sédex 55), a été réalisée dans l'unité BIA de l'INRA de Nantes (Annexe 1). La Figure-I-2 représente le chromatogramme obtenu après injection d'un échantillon de L- α -PC.

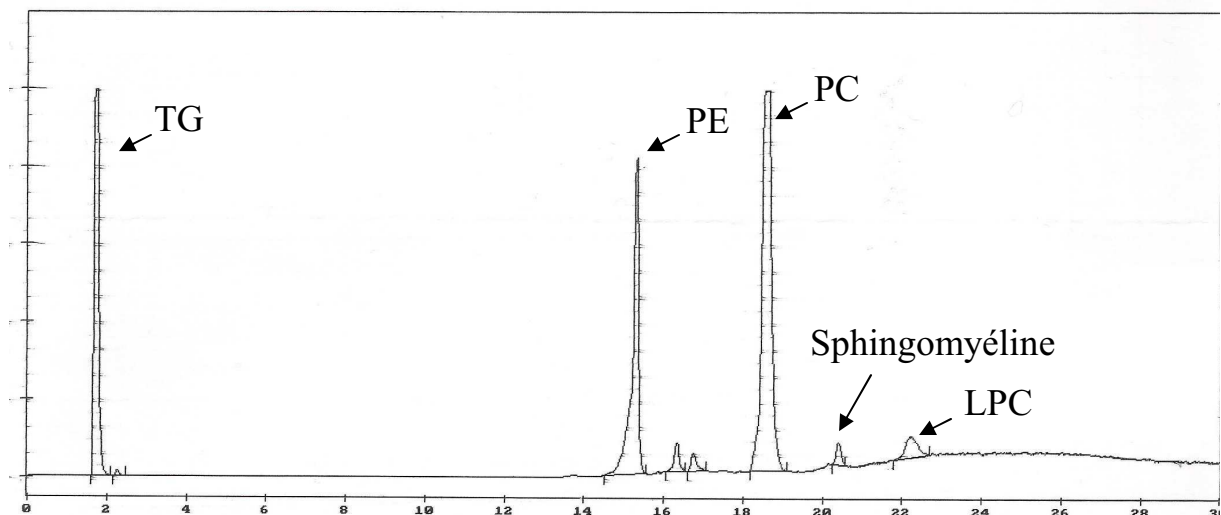


Figure-I-2. Chromatogramme CLHP de la L- α -PC (Sigma, 51%).

Il révèle trois pics majoritaires, correspondant respectivement à des triglycérides, de la L- α -phosphatidyléthanolamine (L- α -PE) et de la L- α -phosphatidylcholine (L- α -PC). D'autres pics plus petits sont également visibles; ils s'agiraient de la sphingomyéline et de la lysophosphatidylcholine (LPC), issue de l'hydrolyse de la PC (perte d'une chaîne grasse). Après étalonnage avec les différents

phospholipides purs, il apparaît que la L- α -PC et la L- α -PE représentent respectivement 61% et 23% des PL totaux. Un fractionnement sur cartouche de silice Sep Pack avec élution au chloroforme a permis de séparer la fraction neutre (triglycérides, diglycérides, acides gras libres et stérols) de la fraction polaire (phospholipides). Les lipides neutres représentent 23,9% et les lipides polaires (PL) 76,1% des lipides totaux.

La L- α -PC (51%), utilisée dans cette étude est donc constituée d'un mélange de phospholipides (L- α -PE, L- α -PC et LPC) et de lipides neutres (TG). La L- α -PC et la L- α -PE représentent à elles deux : $(61\% + 23\%) \times 76,1\%$ soit 64% des lipides totaux.

NB : A mi-parcours de ces travaux, la production de la L- α -PC, type X-E a été interrompue par Sigma. Nous avons alors remplacé ce produit par le produit équivalent de Fluka (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) de référence 61771 et de pureté 51% en supposant une composition similaire.

d) Autres

La stabilité des émulsions a été testée lors de leur oxydation. Pour initier l'oxydation, une solution de metmyoglobine de cœur de cheval (M1882-type II, pureté 90 %, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) de PM = 17600 Da est utilisée. Le (\pm)- α -tocophérol (pureté 95%), utilisé comme étalon dans l'analyse CLHP de l'huile purifiée, est fourni par Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA)

II.1.2 Equipements

a) Purification de l'huile de tournesol

L'huile purifiée est analysée par CLHP-UV à l'aide d'un chromatographe, modèle HP 1100 de Hewlett-Packard, couplé à un détecteur spectrophotométrique à barrettes de diodes (190-950 nm). La colonne utilisée est une colonne Alltima silice, greffée C18 (5 μ m, 150 mm x 4,6 mm), placée dans un compartiment thermostaté à 30°C et munie d'une colonne de garde (7,5 mm x 4,6 mm). La phase mobile est constituée d'un gradient linéaire d'acétonitrile (CH₃CN) et d'isopropanol (iPrOH) avec un débit de 1mL/min. Les gradients sont les suivants :

t (min)	CH ₃ CN (%)	iPrOH (%)
0	100	0
20	20	80
25	20	80

Après l'injection de 10 μL , l'absence d' α -tocopherol et la présence de triglycérides ont été vérifiées par détection à 280 nm et 210 nm respectivement.

b) Techniques d'émulsification

Pour réaliser une émulsion, un apport énergétique conséquent est nécessaire. Dans cette étude, celui-ci est apporté par un homogénéiseur de type Ultra-Turrax T25 (IKA) équipé d'une tige de 10 mm de diamètre. Une sonde à ultrasons de diamètre 6 mm (20 kHz, 130 W) est utilisée dans une seconde étape (Bioblock Vibracel ,75022).

c) Mesure de la taille des particules des émulsions

La taille des gouttelettes d'huile est analysée par microscopie optique à immersion, au grossissement x 1000 (Olympus, BX50) et par granulométrie laser à l'aide de l'appareil Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Orsay, France).

II.2 Méthodes

II.2.1 Purification de l'huile de tournesol commerciale

Avant utilisation, l'huile de tournesol commerciale est purifiée afin d'éliminer ses antioxydants naturels (tocophérols). La purification s'effectue par chromatographie d'adsorption sur alumine neutre par une méthode adaptée du protocole de Hamilton *et al.* [16]. L'huile commerciale (75 g) est dissoute dans 50 mL de pentane et transférée dans une colonne en verre contenant 150 g d'alumine neutre imprégnée de pentane. L'élution s'effectue avec environ 400 mL de pentane. Les échantillons sont collectés dans des tubes à essai recouverts de papier aluminium et immédiatement bouchés une fois pleins.

Les fractions diluées dans de l'isopropanol sont analysées par CLHP à l'aide un gradient d'acétonitrile et d'isopropanol (II.1.2 Equipements. a) Purification de l'huile de tournesol). L'absence d' α -tocopherol est confirmée par comparaison à un standard injecté dans les mêmes conditions. Les fractions contenant des triglycérides sont réunies dans un ballon préalablement taré. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation rotative sous vide à température ambiante pendant quelques heures, jusqu'à ce que le poids du ballon soit stable. L'huile obtenue est conservée en petites aliquotes (10-12g) sous N_2 et à -20°C .

II.2.2 Préparation des émulsions

Deux types d'émulsions de 10 mL de volume, constitués de 10% (p/p) d'huile de tournesol purifiée, sont préparés dans un tampon aqueux. L'une des émulsions est stabilisée par de la sérum albumine bovine (SAB), l'autre par des phospholipides (PL). Deux pH ont été sélectionnés pour l'étude. Ainsi, la phase aqueuse est constituée soit d'un tampon phosphate de pH 5,8, soit d'un tampon acétate de pH 4,0.

a) Elaboration du modèle-SAB

Préparation de la solution de SAB :

La SAB (347 mg) est dissoute dans 20 mL de tampon (pH 5,8 ou pH 4) : [SAB] = 250,5 μ M.

Préparation de la solution de metmyoglobine, MbFe^{III} :

MbFe^{III} (20-23 mg) est dissoute dans 5 mL de tampon (pH 5,8 ou pH 4) : [MbFe^{III}] = 205-235 μ M. Sa concentration est déterminée par spectrophotométrie UV-visible après une dilution au 1/10, à l'aide du coefficient d'absorption molaire $\epsilon = 7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 525 nm [17]. Le volume précis à injecter est variable (0,85-1 mL) selon la concentration de la solution-mère. S'il est inférieur à 1 mL, un volume de tampon sera ajouté pour compléter à 1 mL.

Préparation de l'émulsion :

L'huile de tournesol purifiée (1 g) est pesée dans un ballon de 50 mL. La solution de SAB (7,9 mL) est alors ajoutée dans le ballon. L'émulsification est réalisée en deux étapes. Les deux phases sont pré-émulsionnées à grande vitesse (24000 tr/min) pendant 2 minutes par l'homogénéisateur Ultra-Turrax T25 à 24000 tr/min. Cette pré-émulsion est alors balayée en surface par un courant de diazote pendant 5 minutes avant d'être irradiée par une sonde à ultrasons pendant 2 cycles de 30 s, séparés d'une durée de 30 secondes pour éviter l'échauffement de l'échantillon.

Initiation et inhibition de l'oxydation :

Dans le cas d'une oxydation lipidique inhibée, 0,1 mL d'une solution concentrée d'antioxydants est ajouté à l'émulsion (Chapitre 2). Quand l'oxydation est non inhibée, ce volume est remplacé par 0,1 mL de tampon. La solution de MbFe^{III} (1 mL) est ajouté dans le ballon ([MbFe^{III}] = 20 μ M).

Conservation de l'émulsion :

Le ballon est couvert par un parafilm percé, placé sous agitation magnétique (barreau aimanté) dans une étuve thermostatée à 37°C.

b) Elaboration du modèle-PL

Dissolution des PL :

Les PL du jaune d'œuf (208 mg) sont pesés dans un ballon de 50 mL. Ils sont dispersés dans 7,9 mL de tampon par agitation rapide à 24000 tours/min, pendant une minute et demie, à deux reprises. La concentration finale de phospholipides (64% de pureté) nécessaire à une stabilité convenable des émulsions est de 13,3 g/L (soit une concentration de 17,4 mM environ; PM moyen = 763,6 g/mol).

Préparation de la solution de metmyoglobine, MbFe^{III} :

Voir « Elaboration du modèle-SAB »

Préparation de l'émulsion :

L'huile de tournesol purifiée (1 g) est ajoutée dans le ballon contenant les PL dispersés. L'émulsification est réalisée en deux étapes. Les deux phases sont pré-émulsionnées de la même façon que pour le modèle SAB (2 min à 24000 tr/min). Après le passage sous diazote, la pré-émulsion placée dans la glace est traitée par ultrasons durant 6 cycles de 30 s intercalés par des pauses de 30 s. La durée du traitement est allongée par rapport au modèle SAB car la stabilité de l'émulsion à base de PL est plus difficile à obtenir.

Initiation et inhibition de l'oxydation et conservation de l'émulsion :

Voir « Elaboration du modèle-SAB »

c) Récapitulatif

Le Tableau-I- 2 récapitule les caractéristiques et compositions des deux modèles.

Tableau-I- 2 Récapitulatif des conditions utilisées pour réaliser les deux modèles d'émulsion.

	Modèle-SAB	Modèle-PL
Concentration émulsifiant	198 µM	17,4 mM
Pré-émulsification (homogénéisation)	2 min à 24000 tr/min	
Diazote	5 min	5 min
Emulsification (ultrasons)	2 x 30 s	6 x 30 s (dans la glace)
Concentration de MbFe ^{III}	20 µM	20 µM

II.2.3 Caractérisation des émulsions : distribution de taille des gouttelettes d'huile

Les émulsions ont été caractérisées par observation directe en microscopie optique et par granulométrie laser.

a) Microscopie optique

L'observation des émulsions au microscope optique à immersion s'est effectuée sur un microscope Olympus BX50, au grossissement X1000, équipé d'une réglette graduée dans l'un des deux oculaires et d'un appareil photo numérique. Une goutte d'émulsion est déposée sur une lame et recouverte par une lamelle. La lame est observée après le dépôt d'une goutte d'huile sur la lamelle. Cette technique permet d'avoir un aperçu visuel de l'émulsion, de la structure des gouttelettes d'huile et une estimation de leur taille. En revanche, elle ne fournit pas de données quantitatives précises telles que le diamètre moyen des gouttelettes ou leur répartition en catégories de taille. La granulométrie laser comble cette lacune.

b) La granulométrie laser

➤ Objectifs et principes

Cette technique permet de mesurer la taille de particules et plus précisément leur diamètre. Elle est basée sur la diffraction de la lumière frappant une particule (Figure-I-3). La méthode d'analyse par diffraction laser repose sur deux théories, celle de Fraunhofer et celle de Mie. La théorie de Fraunhofer nécessite plusieurs hypothèses : les particules analysées sont considérées opaques et sphériques et leur diamètre est supérieur à la longueur d'onde utilisée. Selon Fraunhofer, l'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules. Plus la particule est petite, plus l'angle de diffraction est grand. La théorie de Mie complète et remplace la théorie de Fraunhofer pour des particules de diamètre inférieur à 100 μm . Pour de telles particules, la lumière n'est plus seulement diffractée par la particule mais aussi réfléchi et diffusée. Ainsi, pour utiliser le modèle de Mie, il faut connaître les indices de réfraction des particules analysées et du milieu dispersant.

Un traitement mathématique complexe donne un diamètre moyen et la distribution en taille des particules selon une distribution en nombre, en surface ou en volume.

Le $d_{[4,3]}$, ou diamètre de volume, également diamètre de Herdan ou de Drouckere, est le diamètre moyen d'une sphère qui aurait le même volume que les particules.

Le $d_{[3,2]}$ ou diamètre de surface, également diamètre de Sauter, est le diamètre moyen d'une sphère qui aurait la même surface que les particules.

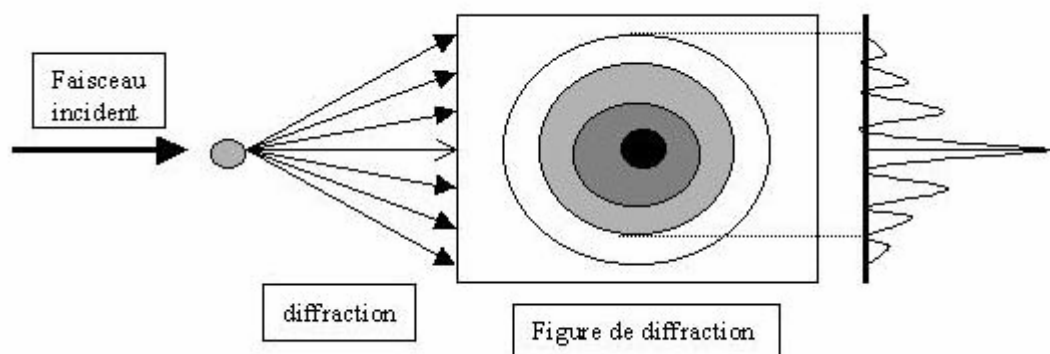


Figure-I-3. Schéma de principe de la granulométrie laser. La mesure est basée sur l'analyse des spectres de diffraction et de diffusion par les gouttelettes d'huile de la lumière émise par un laser. Le rayon des particules que l'on cherche à caractériser est fonction de l'intensité du rayonnement diffracté.

➤ Appareillage

Les expériences sont effectuées avec un granulomètre laser Mastersizer 2000 en mode liquide et équipé d'un échantillonneur contenant le dispersant (eau distillée).

La distribution de taille des gouttelettes a été mesurée sur trois émulsions indépendantes, toutes les deux heures, pendant les huit heures d'oxydation. Brièvement, trois gouttes d'émulsion sont dispersées dans de l'eau distillée et analysée à trois reprises par l'appareil. La distribution de taille des particules est analysée selon la théorie de Mie avec des indices de réfraction pour l'huile de tournesol de 1,475 (partie réelle) et 0,01 (partie imaginaire) et pour l'eau (dispersant) de 1,330. La distribution de taille des gouttelettes d'huile est caractérisée par les diamètres de volume $d_{[4,3]}$ et de surface $d_{[3,2]}$.

Une analyse de variance (ANOVA) à un facteur est réalisée pour déterminer l'effet de la durée de l'oxydation sur le $d_{[4,3]}$. Si un effet significatif est obtenu (intervalle de confiance de 95%), l'ANOVA est suivie du test post-hoc de Tukey-Kramer HSD. Les analyses ont été effectuées avec XLStat, version 2008.3.02 (Addinsoft SARL).

III. Résultats et discussion

III. 1 Caractéristiques des deux modèles

Après les étapes d'émulsification, les deux phases de l'émulsion semblent parfaitement mêlées l'une à l'autre. On obtient un système homogène de couleur blanche (Figure-I-4).

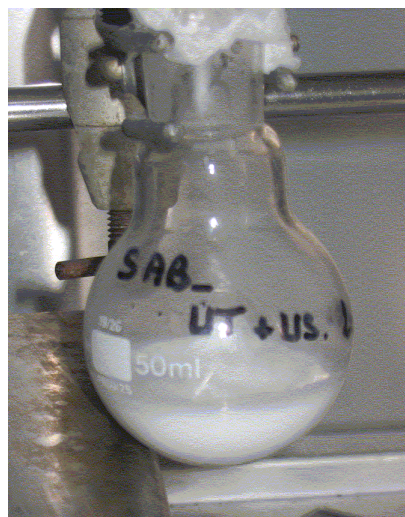


Figure-I-4. Aperçu du modèle SAB (pH 5,8).

III.1.1 Détermination de la taille des gouttelettes lipidiques

a) Observations microscopiques (modèles à pH 5,8)

➤ Impact des deux étapes d'homogénéisation

Dans un premier temps, l'impact de chacune des deux étapes d'émulsification, homogénéisation (24000 tr/min) puis irradiation sous ultrasons, a été comparé pour les deux modèles. Pour cette série de manipulations, la peroxydation lipidique n'a pas été initiée et le volume de solution de metmyoglobine est alors remplacé par un volume identique de tampon.

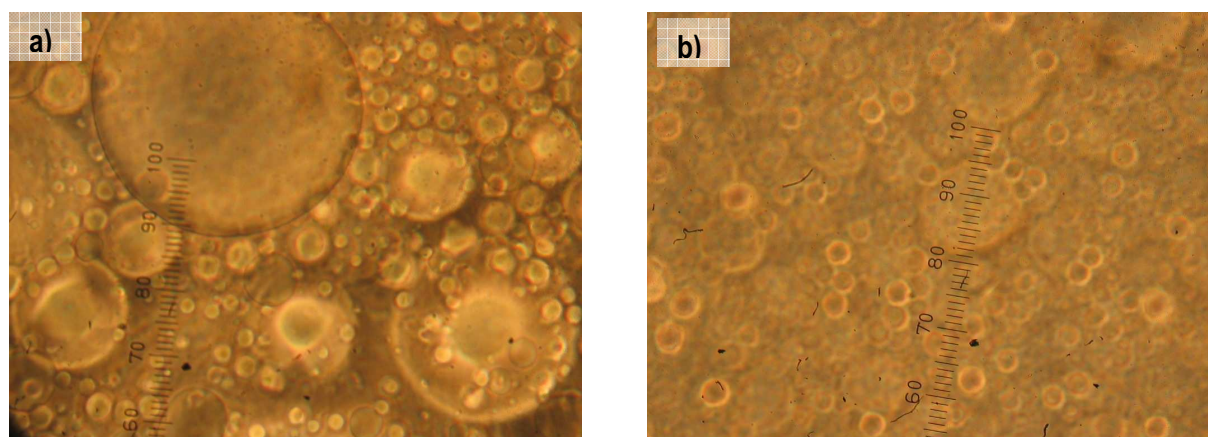


Figure-I-5. Observations microscopiques du modèle-PL, obtenu après simple homogénéisation (a) et après homogénéisation + ultrasons (b). L'unité de la règle correspond à des μm (grossissement x 1000).

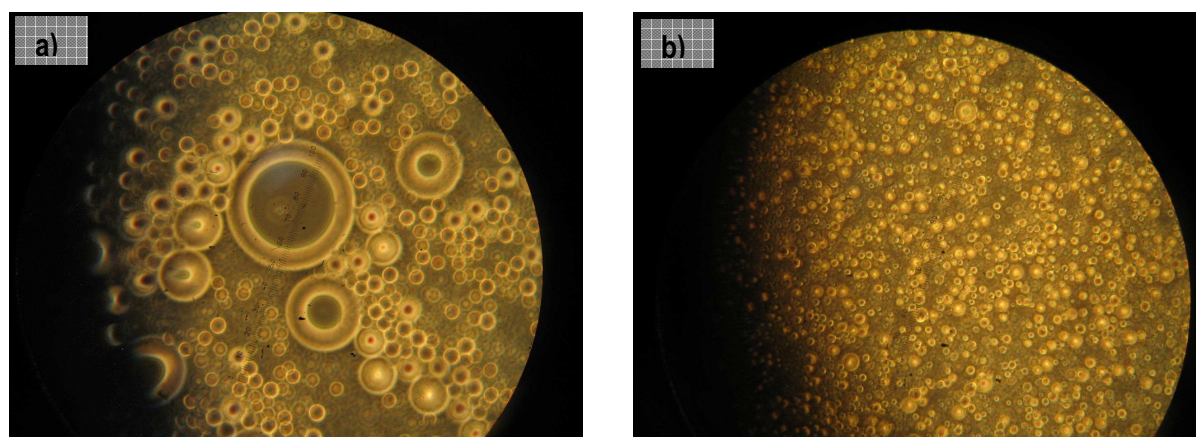


Figure-I-6. Observations microscopiques du modèle-SAB, obtenu après simple homogénéisation (a) et après homogénéisation + ultrasons (b). L'unité de la règle correspond à des μm (grossissement x 1000).

Dans les deux modèles, il apparaît clairement, que les émulsions obtenues après simple homogénéisation sont hétérogènes. Des particules de toutes tailles sont présentes. A l'aide de la règle, la taille de ces particules a pu être estimée. Dans les deux modèles, les diamètres varient de 5 μm à 70 μm (Figure-I-5 (a) et Figure-I-6 (a)). Au cours du temps, il a été jugé visuellement que ces systèmes ne sont pas stables physiquement ; les gouttelettes coalescent puis remontent progressivement en surface.

Le traitement aux ultrasons est donc essentiel. Il divise les grosses particules et permet donc d'affiner les pré-émulsions (Figure-I-5 (b) et Figure-I-6 (b)). Les ultrasons apportent une énergie plus importante qu'une simple homogénéisation et permettent l'obtention de modèles plus homogènes et plus stables au cours du temps.

➤ Description des émulsions

D'après l'ensemble des observations effectuées au microscope optique, dans le modèle-SAB, les gouttelettes d'huile sont très homogènes. Elles ont un diamètre compris entre 2 et 10 μm . Quelques particules de taille plus importante (12 à 20 μm) sont également observées mais celles-ci sont peu abondantes. En moyenne le diamètre moyen observé est donc de 5 μm . Les particules sont sphériques. La surface et le cœur des gouttelettes présentent des couleurs différentes en microscopie indiquant une différence d'absorption de la lumière et par conséquent une différence de composition (huile, protéine).

Le modèle stabilisé par les PL apparaît plus hétérogène. Les particules ont globalement des diamètres supérieurs à 10 μm et des particules de diamètre de 20 à 30 μm sont fréquemment observées. De plus, des agrégats regroupant plusieurs gouttelettes semblent être présents dans le mélange. De tous petits objets, correspondant potentiellement à des vésicules, sont aussi visibles.

Les analyses microscopiques soulignent donc les structures différentes des deux types d'émulsions obtenues. La granulométrie laser va permettre d'affiner ces résultats en donnant une distribution de taille et un diamètre moyen chiffré.

b) Analyses granulométriques

➤ Modèle-SAB

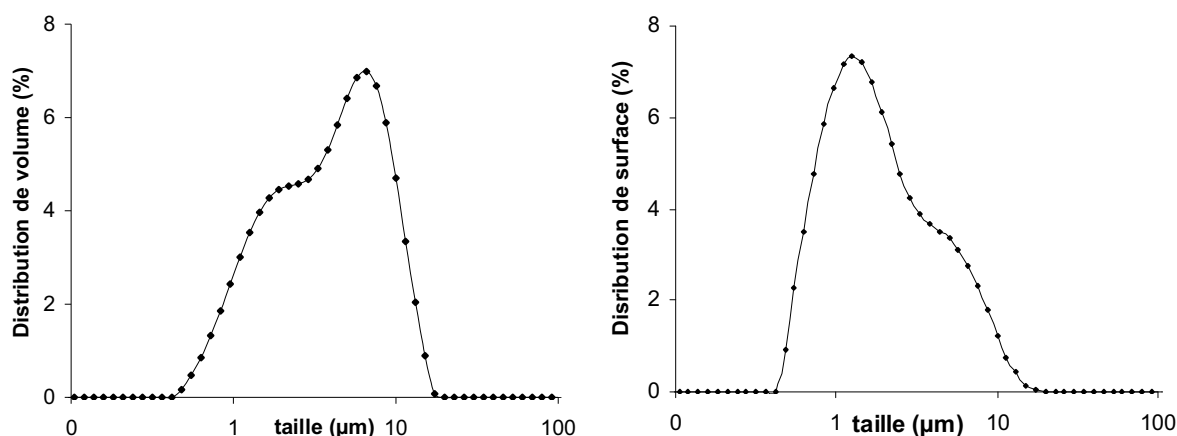


Figure-I-7. Distribution granulométrique de volume et de surface de l'émulsion stabilisée par la SAB.

Le $d_{[4,3]}$ moyen sur 3 émulsions indépendantes, initialement observé après ajout de $MbFe^{III}$ est de $4,1 (\pm 0,7) \mu m$ tandis que le $d_{[3,2]}$ moyen est de $2,4 (\pm 0,2) \mu m$. Il a été vérifié que l'ajout de metmyoglobine ne modifiait pas la taille des gouttelettes lipidiques. Ce résultat paraît logique puisque la metmyoglobine est ajoutée après le procédé d'émulsification et n'intervient pas lors de la formation des gouttelettes d'huile.

Toutes les émulsions stabilisées par la SAB possèdent le même profil de distribution de taille, composé de 2 populations principales de gouttelettes (modes $2 \mu m$ et $6-7 \mu m$). Les diamètres des gouttelettes sont relativement dispersés et s'étendent de $0,4$ à $20 \mu m$ (Figure-I-7).

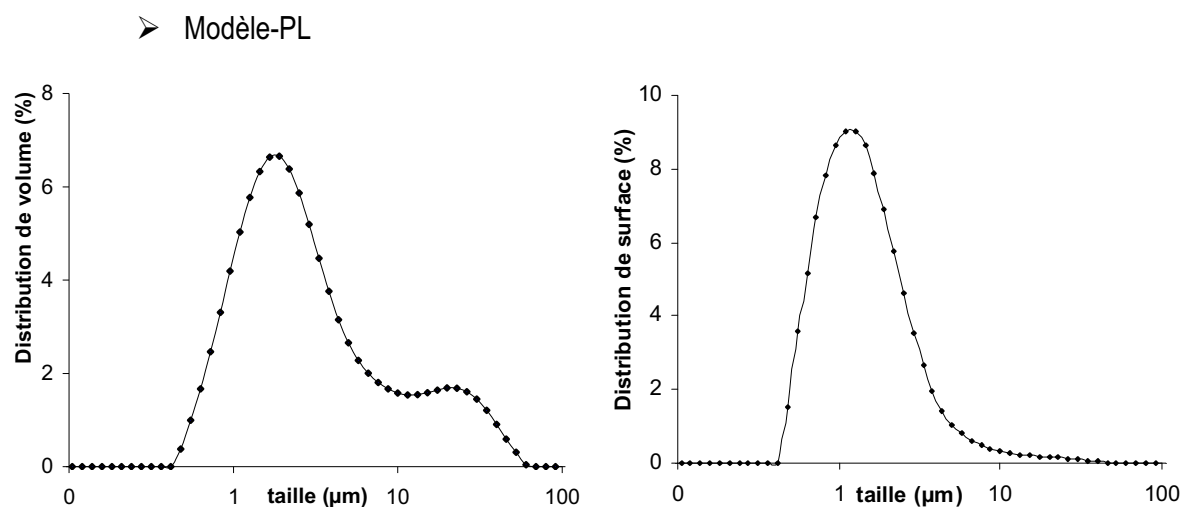


Figure-I- 8. Distribution granulométrique de volume et de surface de l'émulsion stabilisée par les PL.

Dans les émulsions stabilisées par les PL, le $d_{[4,3]}$ moyen, obtenu à partir de 3 répétitions indépendantes, est de $8,8 (\pm 2,4) \mu m$ et le $d_{[3,2]}$ moyen correspondant est de $2,8 (\pm 0,3) \mu m$. Les écarts-types des différentes répétitions réalisées ($2,4 \mu m$ et $0,3 \mu m$) indiquent que la reproductibilité est plus difficile à obtenir dans ces modèles. Ainsi les $d_{[4,3]}$ individuels s'échelonnent de $5,5 \mu m$ à $11,3 \mu m$. On distingue toutefois pour toutes les mesures des profils relativement similaires. Deux populations principales, l'une de mode $2 \mu m$ et l'autre de mode $15-20 \mu m$, sont observées. La dispersion des gouttelettes est bien plus importante que dans le modèle SAB et s'étend de $0,4 \mu m$ à $60 \mu m$ (Figure-I-8).

La granulométrie laser confirme donc les observations préalables réalisées au microscopique optique. Les gouttelettes du modèle-SAB ont un $d_{[4,3]}$ moyen de $4,1 \mu m$ alors que celles du modèle-PL ont un diamètre plus élevé de $8,8 \mu m$ et une distribution de taille beaucoup plus dispersée.

Les résultats présentés ci-dessus concernent les émulsions préparées à pH 5,8. Il a été vérifié que la baisse du pH (pH 4) n'influait pas la structure des émulsions. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une autre étude, portant également sur des émulsions d'huile de tournesol stabilisées par la SAB à pH 4 et à pH 6,5 [14].

III.1.2 Caractéristiques de l'interface

a) Interface SAB

La répartition des protéines entre la phase aqueuse et l'interface a été estimée par un simple calcul.

D'après des résultats non publiés d'Anne Meynier (Unité BIA, INRA de Nantes), le pouvoir de recouvrement de la SAB à l'interface a été estimé à 3 mg/m². Ce résultat est en bon accord avec des études [18-20] concernant la caséine, une protéine globulaire comme la SAB. Pour cette protéine, la valeur minimale pour obtenir une émulsion stable a été évaluée à 1 mg/m² alors que la valeur maximale pour former une monocouche de protéines est estimée à 3 mg/m².

Un $d_{[3,2]}$ moyen de 2,4 μm a été mesuré dans le modèle-SAB ce qui entraîne une surface volumique déployée par les gouttelettes d'huile de **2,3 m²/g** d'huile (Calcul en Annexe 2). Ainsi, 6,9 mg de SAB sont adsorbés pour 1 g d'huile. Dans 10 mL d'émulsion à 13,2 g/L de SAB, la quantité de SAB présente est de 132 mg pour 1 g d'huile.

Seulement 5,2 % de l'albumine totale est absorbée à l'interface des gouttelettes d'huile participant à la stabilité de l'émulsion. La majorité de la SAB se trouve donc en excès dans la phase aqueuse.

b) Interface PL

Dans le modèle-PL, le $d_{[3,2]}$ moyen est de 2,8 μm . La surface volumique déployée par les gouttelettes d'huile dans ce modèle est donc de **1,98 m²/g** d'huile. Il est indiqué par certains auteurs que la surface moléculaire d'une tête de phospholipide est de 50 Å^2 soit $50 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ [21]. Dans nos conditions, une concentration de phospholipides égale à 17,4 mM est nécessaire pour atteindre une stabilité convenable (soit 174 μmoles dans les 10 mL d'émulsion). Ainsi, en supposant la formation d'une monocouche à la surface des gouttelettes d'huile, $1,98 / (50 \times 10^{-20} \times N_{\text{Avogadro}}) = 6,6 \mu\text{moles}$ de PL sont nécessaires pour recouvrir la surface d'1 g d'huile.

Nous pouvons donc conclure que nous avons largement assez de PL dans notre modèle pour assurer un recouvrement total des gouttelettes d'huile.

III.2 Stabilité au cours de l'oxydation

La stabilité des deux types d'émulsions a été vérifiée en granulométrie laser toutes les deux heures durant une expérience de peroxydation lipidique non inhibée.

III.2.1 Stabilité du modèle-SAB

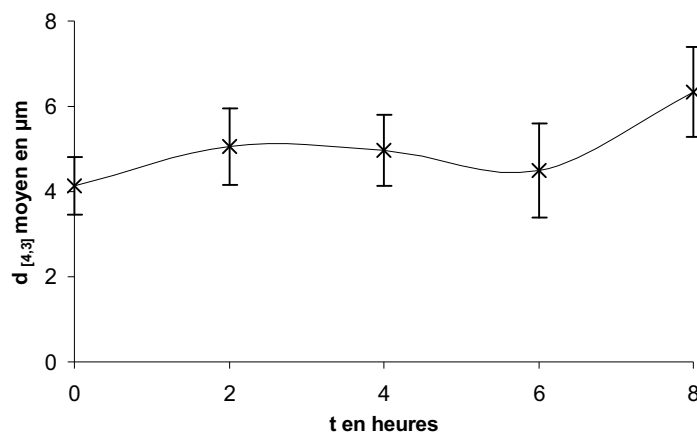


Figure-I-9. Evolution du $d_{[4,3]}$ moyen, dans le modèle-SAB à pH 5,8. Oxydation initiée par la metmyoglobine $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$.

Dans le modèle-SAB, les variations de $d_{[4,3]}$ entre les différents temps de mesure ne sont pas significatives ($p = 0,63$). Ainsi, malgré de légères évolutions dans les distributions de taille au cours des huit heures d'oxydation, les émulsions sont considérées comme stables (Figure-I-9). Les distributions de taille à $t = 8\text{h}$ font apparaître une nouvelle population de gouttelettes de diamètres plus importants ($>100 \mu\text{m}$), ce qui explique la légère élévation du diamètre moyen à $t = 8$ heures. Cette nouvelle population est peu abondante et ne reflète qu'une faible proportion des gouttelettes lipidiques de l'émulsion; elle paraît amplifiée en granulométrie laser car nous utilisons le paramètre $d_{[4,3]}$, dont la valeur est basée sur le volume occupé par les particules et non sur leur nombre. L'apparition de cette population reflète certainement des phénomènes de coalescence pouvant être liés à l'oxydation des protéines. Cette dégradation entraîne probablement un changement de conformation des protéines à l'interface et éventuellement leur agrégation [22].

III.2. Stabilité du modèle-PL

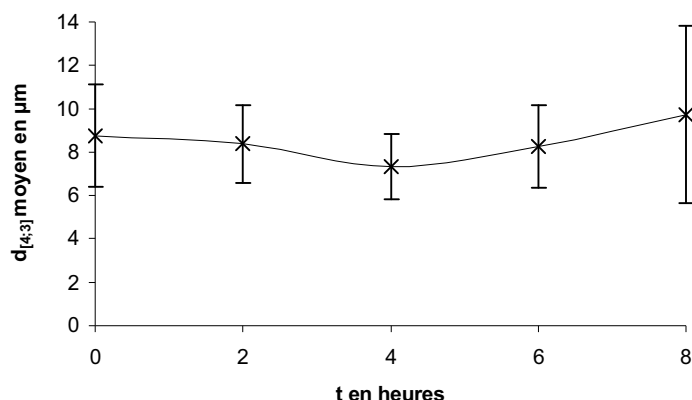


Figure-I-10. Evolution du $d_{[4,3]}$ moyen, dans le modèle-PL à pH 5,8. Oxydation initiée par la metmyoglobine $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$

Le $d_{[4,3]}$ moyen des émulsions-PL semble relativement stable au cours du temps (Figure-I-10). Aucune variation significative n'a pu être mise en évidence entre les $d_{[4,3]}$ moyens mesurés aux différents prélèvements ($p = 0,84$). Les barres d'erreur soulignent la variabilité des résultats obtenus d'une émulsion à une autre et la plus grande hétérogénéité des émulsions par rapport à celles du modèle-SAB. L'observation en détails des distributions de taille toutes les deux heures ne montre pas l'apparition d'une nouvelle population comme cela a été le cas dans le modèle-SAB. En revanche, les intensités des deux populations de taille caractéristiques de ces modèles ($2 \mu\text{m}$ et $15\text{-}20 \mu\text{m}$) tendent à s'inverser progressivement. Le pourcentage volumique de gouttelettes de $d_{[4,3]}$ moyen = $2 \mu\text{m}$ diminue alors que celui des gouttelettes de $d_{[4,3]}$ moyen = $15\text{-}20 \mu\text{m}$ augmente.

Si les études granulométriques ne révèlent pas nettement une évolution de la taille des gouttelettes d'huile au cours du temps, il est clairement visible à l'œil nu qu'au cours des huit heures d'oxydation les émulsions du modèle-SAB est plus stable que celles du modèle-PL. En effet, dans ce dernier modèle seulement, des gouttelettes d'huile sont visibles en surface dès 4 heures. Certains auteurs ont aussi observé ce phénomène à des pH proches de la neutralité et expliquent les différences observées entre les deux émulsifiants (SAB et PL) par la valeur de leur potentiel zéta. Le potentiel zéta caractérise la charge électrique de la surface de particules en fonction de leur environnement, permettant ainsi de prévoir le comportement des émulsions. Ainsi dans une émulsion d'huile de soja à 10% dans l'eau stabilisée par la SAB, il atteint -48 mV et permet la stabilité de l'émulsion sur quelques jours. En revanche, il est de -33 mV dans le cas d'émulsions stabilisées par la lécithine d'où leur plus

faible stabilité, limitée à quelques heures [18]. La protection stérique exercée par la SAB serait aussi une explication possible à la meilleure stabilité physique du modèle-SAB.

III.3 Conclusions

Des conditions adéquates ont donc été mises au point pour élaborer deux émulsions modèles du contenu gastrique et stables au cours des huit heures d'expérimentation. Ces modèles, qui n'impliquent que des composants d'origine alimentaire, sont plus complexes que les modèles élaborés jusque là pour étudier l'oxydation lipidique en milieu gastrique. Ils combinent une phase lipidique constituée de gouttelettes d'huile de tournesol et une phase aqueuse contenant l'initiateur de la peroxydation lipidique (metmyoglobine). A l'interface mais aussi largement distribués dans l'une ou l'autre des 2 phases, les agents émulsifiants (phospholipides ou SAB) apportent une bonne stabilité aux émulsions.

Dans les deux modèles, les distributions de taille des gouttelettes d'huile sont relativement larges et polymodales. Les émulsions comportent donc une grande variété de particules de tailles différentes. Cette caractéristique est susceptible d'altérer la répétabilité des expériences mais la diversité des particules est aussi un point positif pour notre travail puisqu'elle reflète la réalité des conditions gastriques. Les deux modèles diffèrent de par la taille des gouttelettes d'huile dispersées et de par leur stabilité physique au cours du temps. Les émulsions du modèle-SAB apparaissent plus homogènes que celles du modèle-PL. De plus, le diamètre moyen des gouttelettes d'huile y est deux fois plus petit que dans le modèle PL.

Ces deux modèles vont maintenant permettre d'étudier la peroxydation lipidique et son inhibition par des polyphénols très communs dans notre alimentation et appartenant aux différentes familles de composés phénoliques. Ce travail, mené sur deux émulsions possédant des caractéristiques distinctes (taille des gouttelettes d'huile) et présentant des interfaces de nature différentes, permettra aussi de conclure quant à l'influence des constituants alimentaires sur l'oxydation du bol alimentaire et son inhibition pouvant prendre part dans le tractus digestif.

Références bibliographiques

1. Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, *et al.* **Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach.** *American Journal of Physiology* 1994,266:G372-G381.
2. Carey MC, Small DM, Bliss CM. **Lipid digestion and absorption.** *Annual Review of Physiology* 1983,45:651-677.
3. Tyssandier V, Reboul E, Dumas JF, Bougteloup-Demange C, Armand M, Marcand J, *et al.* **Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2003,284:G913-G923.
4. Burton DD, Kim HJ, Camilleri M, Stephens DA, Mullan BP, O'Connor MK, Talley NJ. **Relationship of gastric emptying and volume changes after a solid meal in humans.** *American Journal of Physiology* 2005,289:G261-G266.
5. Hoebler C, Lecannu G, Belleville C, Devaux MF, Popineau Y, Barry JL. **Development of an in vitro system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2002:389-402.
6. Vo L, Simonian HP, Doma S, Fisher RS, Parkman HP. **The effect of rabeprazole on regional gastric acidity and the postprandial cardia/gastro-oesophageal junction acid layer in normal subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.** *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2005,21:1321-1330.
7. Calbet JAL, Holst JJ. **Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans.** *European Journal of Nutrition* 2004,43:127-139.
8. Gorelik S, Lapidot T, Shaham I, Granit R, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J. **Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:3397-3402.
9. Gil-Izquierdo A, Zafrilla P, Tomas-Barberan FA. **An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract.** *European Food Research and Technology* 2002,214:155-159.
10. Walsh KR, Zhang YC, Vodovotz Y, Schwartz SJ, Failla ML. **Stability and bioaccessibility of isoflavones from soy bread during in vitro digestion.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003,51:4603-4609.
11. Perez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, Garcia-Viguera C. **In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:2308-2312.
12. McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. **Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:5896-5904.
13. Miller DD, Schriker BR, Rasmussen RR, Van Campen D. **An in vitro method for estimation of iron availability from meals.** *Am J Clin Nutr* 1981,34:2248-2256.
14. Villière A. **Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des protéines** [Thèse]. Nantes: Faculté des Sciences et des Techniques; 2005.
15. Peters T. **All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications.**: Academic Press; 1995.
16. Hamilton RJ, Kalu C, Prisk E, Padley FB, Pierce H. **Chemistry of free radicals in lipids.** *Food Chemistry* 1997,60:193-199.

17. Mikkelsen A, Skibsted LH. **Acid-catalysed reduction of ferrylmyoglobin: product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH.** *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1995,200:171-177.
18. Kong LG, Beattie JK, Hunter RJ. **Electroacoustic study of BSA or lecithin stabilised soybean oil-in-water emulsions and SDS effect.** *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2003,27:11-21.
19. Dalgleish DG. **Casein micelles as colloids: Surface structures and stabilities.** *Journal of Dairy Science* 1998,81:3013-3018.
20. Dalgleish DG. **Adsorption of protein and the stability of emulsions.** *Trends in Food Science & Technology* 1997,8:1-6.
21. Pathirana S, Neely WC, Vodyanoy V. **Condensing and expanding effects of the odorants (+)- and (-)-carvone on phospholipid monolayers.** *Langmuir* 1998,14:679-682.
22. Genot C, Meynier A, Riaublanc A. **Lipid oxidation in emulsions.** In: *Lipid oxidation pathways.* Edited by Kamal-Eldin. Champaign: AOCS Press; 2003.

ANNEXES

ANNEXE 1

Répartition en classe des phospholipides par CLHP Analyse de la composition de la L- α -PC (Sigma 51%)

L'analyse est effectuée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase normale, couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DDL Sédex 55).

Principe du détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DDL) :

Il s'agit de mesurer la quantité de lumière qui est diffusée par des microparticules solides ou liquides dispersées dans une phase gazeuse et placées sous irradiation par un faisceau de lumière incident.

Cette technique nécessite trois étapes : la nébulisation puis l'évaporation de l'effluent chromatographique et la diffusion de la lumière par les particules résiduelles qui constituent les analytes. Par conséquent, l'échantillon à analyser doit être moins volatil que la phase mobile. La réponse en quantité de lumière diffusée est considérée comme directement proportionnelle à la masse des solutés diffusant la lumière;

La colonne utilisée à température ambiante est une colonne Silice Supelcosil TM MC-Si, 120Å, 5 μ m, 250 x 4.6 mm (Supelco).

La phase mobile est constituée d'un gradient du solvant A et du solvant B.

Solvant A : chloroforme

Solvant B : mélange méthanol/ammoniaque aqueux (30%)/chloroforme (460/35/5 v/v/v)

Le gradient suivant est appliqué à un débit de 1,5 mL/min :

<u>t (min)</u>	<u>A (%)</u>	<u>B (%)</u>
0	100	0
10	80	20
20	0	100
30	0	100
30,1	100	0

Pour notre analyse, 20 mg de L- α -PC sont dissous dans 4 mL de chloroforme avant injection.

Le volume injecté est de 125 μ L.

ANNEXE 2

Calcul de la surface volumique d'une particule sphérique

Soit une sphère de diamètre $d_{[3,2]}$, de rayon r et de surface volumique S_{vol}

Sa surface est définie par la relation : $S = 4\pi r^2$

Son volume est défini par la relation : $V = 4\pi r^3/3$

Ainsi, sa surface volumique S_{vol} est définie par la relation :

$$S_{vol} = S/V = 3/r = 6/d_{[3,2]}$$

Si d est exprimé en μm , S_{vol} est exprimée en μm^{-1} ou m^2/cm^3

CHAPITRE 2.

PEROXYDATION LIPIDIQUE DANS LES MODELES CHIMIQUES DE BOL ALIMENTAIRE INHIBITION PAR DES POLYPHENOLS D'ORIGINE ALIMENTAIRE

« Une expérience bien conçue et bien conduite procure un plaisir comparable à celui qu'éprouve l'artisan devant un travail bien fait. »

Pierre Joliot, *La Recherche Passionnément*

I. Etat des connaissances	119
I.1 Peroxydation lipidique dans des systèmes émulsionnés (h/e). Inhibition par les antioxydants	119
I.1.1 Peroxydation lipidique dans les systèmes émulsionnés	119
I.1.2 Activité des antioxydants en système émulsionné	123
I.2 La metmyoglobine	125
I.2.1 Caractérisation structurale de la protéine	125
I.2.2 Cycles rédox des différentes formes de myoglobine	126
I.2.3 Teneur en metmyoglobine dans la viande rouge	127
I.2.4 La metmyoglobine (MbFe ^{III}) comme initiateur de peroxydation lipidique	128
I.3 Conclusion	130
II. Matériels et Méthodes	131
II.1 Matériels	131
II.1.1 Produits chimiques	131
II.1.2 Equipements	132
II.2 Méthodes	133
II.2.1 Mesure de l'oxydation dans les modèles du bol alimentaire	133
II.2.2 Analyse de la phase lipidique oxydée par CLHP-SM	136
II.2.3 Dégradation oxydante des composés phénoliques et de la vitamine C	137
II.2.4 Extraction des caroténoïdes issus des PL utilisés comme émulsifiants	139
III. Résultats et discussion	141
III.1 Peroxydation lipidique dans les modèles : dosage des composés d'oxydation primaire	141
III.1.1 Initiation de la peroxydation lipidique par la metmyoglobine	141
III.1.2 Initiations de la peroxydation lipidique par d'autres composés à pH 5,8	145
III.1.3 Composition de la phase lipidique avant et après oxydation	147
III.2 Inhibition de la peroxydation lipidique par les polyphénols	150
III.2.1 Inhibition de la peroxydation lipidique par la quercétine	150
III.2.2 Inhibition par les autres composés phénoliques et la vitamine C de la peroxydation lipidique initiée par MbFe ^{III} à pH 5,8	158
III.2.3 Inhibition par la rutine, l'acide chlorogénique et la vitamine C de la peroxydation lipidique initiée par MbFe ^{III} à pH 4	162
III.2.4 Comparaison de la capacité des différents composés à inhiber la peroxydation lipidique	164
III.2.5 Inhibition par des mélanges d'antioxydants à pH 5,8	170
III.3 Dégradation oxydante des composés phénoliques au cours du temps et caractérisation des produits néoformés	172
III.3.1 Oxydation de la quercétine dans les émulsions à pH 5,8	172
III.3.2 Oxydation de la rutine dans les émulsions à pH 5,8	179
III.3.3 Oxydation de la (+)-catéchine dans les émulsions à pH 5,8	181
III.3.4 Oxydation de l'acide caféique dans les émulsions à pH 5,8	184
III.3.5 Oxydation de l'acide chlorogénique dans les émulsions à pH 5,8	185
III.3.6 Oxydation de l' α -tocophérol dans les émulsions à pH 5,8	186
III.3.7 Oxydation de l'acide ascorbique dans les émulsions à pH 5,8	186

III.3.8 Oxydation de la quercétine, de la rutine et de l'acide chlorogénique dans les émulsions à pH 4	187
III.4 Conclusion	188
<i>Références bibliographiques</i>	<i>191</i>
ANNEXES	197

I. Etat des connaissances

I.1 Peroxydation lipidique dans des systèmes émulsionnés (h/e). Inhibition par les antioxydants

I.1.1 Peroxydation lipidique dans les systèmes émulsionnés

Dans une émulsion h/e, les lipides sont dispersés dans une phase aqueuse et ne sont pas directement en contact avec l'air. De ce fait, même si les mécanismes de l'oxydation lipidique en système émulsionné ne sont pas fondamentalement différents de ceux en phase continue, un certain nombre de facteurs additionnels intervient dans le processus d'oxydation lipidique. Dans un premier temps, l'oxydation lipidique des systèmes émulsionnés requiert que l'espèce pro-oxydante entre en contact avec la phase lipidique, traversant une interface constituée des lipides les plus polaires et des émulsifiants. Ainsi, la nature des émulsifiants, la composition de l'interface, les caractéristiques de la phase lipidique (composition et taille des gouttelettes) et la nature des espèces initiatrices sont autant de paramètres à prendre en compte dans la compréhension des phénomènes d'oxydation en systèmes émulsionnés.

a) Influence de l'émulsification et du traitement des émulsions

La technique utilisée pour élaborer l'émulsion peut aussi avoir un impact sur l'oxydation des émulsions. L'agitation mécanique intense durant l'étape d'homogénéisation de l'huile dans la phase aqueuse peut amorcer l'oxydation lipidique durant la préparation des émulsions. En effet, elle entraîne d'importantes forces de cisaillement et est aussi à l'origine d'une augmentation de température locale et d'une incorporation de dioxygène dans l'émulsion. La sonication peut aussi induire une oxydation. En milieu aqueux, le phénomène de cavitation entraîne une dissociation thermique de la vapeur d'eau en des radicaux HO[•] et des atomes H[•]; les ultrasons sont aussi responsables d'une élévation de température et de forces mécaniques de cisaillement pouvant être impliquées dans les phénomènes d'oxydation [1, 2]. Il apparaît donc essentiel de prendre des précautions (atmosphère inerte ou contrôle de la température) lors de la préparation des émulsions.

Les conditions d'agitation des émulsions lors de leur conservation influencent la diffusion du dioxygène et des différents constituants, ce qui peut affecter les cinétiques d'oxydation [3].

b) Influence de la composition et de l'organisation de la phase lipidique

➤ Composition de la phase lipidique

Comme en phase continue, le degré d'insaturation des lipides présents dans les gouttelettes dispersées est le premier paramètre influençant l'oxydation lipidique d'une émulsion. La position des doubles liaisons a aussi un impact. Ainsi, dans des organisations de type micellaire, les acides gras des séries ω -9 sont plus sensibles à l'oxydation que ceux des séries ω -6 et ω -3. Ce phénomène est attribué au fait que leurs doubles liaisons proches de l'extrémité carboxylique sont localisées près de l'interface les rendant plus vulnérables à l'oxydation [3].

De la même façon, la polarité des molécules lipidiques, qui est déterminante dans leur localisation au sein de la gouttelette, est un facteur clé de leur oxydabilité. Les lipides les moins polaires situés au cœur des gouttelettes lipidiques sont moins sensibles à l'oxydation que les plus polaires, situés en périphérie des gouttelettes.

➤ Organisation de la phase lipidique

En général, quand les lipides sont dispersés dans une phase aqueuse, leur oxydabilité est plus grande que dans une phase continue [4]. Cette observation est principalement attribuée à la création d'une surface interfaciale étendue entre l'huile et la phase aqueuse.

Pour une concentration donnée en huile, plus le diamètre des gouttelettes d'huile est petit, plus la surface interfaciale est importante. Par conséquent, la probabilité de contact entre lipides, molécules de dioxygène et espèces pro-oxydantes hydrophiles (par exemple, des ions de métaux de transition) est plus élevée. Cela dit, certaines études soulignent la controverse des résultats des travaux portant sur la relation entre taille des gouttelettes et oxydabilité. Celle-ci ne serait vérifiée que dans certaines conditions de pH, de concentrations et serait également fonction du type d'initiateurs de peroxydation choisis [3, 5-7].

c) Diffusion du dioxygène

Le dioxygène est environ quatre fois plus soluble dans les huiles alimentaires que dans l'eau. Quand aucune mesure n'est prise pour l'exclure, il y a toujours assez de dioxygène dans la phase lipidique pour alimenter l'oxydation lipidique ou tout au moins pour la démarrer [8, 9].

d) Influence de la nature de l'interface

L'interface d'une émulsion constitue une couche fine entourant les gouttelettes lipidiques. Elle comprend à la fois les molécules d'émulsifiants mais aussi d'autres molécules dont la localisation dans l'interface dépend de leur 'balance hydrophile-lipophile'.

Beaucoup de molécules émulsifiantes, comme les protéines et les agents tensio-actifs, sont des espèces plus ou moins chargées selon le pH et la force ionique de la phase aqueuse. Plusieurs études s'attachent à comparer des émulsifiants en fonction de leur charge [10, 11]. Le SDS (dodécylsulfate de sodium) est utilisé comme émulsifiant anionique, le Tween 20 ou le Brij comme émulsifiants non ioniques et le bromure de dodécyltriméthylammonium comme émulsifiant cationique. Dans ces études, réalisées à pH 7 ou à pH 3, l'oxydation lipidique initiée par Fe^{2+} est plus rapide en présence de SDS, suivie par les émulsifiants non ioniques puis cationiques. Ainsi, une surface chargée attire dans la phase aqueuse environnante des ions de charge opposée et repousse ceux de même charge. Dans une émulsion stabilisée par le caséinate de sodium, il a été observé que la formation des diènes conjugués et des composés volatils était plus rapide que dans l'émulsion analogue stabilisée par la SAB. La densité de charge négative du caséinate de sodium, quatre fois supérieure à celle de l'albumine au pH d'étude, pourrait expliquer cet effet à travers l'attraction des ions métalliques pro-oxydants à la surface des gouttelettes d'huile. Les propriétés chélatantes des protéines vis-à-vis des ions métalliques peuvent aussi expliquer l'impact de l'interface sur l'oxydation lipidique. Ainsi, le fort pouvoir chélatant du caséinate comparé à celui de la SAB est une autre explication aux résultats observés [12].

L'interface peut aussi intervenir sur les processus d'oxydation en tant que "barrière physique" séparant les lipides des espèces pro-oxydantes. Une émulsion d'huile de saumon stabilisée par le Brij 76 s'oxyde beaucoup plus vite que la même émulsion stabilisée par le Brij 700, émulsifiant comportant en moyenne 10 fois plus d'unités polyoxyéthylène et possédant ainsi une tête polaire bien plus large que son homologue Brij 76 [13]. Dans une autre étude portant sur l'oxydation d'une émulsion stabilisée par différents émulsifiants (lécithine, Tween20, mono/diacylglycérols ou isolat protéique de lactosérum), il est observé que la peroxydation lipidique est plus rapide à de faibles concentrations d'émulsifiant qu'à de fortes concentrations. L'agrégation des molécules d'émulsifiant en surface des gouttelettes lipidiques, à fortes concentrations, est supposée produire un épaissement de l'interface, créant ainsi une barrière efficace à la diffusion des initiateurs d'oxydation lipidique [14]. Ces différentes études

s'accordent donc à conclure que l'épaisseur de l'interface serait un facteur déterminant dans l'oxydation de la phase lipidique.

Quand elle contient initialement des acides gras insaturés ou des protéines pro-oxydantes (ex : métalloprotéines), l'interface peut promouvoir l'oxydation. Par exemple la lécithine issue des phospholipides du jaune d'oeuf contient souvent des teneurs appréciables d'hydroperoxydes qui peuvent augmenter l'oxydabilité des émulsions.

e) Influence de la phase aqueuse

Le pH joue un rôle extrêmement important avec des effets parfois opposés sur l'oxydation des lipides. Il est susceptible d'influencer un grand nombre de paramètres comme la charge globale de l'interface, la solubilité ou la répartition des différentes molécules présentes dans le système (ex : ions métalliques). Dans le cas de Fe^{3+} par exemple, lorsque le pH diminue, sa solubilité augmente de même que son pouvoir oxydant. L'implication du pH à différents niveaux explique la contradiction des résultats obtenus à partir de différents systèmes [6]. Si certains auteurs observent, à partir d'une émulsion d'huile de maïs stabilisée par du SDS et oxydée en présence de l'initiateur $FeCl_3$ /acide ascorbique, une accélération de la peroxydation lipidique en diminuant le pH de 8 à 3 [15], d'autres observent l'effet inverse dans des émulsions à base d'huile de saumon également stabilisées par du SDS [10]. Il est ainsi impossible de dégager une règle générale quant à l'effet du pH sur l'oxydation des lipides en système émulsionné.

D'autres composants de la phase aqueuse comme les acides aminés et les sucres possèdent des propriétés antioxydantes ou pro-oxydantes selon leur concentration, le pH et la présence d'ions métalliques [3].

I.1.2 Activité des antioxydants en système émulsionné

L'activité des antioxydants en émulsion dépend de leur localisation et de leur orientation dans l'émulsion [16].

a) Le paradoxe polaire

Selon « le paradoxe polaire », dans une phase lipidique continue, les antioxydants hydrophiles sont généralement plus efficaces que les antioxydants lipophiles. Dans les systèmes émulsionnés, l'inverse est observé. Cette différence d'activité entre antioxydants hydrophiles et lipophiles, fonction de la nature des systèmes dans lesquels ils agissent, s'explique par la répartition des antioxydants au sein de ces systèmes.

Pour être efficace, un antioxydant doit se positionner là où se produisent les étapes d'amorçage et de propagation de la réaction, c'est-à-dire principalement à l'interface. Dans une phase lipidique continue, les antioxydants hydrophiles vont se placer préférentiellement à l'interface air/huile, en raison de leur faible solubilité dans l'huile. Les antioxydants lipophiles, dilués dans la phase lipidique continue, auront alors une activité antioxydante plus faible. En revanche, dans un système émulsionné, les antioxydants hydrophiles sont dilués dans la phase aqueuse alors que les antioxydants lipophiles se placent dans les gouttelettes d'huile ou à l'interface huile/eau et sont donc plus efficaces [3, 6, 17].

b) Influence du pH sur l'activité antioxydante

En affectant la charge, et donc la solubilité et la localisation des antioxydants [11], le pH d'une émulsion peut avoir un impact direct sur le pouvoir antioxydant des composés phénoliques. Les composés phénoliques possèdent des groupements dissociables (-OH) et leur polarité est fortement influencée par le pH de la phase environnante. De façon générale, les polyphénols semblent être plus efficaces aux pH acides qu'aux pH basiques en systèmes émulsionnés. Le pK_a du couple phénol-phénate est de 10,0 tandis que dans le cas du catéchol, les valeurs sont les suivantes : $pK_{a1} = 9,34$, $pK_{a2} = 12,6$. Ainsi, à pH neutre ou faiblement acide, ces composés sont non dissociés. En revanche, les groupements électroattracteurs (groupements C=O, par exemple) conjugués aux cycles phénoliques peuvent considérablement abaisser les pK_a au point que certains polyphénols peuvent être au moins partiellement dissociés à pH neutre. C'est le cas de la quercétine ($pK_a = 5,54; 6,95; 8,21; 9,77 (11,0)$) et de la rutine ($pK_a = 6,95; 8,30; 10,04 (10,9)$) [18].

Dans une émulsion d'huile de tournesol/eau stabilisée par le Tween 20, l'activité de l'acide caféique varie en fonction du pH [19]. Celui-ci s'est montré plus efficace à pH 3 et 5 qu'à pH 9. A pH acide, l'acide caféique est présent sous forme neutre ou de monoanion carboxylate. Les groupements OH phénoliques ($pK_{a1} = 7,6$ et $pK_{a2} = 11,8$) ne sont pas dissociés. En revanche à pH 9, la dissociation du OH phénolique le plus acide (O4-H), qui a priori augmente le pouvoir réducteur et donc le pouvoir antioxydant intrinsèque de l'acide caféique, accélère aussi son autoxydation avec formation de dimères dont l'activité antioxydante est réduite. Ainsi, la stabilité accrue au dioxygène des composés phénoliques sous leur forme protonée pourrait expliquer leur meilleur pouvoir antioxydant aux pH acides.

Frankel *et al.* (1996) ont observé le même effet avec l'acide carnosique et le carnosol dans des émulsions d'huile de maïs dans l'eau [20]. Les deux composés testés se sont montrés des inhibiteurs de peroxydation lipidique plus efficaces à pH 4 et 5 qu'à pH 7. La forme protonée d'un antioxydant étant moins polaire que la forme dissociée [6], les auteurs attribuent cet effet à la partition des composés non dissociés vers la phase lipidique ou l'interface.

d) Effets des protéines sur l'activité antioxydante

Les protéines présentes à la fois en phase continue et à l'interface peuvent modifier de façon marquée l'activité des molécules antioxydantes via des interactions spécifiques ou non.

Dans la plupart des études, l'introduction de protéines (SAB, lactoferrine) au sein d'une émulsion préformée et stabilisée, soit par le Tween 20, soit par des phospholipides, semble accroître le pouvoir antioxydant des polyphénols [19, 21, 22].

Ainsi, la combinaison de SAB avec des catéchines du thé (épicatéchine, épicatéchine gallate, épigallocatechine et épigallocatechine gallate) ou avec l'acide caféique permet une très bonne stabilité à l'oxydation des émulsions grâce à un effet synergique prononcé [23]. Celui-ci peut être attribué à la formation de complexes SAB - composé phénolique localisés à l'interface des émulsions (sur le site même de l'amorçage de l'oxydation) du fait des propriétés tensio-actives de la SAB.

I.2 La metmyoglobine

I.2.1 Caractérisation structurale de la protéine

La myoglobine est une protéine présente en grande quantité dans les cellules musculaires cardiaques et squelettiques. Elle assure le transport du dioxygène nécessaire à leur contraction. Elle constitue le principal pigment des muscles. Elle est également responsable de la couleur rouge pourpre de la viande rouge.

C'est une molécule extrêmement compacte qui comporte une chaîne polypeptidique, la globine, dont 70% de la chaîne sont repliés en hélice α . A l'intérieur de la chaîne polypeptidique, elle renferme un hème, groupe non peptidique constitué d'une protoporphyrine et d'un ion Fe^{2+} central lié aux quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrole plan de la protoporphyrine (Figure-II-1, Figure-II-2).

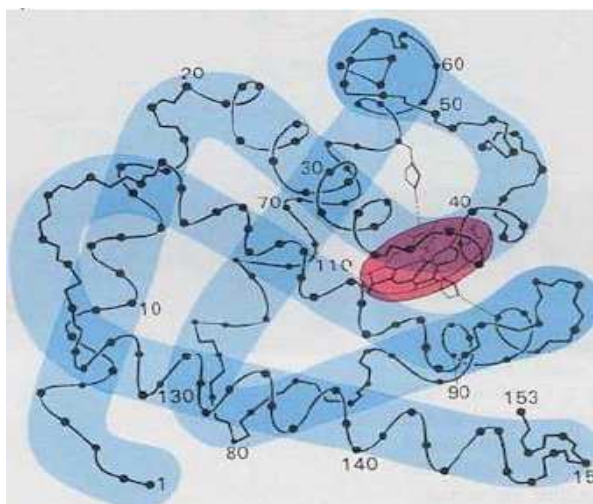


Figure-II-1. Représentation spatiale de la myoglobine. Par Gaillard [24]

L'hème de la myoglobine est étroitement lié à la globine par de nombreuses interactions de van der Waals et par une liaison de coordination entre le cycle imidazole du résidu « histidine proximal » et Fe^{2+} . Enfin, la myoglobine possède un sixième site de coordination inoccupé, situé à l'intérieur de la poche hydrophobe qui lui permet de lier de façon irréversible le dioxygène.

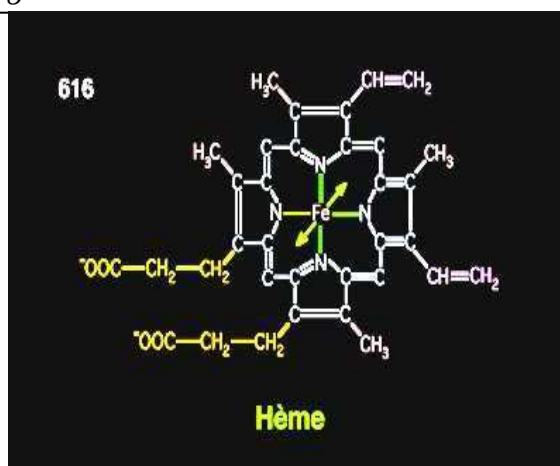


Figure-II-2. Structure de l'hème.

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/SFbioch/POLY.Chp.3.2.html>

1.2.2 Cycles rédox des différentes formes de myoglobine

La myoglobine peut exister dans différents états rédox comme illustré en Figure-II-3. Elle est physiologiquement active sous sa forme désoxy ($MbFe^{II}$) et oxy ($MbFe^{II}-O_2$). Cependant, une oxydation continue à l'état $MbFe^{III}$ se déroule *in vivo*, qui, malgré la réduction enzymatique de la forme « met » ($MbFe^{III}$) en forme « désoxy » ($MbFe^{II}$), conduit à un niveau quasi-stationnaire de 2 à 3% de $MbFe^{III}$ dans les tissus biologiques. Ainsi, la forme oxymyoglobine n'est pas un pigment stable et son autoxydation entraîne la formation de faibles concentrations de $MbFe^{III}$ et d'ion superoxyde.

De plus, comme cela est montré sur la Figure-II-3, la $MbFe^{III}$ peut être activée par réaction avec le peroxyde d'hydrogène pour conduire à une forme hypervalente instable, appelée perferrylmyoglobine de formule $Mb \cdot Fe^{IV}=O$ ($Mb \cdot$: cofacteur + radical globine porté par un résidu Tyr). De courte durée de vie ($t_{1/2 \text{ vie}} = 50$ à 280 ms), cette dernière évolue rapidement en une espèce plus stable, la ferrylmyoglobine ($MbFe^{IV}=O$) selon un processus dit d'auto-réduction encore incomplètement élucidé. Même si l'état « ferryl » est relativement stable, il est lui-même lentement réduit en forme « met » [25].

Les différentes formes de myoglobine présentent des spectres d'absorption distincts. Ainsi, la myoglobine ($MbFe^{II}$) est pourpre ($\lambda_{\text{max}} = 555$ nm), l'oxymyoglobine ($MbFe^{II}-O_2$) est rouge vif ($\lambda_{\text{max}} = 542$ et 580 nm) et le produit d'oxydation de $MbFe^{II}$ à l'état ferrique, la metmyoglobine ($MbFe^{III}$), est marron ($\lambda_{\text{max}} = 505$ et 635 nm).

L'hème libre (Fe^{II}-protoporphyrine) ne forme pas d'adduit avec O₂ mais s'oxyde rapidement en hématine (Fe^{III}-protoporphyrine).

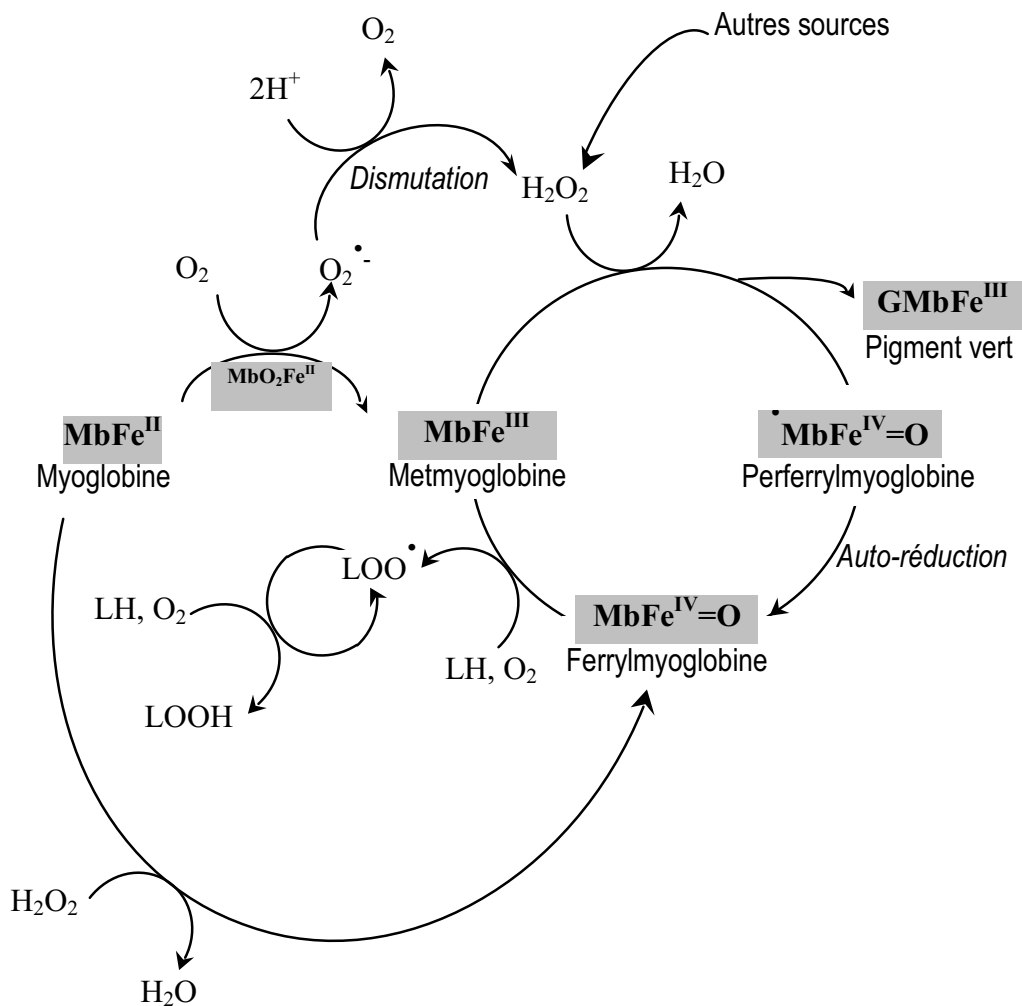


Figure-II-3. Cycle rédox des différentes espèces de la myoglobine à pH 5,5; adapté de Baron et Andersen [25].

1.2.3 Teneur en metmyoglobine dans la viande rouge

La viande de bœuf constitue la seconde viande la plus consommée en France (12 kg/habitant/an) après la volaille (données CIV : Centre d'Information des Viandes). La myoglobine y est le principal pigment. Elle est également présente dans le porc et les muscles rouges du poulet, représentant 70 à 90 % de la concentration totale des protéines hémiques.

A l'opposé de l'équilibre délicat entre les formes « désoxy »/« oxy »/« met » observé dans les muscles vivants, les procédés *post-mortem*, et particulièrement la chute du pH, inactive continuellement

les systèmes enzymatiques réducteurs et stimule l'autoxydation de l'état Fe^{II} à l'état Fe^{III} . Ceci résulte en une accumulation de $MbFe^{III}$ dans la viande [25].

Au sein d'une même espèce animale, la teneur en myoglobine de la viande varie selon le type de muscle et selon l'âge de l'animal. Dans la viande crue de lapin, le fer héminique représente 43 % du fer total, soit 3,81 $\mu\text{g/g}$ de viande. Après cuisson à chaleur moyenne, une diminution de 62 % est observée. Parallèlement à cette baisse, une augmentation du fer non héminique est observée, ce qui traduit l'oxydation de la porphyrine et la libération du fer qui s'additionne alors au pool de fer libre [26]. Dans le bœuf frais (muscle *longissimus dorsi*), la concentration de fer héminique a été déduite par soustraction du fer libre au fer total, après chélation du fer libre avec l'EDTA et précipitation du fer héminique par acidification à l'acide trichloroacétique. La concentration obtenue est de 18,84 $\mu\text{g/g}$, ce qui représente 90 % du fer total. Après une cuisson à 70 °C, le taux de fer héminique diminue significativement au profit du fer libre, ce qui accélère l'oxydation lipidique dans la viande [27]. Dans une étude plus récente, comparant la myoglobine de la viande de buffle à celle de la viande de bœuf (muscle *longissimus dorsi*), les concentrations mesurées par spectroscopie après extraction et purification de fractions contenant la myoglobine étaient bien plus importantes que celles mesurées précédemment : 3,9 mg/g pour le buffle et 2 mg/g pour le bœuf [28].



Ainsi, si l'on considère l'ingestion d'un morceau de bœuf de 200 g contenant 2mg/g de myoglobine ($PM = 17600 \text{ g/mol}$) et une diminution de 60% de la concentration de myoglobine due à la cuisson, nous obtenons une concentration de myoglobine dans un compartiment gastrique de 500 mL de **18 μM** .

1.2.4 La metmyoglobine ($MbFe^{III}$) comme initiateur de peroxydation lipidique

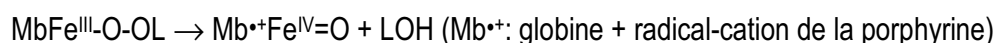
Les mécanismes d'oxydation des acides gras polyinsaturés induits par la myoglobine ne sont pas totalement élucidés. Il a été rapporté que l'efficacité de la metmyoglobine en tant qu'initiateur de peroxydation est significativement plus élevée à pH acide, ce qui correspond typiquement aux conditions rencontrées dans l'estomac et dans la viande [25, 29, 30]. La présence de peroxyde d'hydrogène ou d'hydroperoxydes lipidiques est aussi un paramètre crucial dans l'activité initiatrice de peroxydation des protéines héminiques [25, 31-33].

Au pH de la viande (pH 5-6), la metmyoglobine, l'oxymyoglobine (en présence de traces d'hydroperoxydes lipidiques) et la ferrylmyoglobine (préformée par traitement par H_2O_2) sont des

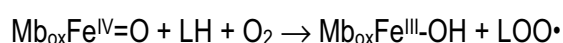
initiateurs puissants de la peroxydation lipidique. En revanche, à pH acide, l'espèce intermédiaire perferrylmyoglobine ($Mb\cdot Fe^{IV}=O$, formée *in situ* par traitement par H_2O_2) évolue rapidement par formation d'une liaison entre l'hème et la globine conduisant ainsi à un pigment vert dépourvu d'activité catalytique [33]. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une autre étude dans laquelle il a été observé qu'une myoglobine mutante dépourvue de résidus tyrosine (porteurs du radical dans la perferrylmyoglobine native) est aussi efficace que la myoglobine native dans l'initiation de la peroxydation lipidique, excluant ainsi la possibilité d'une peroxydation induite par le radical protéique [31].

Dans des émulsions neutres, la peroxydation de l'acide linoléique ne se déroule rapidement qu'à des forts rapports molaires acide linoléique/ $MbFe^{III}$ (≥ 200) et après une phase de latence relativement longue. Au vu de la diminution de la bande de Soret ($\lambda_{max} = 410$ nm, caractéristique de l'hème), il est suggéré que des changements de conformation ont lieu sur la protéine suite à la liaison de l'acide gras (sous forme carboxylate) à la protéine. Cette dénaturation renforcerait l'exposition de l'acide linoléique au centre fer-oxo de la ferrylmyoglobine [32].

En l'absence de H_2O_2 , la peroxydation induite par $MbFe^{III}$ débute par la liaison au centre métallique de traces d'hydroperoxydes lipidiques indispensables à l'amorçage suivie de la coupure homo- ou hétérolytique de la liaison O-O :



La réaction s'accompagne d'une dégradation notable de l'hème comme le montre le déclin rapide de la bande de Soret. Ce phénomène pourrait impliquer aussi bien le radical oxyl $LO\cdot$ formé dans la voie homolytique que le radical-cation de la porphyrine formé dans la voie hétérolytique [34]. Il y a donc formation d'une forme dégradée (et incomplètement élucidée) de ferrylmyoglobine notée $Mb_{ox}Fe^{IV}=O$ essentiellement dépourvue d'absorption dans le domaine 500-600 nm mais qui demeure un initiateur efficace de la réaction selon le processus suivant :



A pH 4, il y a dissociation de la globine et du cofacteur hématine. La peroxydation initiée par l'hématine est elle-même très efficace mais conduit à une dégradation plus rapide de l'hème. Elle est donc rapidement relayée par un processus initié par le fer non héminique [35].

I.3 Conclusion

La peroxydation lipidique et son inhibition dans les systèmes émulsionnés dépendent donc de nombreux facteurs comme le pH, la nature de l'interface, la polarité des antioxydants et le type d'initiateur de peroxydation lipidique. Face à la complexité des phénomènes mis en jeu, les mécanismes d'oxydation/inhibition sont donc difficiles à prévoir. Dans notre étude, visant à modéliser le bol alimentaire au sein du compartiment gastrique, la phase aqueuse sera testée à deux pH différents (5,8 et 4) et les interfaces seront composées soit de SAB, soit de PL. Ainsi, ces différents modèles devraient nous permettre de tirer des conclusions générales sur le « stress oxydant » lié à l'ingestion de différents types d'aliments (riches en protéines ou en phospholipides).

La metmyoglobine, abondante dans la viande rouge, apparaît être un initiateur de peroxydation lipidique efficace, particulièrement active dans des conditions faiblement acides (pH 4-6) après activation préalable par des hydroperoxydes. Pour toutes ces raisons, il est pertinent de l'introduire dans nos modèles de bol alimentaire. Son activité sera comparée à celle d'autres initiateurs de peroxydation pouvant provenir des aliments. L'hématine, son homologue débarrassé de la chaîne protéique, ainsi que l'ion Fe^{2+} et le système Fe^{3+} /acide ascorbique seront notamment introduits dans les modèles.

Enfin la quercétine, la rutine, l'acide caféique, l'acide chlorogénique, la (+)-catéchine et l' α -tocophérol, abondants dans les aliments et représentatifs des principales catégories de polyphénols ainsi que la vitamine C seront testés, individuellement ou en mélange pour leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique au cours du temps. Leur stabilité sera également évaluée dans les modèles au cours du temps.

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Produits chimiques

a) Initiateurs de peroxydation lipidique

La metmyoglobine de cœur de cheval (M1882-type II, PM = 17600 Da), l'hématine porcine (hydroxyprotoporphyrine IX, qualité H-3281, PM = 633.5 g.mol⁻¹) et le nitrate de fer (III) nonahydrate (Fe(NO₃)₃. 9 H₂O, PM = 404 g.mol⁻¹) ont été fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Le sulfate de fer (II) heptahydrate (FeSO₄. 7 H₂O, PM = 278 g.mol⁻¹) provient de chez Fluka (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

b) Les antioxydants

La quercétine (dihydrate, PM = 338,3 g.mol⁻¹, 98%), la rutine (monohydrate, PM = 610,52 g.mol⁻¹, 95%), l'acide caféique (PM = 180,16 g.mol⁻¹, 98%), l'acide chlorogénique (PM = 354,31 g.mol⁻¹, 95%), la (+)-catéchine (hydrate, PM = 290,27 g.mol⁻¹, 98%), l' α -tocopherol (PM = 430,72 g.mol⁻¹, 96%), l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (PM = 154,12 g.mol⁻¹, 98%) et l'acide L-ascorbique (PM = 176,12 g.mol⁻¹, 99%) proviennent tous de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Le produit d'oxydation de type benzofuranone est obtenu par oxydation au cuivre de la quercétine en milieu acide, d'après le protocole de Jungbluth *et al.* [36]. Ce produit a été synthétisé par Michèle Loonis (Equipe Chimie des antioxydants, Unité SQPOV, INRA Avignon) avec un rendement de 54 %.

c) Autres

Tous les solvants utilisés sont de qualité analytique (>99,4%). Le DMSO (diméthylsulfoxyde) a été fourni par Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). L'isopropanol ((CH₃)₂CHOH), le n-pentane (CH₃(CH₂)₃CH₃), l'acétonitrile (CH₃CN), le méthanol (CH₃OH) et l'éther de pétrole proviennent de chez Fisher Scientific Bioblock (Illkirch, France). L'acétone et l'éther tert-butylméthylique proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

Le formiate d'ammonium, NH₄COOH (99,995 %), le oct-1-èn-3-ol (98 %), l'hexanal (97 %), le pentanal (97 %), le hept-2-ènal-(E) (98 %) et le oct-2-ènal-(E) (97 %) proviennent de chez Sigma

Aldrich (St Louis, MO, USA). Le sulfate de sodium anhydre, Na₂SO₄ (99 %) provient de chez Fluka (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). L'acide formique (98-100 %) est fourni par Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acide orthophosphorique (85 %) provient de chez Prolabo (Fontenay sous Bois, France).

L'eau de qualité milliQ a été obtenue à l'aide d'un système Millipore® QPak 2 (Millipore Corporation, Bedford, USA).

II.1.2 Equipements

a) Spectres d'absorption

Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre à barrettes de diode Hewlett-Packard 8453, équipé avec une cellule en quartz (longueur du trajet optique : 1 cm). La température dans la cuve est maintenue à 25°C à l'aide d'un bain à thermostat. L'agitation magnétique dans la cellule est réglée à une vitesse constante (1400 tr/min) à l'aide d'un agitateur Variomag (Telemodul 20C)

b) Analyse des composés volatils par CPG-SM

Les produits d'oxydation secondaires ont été analysés en chromatographie gazeuse couplée à une détection de masse, CPG-SM (GC QP 20120, Shimadzu, équipé d'un liner de 0,75-mm de diamètre interne). L'extraction est réalisée par SPME (Solid Phase Microextraction) à l'aide d'une fibre recouverte de carboxen/polydiméthylsiloxane (PDMS) (10 mm long, épaisseur du film 75 µm, Supelco).. Les volatils sont séparés sur une colonne capillaire en silice CP-Sil 8 CB (longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur du film 0,5 µm, Varian).

Les spectres de masse sont analysés par comparaison à la bibliothèque de données (NIST library, v.2.0).

c) Analyse des antioxydants et de la phase lipidique par CLHP-UV-SM

Les analyses en CLHP-UV ont été menées à l'aide d'un chromatographe HP 1100 de Hewlett-Packard couplé à un détecteur spectrophotométrique à barrettes de diodes (190-950 nm). La colonne utilisée est une colonne Alltima silice greffée C18 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm) placée dans un compartiment thermostaté à 35 °C et munie d'une colonne de garde. La phase mobile dépend du type d'analyse réalisée (II.2 Méthodes).

Les analyses en CLHP-SM ont été effectuées sur un modèle HP 1050 de Hewlett-Packard couplé à un détecteur à barrettes de diodes et à un spectrophotomètre de masse Micromass LCZ 4000. Les caractéristiques des colonnes utilisées (C18 et C30) ainsi que les phases mobiles sont décrites dans la partie II.2 Méthodes. Le programme Masslynx a été utilisé pour l'analyse des données.

II.2 Méthodes

II.2.1 Mesure de l'oxydation dans les modèles du bol alimentaire

a) Mesure de la formation des composés d'oxydation primaire de structure diénique

➤ Initiation de la peroxydation lipidique par la metmyoglobine MbFe^{III}

Le protocole de réalisation des émulsions est détaillé dans le chapitre 1. Pour rappel, la peroxydation lipidique est initiée immédiatement après émulsification par ajout de environ 1 mL d'une solution concentrée de metmyoglobine (MbFe^{III}) préalablement dissoute dans un tampon aqueux (pH 5,8 ou pH 4). La concentration finale de MbFe^{III} est de 20 μ M et le volume total de l'émulsion est de 10 mL. Les émulsions sont ensuite placées à 37°C sous agitation par barreau aimanté, à la pression atmosphérique dans une étuve où l'air est régulièrement renouvelé.

Des prélèvements (0,2 mL) sont effectués toutes les heures, pendant 8 heures et dilués dans 3,8 mL d'isopropanol (dilution au 1/20). Après une centrifugation à 5600 tr.min⁻¹ à 5°C pendant 4 minutes, 0,2 mL de surnageant sont ajoutés à 1,8 mL d'isopropanol directement dans la cuve en quartz (dilution au 1/10). Le spectre UV du mélange est acquis et l'absorbance à 233 nm est relevée. Au cours de l'expérience, ce volume peut être réduit à 0,1 mL de surnageant dans 1,9 mL d'isopropanol (dilution au 1/20) pour obtenir une valeur d'absorbance à 233 nm inférieure à 2 (valeur limite de la linéarité pour l'application de la loi de Beer-Lambert). Dans le cas du modèle-PL, la centrifugation n'est pas nécessaire. La concentration en diènes conjugués est obtenue en utilisant le coefficient d'extinction molaire des hydroperoxydes d'acide linoléique dans l'isopropanol ($\epsilon = 27000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [37]) et en corrigeant par la dilution totale effectuée (1/200 ou 1/400).

Le rôle de la MbFe^{III} en tant qu'initiateur de peroxydation a été vérifié. Pour cela, le volume de metmyoglobine a été remplacé par un volume équivalent de tampon aqueux. L'autooxydation des modèles (absence de MbFe^{III}) est comparée à l'oxydation initiée par la MbFe^{III} durant 8 heures.

➤ **Inhibition de la peroxydation lipidique initiée par la MbFe^{III}**

L'inhibition de la peroxydation lipidique est testée en ajoutant aux modèles, immédiatement après émulsification, un volume de 0,1 mL d'une solution mère de l'antioxydant. Les antioxydants sont ajoutés après émulsification afin d'éviter leur dégradation lors du traitement aux ultrasons. Les solutions mère de quercétine, rutine, acide caféique, acide chlorogénique, (+)-catéchine et d' α -tocophérol sont préparées dans un mélange d'acétonitrile/DMSO (4 :1 v/v). Ainsi la concentration finale en DMSO n'excède jamais 0,2 %. La solution mère de vitamine C est préparée dans l'eau purifiée. Les concentrations des solutions mère sont cent fois plus concentrées que la concentration finale souhaitée (Tableau-II-1). L'expérience démarre après ajout de 1 mL de MbFe^{III} à 200 μ M. L'absorbance à 233 nm est mesurée toutes les heures, comme précédemment.

Le Tableau-II-1 récapitule l'ensemble des expériences réalisées (nombre de répétitions, pH, concentrations) pour les deux modèles.

Tableau-II-1. Récapitulatif des essais menés en présence de MbFe^{III} dans les deux modèles (SAB et PL).

	pH 5,8 ^a							pH 4			
[μ M]	Quer ^b	Rut	Caf	Chlo	Caté	Toco	VitC	Quer	Rut	Chlo	vitC
200 ^c	2 ^d	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
50	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
25	2	3	2	2	2	2	-	2	2	2	-
10	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
5	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	6							5			

^a pH de la phase aqueuse

^b antioxydant testé Quer : quercétine, Rut : rutine, Caf : acide caféique, Chlo : acide chlorogénique, Toco : α -tocophérol, VitC : vitamine C

^c concentration de l'antioxydant en μ M

^d nombre de répétitions

Pour chaque antioxydant à la concentration de 100 μ M, l'aire sous la courbe $\Delta A_{233 \text{ nm corrigée}}$ versus *temps* est intégrée et comparée à celle du témoin (méthode d'intégration détaillée dans l'Annexe1).

$$\Delta A_{233 \text{ nm corrigée}} = [A_{233 \text{ nm corrigée}}(t) - A_{233 \text{ nm corrigée}}(t_0)] \times \text{dilution (200 ou 400)}$$

L'absorbance mesurée à t_0 étant légèrement fluctuante d'une émulsion à une autre, nous avons choisi de raisonner en Δ , en soustrayant l'absorbance initiale à l'absorbance des autres temps.

A partir des aires obtenues, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur est réalisée pour déterminer l'effet des antioxydants sur la formation des diènes conjugués. Si un effet significatif est obtenu (intervalle de confiance de 95%), l'ANOVA est suivie du test post-hoc de Tukey-Kramer HSD afin de discriminer les antioxydants entre eux. Les analyses ont été effectuées avec XLStat, version 2008.3.02 (Addinsoft SARL).

Après ceci, certains composés ont aussi été testés en mélange, uniquement dans le modèle-SAB à pH 5,8.

Trois combinaisons différentes ont été testées :

- Quercétine (50 μ M) + Vitamine C (50 μ M) (x 3)
- Quercétine (50 μ M) + α -tocophérol (50 μ M) (x 3)
- Quercétine (25 μ M) + Rutine (25 μ M) + Acide chlorogénique (25 μ M) + (+)-Catéchine (25 μ M) (x 3)

➤ **Initiation de la peroxydation lipidique par d'autres initiateurs : impact de la quercétine**

D'autres initiateurs de peroxydation ont été testés dans le modèle-SAB et dans le modèle-PL au pH 5,8. Il s'agit de l'hématine, du sulfate de fer (FeII) et du nitrate de fer (FeIII) associé à l'acide ascorbique (1:1). Pour ces essais, la solution d'hématine est préparée dans un mélange MeOH/DMSO (50 : 50 v/v) à une concentration de 2 mM, de sorte qu'un volume de 0,1 mL soit ajouté à l'émulsion (qsp 10 mL). L'hématine est testée également à pH 4. Les solutions mère des deux espèces de fer et de l'acide ascorbique sont préparées dans de l'eau purifiée à la concentration de 200 μ M. Comme pour la metmyoglobine, la concentration finale de chacune des espèces pro-oxydantes est de 20 μ M. L'effet de la quercétine est observé à des concentrations de 100 et 25 μ M. Le suivi de la peroxydation lipidique se fait selon la méthode décrite ci-dessus pour la MbFe^{III}. Les expériences sont réalisées en duplicata.

b) Mesure de la formation des composés d'oxydation secondaire volatils

La formation des produits d'oxydation secondaires, issus de la décomposition des hydroperoxydes, constitue un second marqueur d'oxydation. Ainsi, l'hexanal, le pentanal, le oct-1-èn-3-ol, le hept-2-ènal et le oct-2-ènal ont été analysés dans l'espace de tête des modèles à pH 5,8 par CPG-SM-SPME. Toutes les heures, une fibre recouverte d'un polymère spécifique (carboxen/polydiméthylsiloxane) est introduite directement dans l'espace de tête des ballons contenant le milieu réactionnel pendant 10 minutes à 37°C. La fibre est alors transférée au port d'injection du CPG-SM, maintenu à 250°C pour une désorption de 3 min avec un ratio de split de 15. L'hélium est

utilisé comme gaz vecteur avec une vitesse de 35 cm.s⁻¹. Les volatils sont séparés sur une colonne CP-Sil 8 CB. Le programme de températures est le suivant : température initiale : 40°C maintenue pendant 2 min suivi d'un gradient de 10°C min⁻¹ jusqu'à 240°C.

Les spectres sont enregistrés en mode scan de m/z = 29 à 250 à une vitesse de 2 scan s⁻¹ en impact électronique à 70 eV. La température de la source d'ion et de la ligne de transfert sont de 200°C et 240°C respectivement. Ces analyses ont été effectuées en triplicata, en absence ou en présence de quercétine (25 et 100 µM). L'identification est effectuée en comparant les spectres de masse des composés avec la bibliothèque spectrale NIST (National Institute of Standards and Technology, Finnigan Corp, San Jose, CA).

Afin de pouvoir quantifier les composés détectés, une calibration a été entreprise. Les cinq composés volatils purs ont été dissous dans une huile de tournesol non aromatisée (huile de tournesol native) à des concentrations de 960 mg/kg d'huile pour l'hexanal, 110 mg/kg d'huile pour le pentanal, 240 mg/kg d'huile pour le hept-2-èneal, 340 mg/kg pour l'oct-1-ène-3-ol et 27 mg/kg pour le oct-2-èneal, dans un flacon clos avec un faible volume d'espace de tête. Cette huile aromatisée mère a alors été diluée par une huile non aromatisée au 1/10, 1/50, 1/100 et 1/250. Des émulsions, stabilisées soit par la SAB, soit par les PL, ont alors été réalisées à partir de ces différentes huiles selon le protocole d'émulsification en deux étapes. L'analyse de l'espace de tête a été effectuée en double sur chacune des émulsions, après 45 minutes d'équilibre minimum à 37°C. Les conditions analytiques correspondent à celles décrites au préalable.

II.2.2 Analyse de la phase lipidique oxydée par CLHP-SM

L'analyse des triglycérides oxydés de l'huile a été effectuée par CLHP-SM. Une émulsion stabilisée par la SAB à pH 5,8 est réalisée. L'oxydation est initiée par la MbFe^{III} comme précédemment décrit. Un prélèvement de 0,2 mL d'émulsion est effectué toutes les 4 heures (t = 0, t = 4 h et t = 8 h) et dilué au 1/20 dans 3,8 mL d'isopropanol. Après centrifugation à 10000 tr.min⁻¹, le surnageant est congelé à -20 °C jusqu'à l'injection en CLHP-SM.

La colonne utilisée est une colonne YMC-Pack, phase inverse C30 (taille des particules 3 µm, 250 mm x 4,6 mm, YMC Inc., Wilmington, NC) placée dans un compartiment thermostaté à 30°C et munie d'une colonne de garde. Les solvants constituant la phase mobile sont les suivants :

Formiate d'ammonium 25 mM dans de l'eau : A

Formiate d'ammonium 25 mM dans du méthanol : B

MTBE (éther tert-butylméthylique) : C

Le gradient d'éluion est présenté dans le Tableau-II-2. Le débit est de 1 mL/min. et le volume d'extrait injecté est de 5 µL. Les analyses ont été réalisées selon le mode d'ionisation positif (ESP+) et les tensions de cônes utilisées étaient de 17 et 32 V.

Tableau-II-2. Gradient d'éluion utilisé pour l'analyse de l'huile oxydée.

Temps (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	20	70	10
5	20	70	10
65	4	11	85
65,1	0	100	0
67	0	100	0
67,1	20	70	10
75	20	70	10

II.2.3 Dégradation oxydante des composés phénoliques et de la vitamine C

➤ **Les composés phénoliques**

Pour les composés phénoliques, parallèlement à la mesure d'absorbance à 233 nm, 0,2 mL d'émulsion (pH 5,8) sont prélevés toutes les heures et dilués au 1/3 dans 0,4 mL d'isopropanol. Après centrifugation (2 minutes à 10000 tr.min⁻¹), le surnageant est prélevé, transféré dans un flacon et congelé à -20°C. Dix µL sont analysés, 48 heures après environ, par CLHP-UV à l'aide du chromatographe HP-1100, couplé à un détecteur spectrophotométrique à barrettes de diodes. La colonne C18 est placée dans un compartiment thermostaté à 35°C. La phase mobile est constituée d'un gradient linéaire d'acide formique en solution aqueuse à 0,05% et d'acétonitrile (B) avec un débit de 1mL/min. Les gradients pour chaque composé sont présentés dans le Tableau-II-3.

Tableau-II-3. Gradients CLHP utilisés pour le suivi de dégradation des composés phénoliques.

Quercétine		Rutine		(+)-Catéchine		Acide caféique		Acide chlorogénique	
T (min)	B (%)	T (min)	B (%)	T (min)	B (%)	T (min)	B (%)	T (min)	B (%)
0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
15	60	15	35	20	60	30	100	15	20
20	100	25	100	25	100			25	100
23	100								

Pour l' α -tocophérol, le gradient utilisé est un gradient isocratique de méthanol (100 %) durant 15 minutes, dans une colonne thermostatée à 25°C. Les caractéristiques, la colonne et le volume injecté sont comme ci-dessus.

La dégradation des composés phénoliques a été suivie par la détection des pics correspondants à 365 nm pour la quercétine et la rutine, à 280 nm pour la (+)-catéchine, à 293 nm pour l' α -tocophérol et à 330 nm pour l'acide caféique et l'acide chlorogénique. La conversion de l'aire des pics en concentration a été effectuée à l'aide des gammes étalons de chaque composé. Dans tous les cas, la formation parallèle de composés d'oxydation a été enregistrée à 280 nm.

L'étude CLHP-SM a ensuite été entreprise pour identifier les composés néoformés. Les données de masse sont obtenues grâce à l'utilisation d'un spectromètre de masse Micromass Lynx. Les analyses ont été réalisées selon le mode d'ionisation négatif (ESP-) et les tensions de cône utilisées ont été de 25 et 50 V. La colonne et le gradient utilisés sont strictement les mêmes qu'en CLHP-UV.

➤ **La vitamine C**

Du fait de sa dégradation très rapide, le suivi de dégradation de la vitamine C n'est pas réalisé sur les mêmes émulsions que celles utilisées pour le suivi de la peroxydation. Une nouvelle série d'émulsions à pH 5,8 (2 modèles-SAB, 2 modèles-PL) est réalisée spécialement pour cette étude.

L'extraction de la vitamine C est réalisée toutes les 10 minutes après l'ajout de $MbFe^{III}$ dans l'émulsion. Un prélèvement de 250 μ L d'émulsion est dilué dans 750 μ L d'une solution d'acide phosphorique (H_3PO_4) à 2%. Après 5 minutes de centrifugation à 10000 $tr.min^{-1}$ pour séparer les phases, la phase aqueuse contenant la vitamine C est prélevée à l'aide d'une seringue puis filtrée (0,45 μ m) avant d'être immédiatement injectée en CLHP-UV (HP-1100).

La colonne employée est la colonne Alltima C18, préalablement utilisée. Elle est également munie d'une colonne de garde et placée dans un compartiment thermostaté à 35°C. La phase mobile est constituée d'un gradient linéaire d'acide formique en solution aqueuse à 0,05% et de méthanol (B) avec un débit de 1mL/min. Le gradient est présenté dans le Tableau-II-4.

La dégradation de la vitamine C est suivie par la détection des pics correspondants à 254 nm. Aucune analyse de masse n'a été entreprise pour ce composé.

Tableau-II-4. Gradient CLHP utilisé pour le suivi de dégradation de la vitamine C.

Vitamine C	
T (min)	B (%)
0	5
3	8
6	5

II.2.4 Extraction des caroténoïdes issus des PL utilisés comme émulsifiants

L'extraction des caroténoïdes des phospholipides (PL) est adaptée d'un protocole d'extraction de caroténoïdes de la tomate mis au point dans l'équipe par Céline Chanforan. Il est effectué en triplicata.

Une aliquote de PL de 1 g est prélevée dans un flacon en verre brun. Deux mL d'eau et 13 mL de solvants (acétone/éther de pétrole (40/60)) sont ajoutés aux PL et l'ensemble est homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur (Ultra-Turrax) à 9500 tr.min⁻¹ pendant une minute. La tige de l'homogénéisateur est rincée à l'aide de 5 mL de solvants. Le mélange est filtré sur coton de verre. L'extraction du solide résiduel est alors réalisée deux fois, sous agitation magnétique, à l'aide de 2 x 20 mL de solvant (agitation de 5 minutes). Les trois filtrats sont récupérés dans une ampoule à décanter et lavés avec 20 mL d'eau purifiée. La phase éther de pétrole est prélevée dans une fiole jaugée et complétée à 25 mL par de l'éther de pétrole. Du sulfate de sodium anhydre est ajouté jusqu'à élimination de l'eau résiduelle. Avant injection, 5 mL de cette solution sont concentrés à l'évaporateur rotatif puis l'extrait sec est repris dans 0,5 mL d'éther de pétrole.

L'extrait obtenu est analysé par CLHP-SM. L'appareil, la colonne C30 utilisée, les solvants constituant la phase mobile et les conditions d'analyse de masse (voltages de cones) sont les mêmes que ceux utilisés pour l'analyse des lipides oxydés (II.2.2). Seul le gradient est modifié (Tableau-II-5).

La quantification du β -carotène se fait à 450 nm d'après des gammes de calibration réalisées dans l'équipe avec du (E)- β -carotène pur commercialisé par Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Tableau-II-5. Gradient d'éluion utilisé pour l'analyse des caroténoïdes.

Temps (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	40	60	0
5	40	60	0
10	30	70	0
15	25	70	5
20	20	70	10
60	4	11	85
70	4	11	85
70,1	0	100	0
72	0	100	0
72,1	40	60	0
80	40	60	0

III. Résultats et discussion

III. 1 Peroxydation lipidique dans les modèles : dosage des composés d'oxydation primaire

III.1.1 Initiation de la peroxydation lipidique par la metmyoglobine

La peroxydation lipidique dans les modèles (SAB ou PL) est initiée immédiatement après l'émulsification par l'ajout de 20 μM de MbFe^{III} . Les triglycérides de l'huile comprennent des acides gras saturés, mono- et polyinsaturés non conjugués qui absorbent à 210 nm. Leur oxydation génère des hydroperoxydes et alcools dans lesquels les doubles liaisons sont conjuguées (diènes conjugués) et qui absorbent à 233 nm (Figure-II-4).

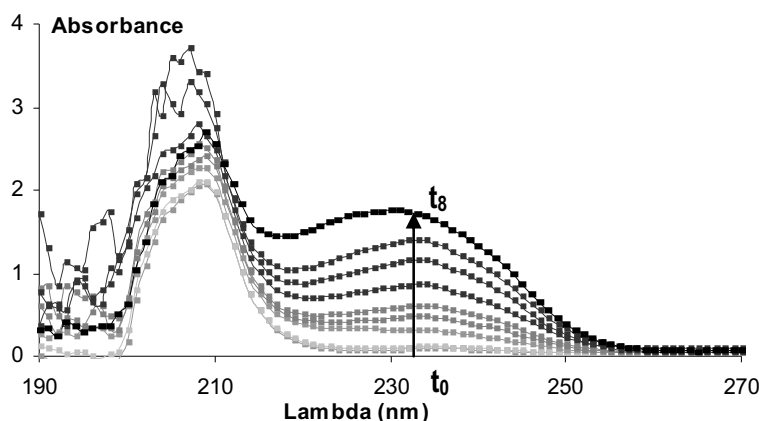


Figure-II-4. Augmentation de la bande d'absorption à 233 nm, caractéristique des diènes conjugués au cours des huit heures de peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} . $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$, $T=37^\circ\text{C}$.

a) Impact de la metmyoglobine sur la peroxydation lipidique

Afin de mettre en évidence l'influence de MbFe^{III} sur la peroxydation lipidique, une des expériences a été réalisée sans ajout de MbFe^{III} . Le comparatif des cinétiques de peroxydation avec et sans MbFe^{III} est représenté en Figure-II-5, pour les deux modèles à pH 5,8.

En l'absence de MbFe^{III} (autoxydation dite 'spontanée'), les vitesses de peroxydation lipidique sont très faibles. Elles sont estimées à 0,21 ($\pm 0,04$) mM/h et à 0,42 ($\pm 0,05$) mM/h pour le modèle-SAB et pour le modèle-PL respectivement. L'accumulation des diènes conjugués est de 1,3 ($\pm 0,4$) mM dans le modèle-SAB et de 3,30 ($\pm 0,05$) mM dans le modèle-PL après 8 heures de peroxydation lipidique à 37°C. En estimant que l'huile de tournesol contient initialement 66% d'acide linoléique, acide gras

polyinsaturé majoritaire, sa concentration initiale dans l'émulsion est 225 mM environ. L'autoxydation spontanée sur 8 heures conduit à une dégradation de 1,5 % des acides gras peroxydables dans le modèle-PL et 0,6 % dans le modèle-SAB.

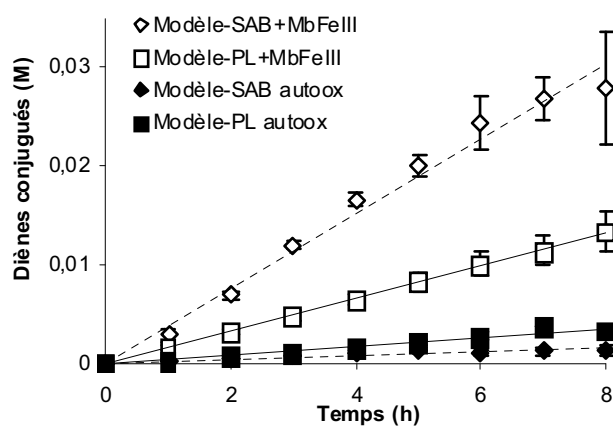


Figure-II-5. Accumulation des diènes conjugués lors de l'autoxydation spontanée à 37°C d'émulsions stabilisées soit par la SAB, soit par les PL (pH 5,8). Comparaison avec la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III}. [MbFe^{III}] = 20 µM, T=37 °C. n=3.

En revanche, en présence de MbFe^{III}, la vitesse d'oxydation est beaucoup plus élevée. L'accumulation des diènes conjuguée dans le temps est quasi-linéaire avec des différences en fonction du type d'émulsifiant utilisé. Ainsi, dans le modèle-SAB, la vitesse de peroxydation en présence de MbFe^{III} est multipliée par 20 ($3,8 \pm 0,3$ mM/h), amenant à 12,4 % le taux d'oxydation des acides gras au bout de 8h. Dans le modèle-PL, l'accélération est moins spectaculaire mais la vitesse de peroxydation ($1,7 \pm 0,2$ mM/h) est tout de même multipliée par un facteur 4 d'où un taux de peroxydation lipidique d'environ 6 % après 8h.

La metmyoglobine (MbFe^{III}) confirme donc qu'elle est un excellent initiateur de la peroxydation lipidique dans les émulsions faiblement acides. Son action semble être immédiate, sans phase de latence, et peut être expliquée par la présence d'hydroperoxydes résiduels dans l'huile. En effet, la valeur initiale de l'absorbance à 233 nm dans l'émulsion n'est jamais nulle; elle atteint en moyenne 0,2, ce qui correspond à une concentration initiale de 1,5 mM de diènes conjugués. Malgré les précautions prises, le traitement aux ultrasons de l'émulsion pourrait entraîner une légère oxydation des lipides et contribuer ainsi au taux initial d'hydroperoxydes lipidiques.

b) Influence de la nature de l'interface

La nature de l'interface semble aussi avoir une influence marquée sur l'activité de MbFe^{III}. En effet, la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} est plus rapide dans le modèle-SAB que dans le modèle-PL. Plusieurs hypothèses nous permettent d'expliquer ce phénomène. Tout d'abord, comme il est mentionné dans le chapitre 1, la surface d'échange entre la phase aqueuse et la phase lipidique est légèrement plus développée dans le modèle-SAB (**2,30 m²/g** d'huile) que dans le modèle-PL (**1,98 m²/g** d'huile). Elle permet ainsi un contact plus important entre les espèces pro-oxydantes de la phase aqueuse et les lipides. De plus, certains auteurs ont remarqué un pouvoir antioxydant des phospholipides dans la protection des huiles contre l'oxydation. Ces propriétés sont attribuées, soit à la chélation des ions métalliques pro-oxydants par les groupements phosphates [38], soit à l'action des phospholipides en tant que barrière au dioxygène. Dans le cas de la phosphatidyléthanolamine (PE), la formation d'imines entre la fonction amine primaire de la PE et les groupements aldéhydes issus de l'oxydation de TG entraînerait la formation de dérivés pyrroles lipophiles possédant des propriétés antioxydantes [39, 40].

La couleur des PL que nous utilisons (pâte orangée) nous a amenés à nous demander si les phospholipides utilisés contenaient des caroténoïdes, ce qui pourrait être une autre explication aux phénomènes observés. Nous avons donc entrepris leur extraction et leur dosage. Le β -carotène a pu être identifié par analyse CLHP en comparant son temps de rétention et son spectre UV-visible à celui d'un standard commercial. Sa concentration est évaluée à 15 $\mu\text{g/g}$ de PL soit 28 nmol/g de PL. Pour élaborer le modèle-PL, 208 mg de PL sont pesés pour un volume d'émulsion de 10 mL. La concentration de β -carotène dans nos modèles serait donc de 0,59 μM . Cette valeur faible ne peut expliquer à elle seule le pouvoir antioxydant des phospholipides utilisés. Des traces de lutéine et de zéaxanthine pourraient aussi être présentes dans les échantillons analysés.

c) Influence du pH

La peroxydation lipidique induite par MbFe^{III} a aussi été évaluée dans des modèles dont la phase aqueuse était constituée d'un tampon acétate à pH 4. Ces expériences ont pour but de simuler un état plus avancé de la digestion du bol alimentaire dans le compartiment gastrique. Les cinétiques de peroxydation lipidique sont représentées en Figure-II-6.

Dans le modèle-SAB, à pH 4, la peroxydation lipidique démarre plus rapidement qu'à pH 5,8. A t = 6 heures, elle atteint un plateau correspondant à une concentration de diènes conjugués d'environ

0,025 (\pm 0,002) M. Cette concentration est proche de la concentration maximale de diènes conjugués formés en 8 heures à pH 5,8. Le plateau pourrait correspondre à une compensation entre la vitesse de formation des diènes conjugués et leur vitesse de dégradation en produits d'oxydation secondaire. Elle pourrait aussi traduire la dégradation de l'hème avec relargage de fer non hémique dans le milieu d'où une vitesse de peroxydation beaucoup plus faible. Ces observations sont conformes aux résultats obtenus dans l'équipe avec des systèmes plus simples (micelles d'acide linoléique et Tween 20) [35].

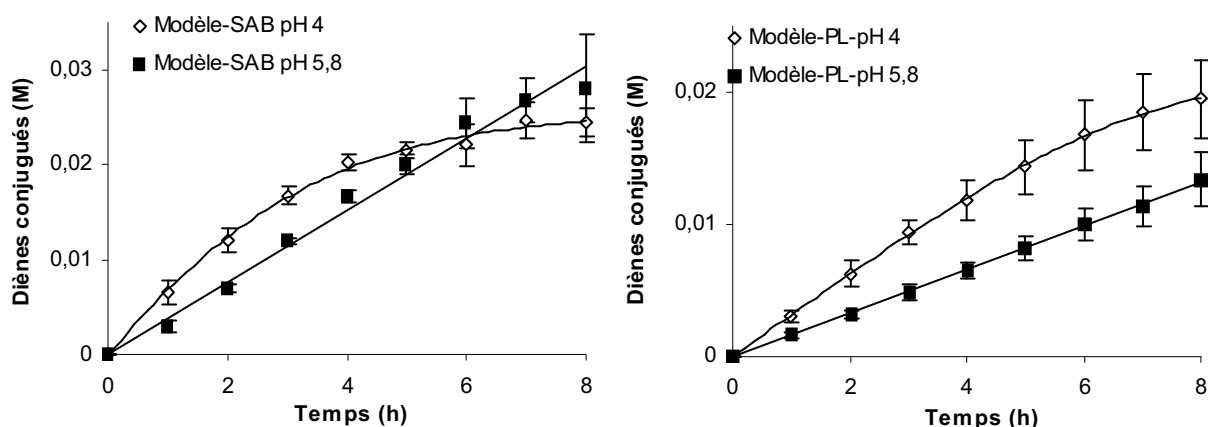


Figure-II-6. Influence du pH sur les cinétiques d'accumulation des diènes conjugués dans les deux modèles. $[MbFe^{III}] = 20 \mu M$, $T = 37^{\circ}C$.

Dans le modèle-PL, une augmentation considérable de la vitesse de peroxydation lipidique est également observée suite à la baisse de pH. L'accumulation des diènes conjugués est d'abord quasi-linéaire avec un ralentissement à partir de $t = 6$ heures comme si le plateau observé dans le modèle-SAB se dessinait progressivement. A $t = 8$ heures, la concentration de diènes conjugués est de 0,020 (\pm 0,003) M, c'est-à-dire légèrement inférieure à la concentration de 0,025 M observée dans le modèle-SAB.

L'allure de la cinétique observée à pH 4, particulièrement dans le cas du modèle-SAB, correspond vraisemblablement à un processus de peroxydation lipidique induit par l'hématine. Ce type de cinétique est caractérisé par un démarrage très rapide, puis par la mise en place d'un phénomène de saturation dans une seconde période [34]. D'autres études ont aussi observé que la différence d'activité entre hématine et $MbFe^{III}$, très marquée à pH physiologique (pH 7,4), diminuait significativement à pH acide (pH 4,8) [41]. Ce résultat, suggère qu'à pH 4, $MbFe^{III}$ subit une dénaturation rapide qui conduirait au relargage du cofacteur dès le début de la cinétique. Le cofacteur, débarrassé de sa chaîne globine, permettrait un accès plus rapide au substrat [35].

III.1.2 Initiations de la peroxydation lipidique par d'autres composés à pH 5,8

a) Initiation par l'hématine

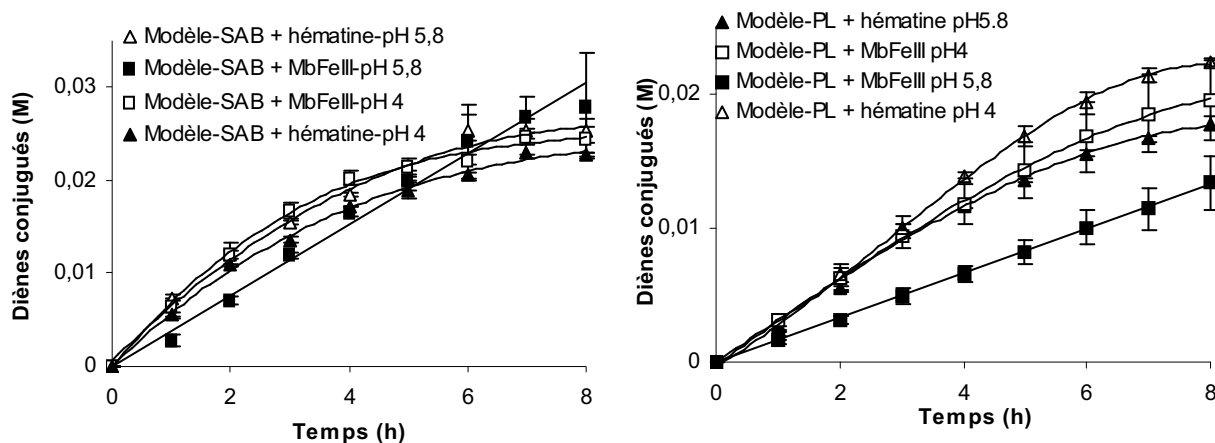


Figure-II- 7. Accumulation des diènes conjugués lors de la peroxydation lipidique initiée par l'hématine à pH 5,8 et à pH 4. Comparaison à l'initiation par la MbFe^{III} à pH 5,8 et à pH 4 dans les deux modèles. [Hématine] = [MbFe^{III}] = 20 μ M, T = 37°C.

La peroxydation a été amorcée par l'hématine dans les deux modèles pour visualiser l'effet du cofacteur débarrassé de la partie globine à pH 4 et à pH 5,8. Les cinétiques obtenues sont représentées en Figure-II-7 et comparées à celles obtenues avec MbFe^{III} à pH 4. Dans les deux modèles, l'allure des cinétiques d'oxydation initiée par l'hématine est en bonne adéquation avec celle initiée par MbFe^{III} à pH 4, validant ainsi l'hypothèse de la dissociation de MbFe^{III} en hématine et globine à pH 4 (relargage du cofacteur).

b) Initiation par le fer non héminique

Le fer non héminique a été introduit dans les modèles sous forme Fe^{II} ou Fe^{III} associé à l'acide ascorbique (rapport molaire 1:1). Dans les deux cas, l'initiation de la peroxydation lipidique apparaît bien moins efficace qu'avec MbFe^{III} (Figure-II-8) Un tel phénomène a déjà été observé par d'autres auteurs dans des émulsions stabilisées par le Tween 20 [42].

Les oxydations initiées par Fe^{II} et Fe^{III}/Asc sont quasiment identiques dans les deux modèles. Ce résultat met en évidence l'importance d'un agent réducteur, tel que l'acide ascorbique, qui peut générer des ions Fe^{II} à partir des ions Fe^{III} et permettre ainsi le clivage des hydroperoxydes LOOH en LO[•] selon la réaction de Fenton. Il a en effet été vérifié que Fe^{III} sans ascorbate n'est pas un bon initiateur de la peroxydation lipidique [42]. En revanche, l'utilisation de systèmes Fe^{III}/acide ascorbique

de fort rapport molaire (1:10) entraîne une peroxydation plus efficace que celle initiée par MbFe^{III} , ce qui suggère que l'efficacité moindre du fer non héminique observée dans notre étude est simplement due à une accumulation rapide de Fe^{III} relativement inerte faute de réducteur en concentration suffisante dans le milieu [29]. La peroxydation initiée par Fe^{II} ou $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Asc}$ est toujours plus rapide dans le modèle-SAB que dans le modèle-PL, comme cela était le cas pour la peroxydation initiée par la metmyoglobine.

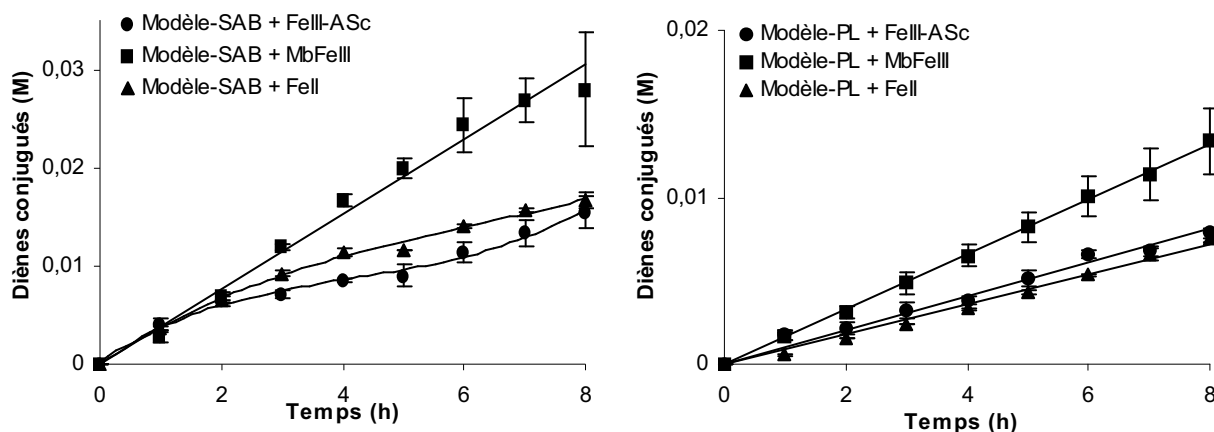


Figure-II-8. Accumulation des diènes conjugués lors de la peroxydation lipidique initiée par différentes formes de fer. Comparaison avec l'initiation par MbFe^{III} à pH 5,8 dans les deux modèles. $[\text{Fe}^{\text{II}}] = [\text{Fe}^{\text{III}}] = [\text{acide ascorbique}] = [\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

En résumé, à pH 5,8 l'initiateur de peroxydation lipidique le plus efficace dans les deux modèles d'émulsion est l'hématine, qui permet un démarrage de l'oxydation très rapide. Cet effet est attribué à l'exposition directe du fer héminique au substrat. Du fait de son caractère relativement hydrophobe, il est envisageable que le cofacteur soit localisé directement à l'interface des émulsions et interagisse étroitement avec la phase lipidique. En seconde position arrive la metmyoglobine. La globine entourant le cofacteur ne permet pas une initiation aussi rapide que pour l'hématine. Cependant, la metmyoglobine reste plus efficace que les différentes espèces de fer libre testées dans les modèles.

III.1.3 Composition de la phase lipidique avant et après oxydation

L'analyse par spectrométrie de masse des triglycérides (TG) extraits de la phase lipidique du modèle-SAB à pH 5,8 permet de distinguer deux massifs de pics, l'un correspondant aux TG oxydés (Tr = 28 à 38 min) l'autre aux TG natifs (Tr = 40 à 47 min) (Figure-II-9). D'après les valeurs de m/z, des hypothèses de structure ont été envisagées. Dans certains cas, plusieurs combinaisons sont possibles et l'identification reste hypothétique.

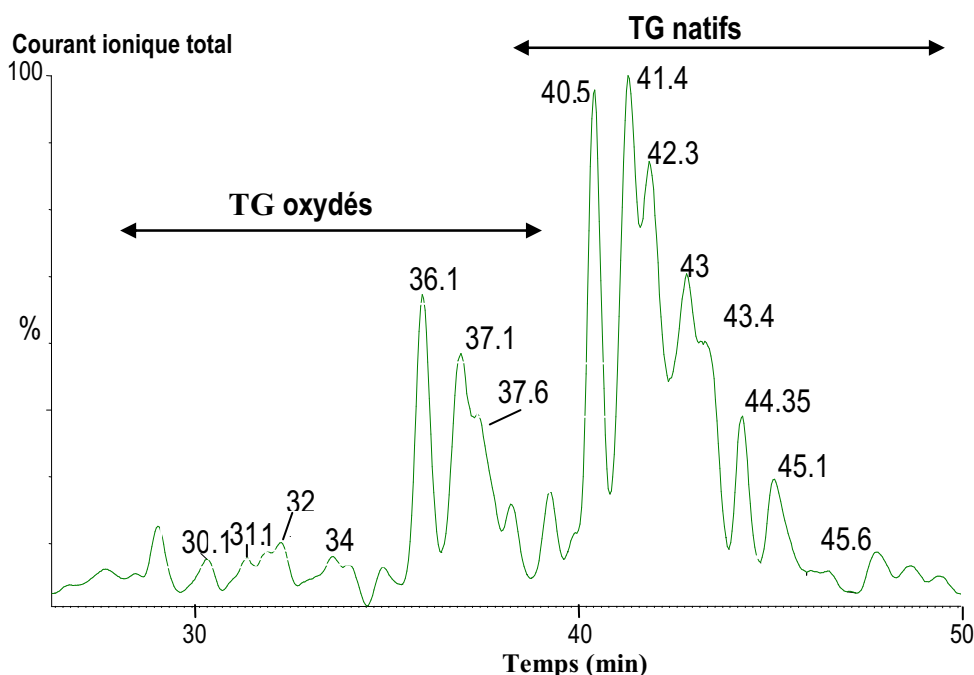


Figure-II-9. Chromatogramme CLHP-SM de la phase lipidique de l'émulsion, modèle-SAB, pH = 5,8, [MbFe^{III}] = 20 µM, T = 37°C, t = 3 h.

a) TG non oxydés

L'analyse des TG natifs est effectuée sur le prélèvement initial (t_0). Les pics principaux correspondent logiquement à la trilinoléine et à un triglycéride composé de deux résidus d'acide linoléique et d'un résidu d'acide oléique (Tableau-II-6). Pour rappel, l'acide linoléique (C18:2) et l'acide oléique (C18:1) représentent respectivement 62-70 % et 15-25 % des acides gras présents dans l'huile de tournesol alors que l'acide stéarique (C18:0) n'en représente que 4-6 %. Le fragment de masse obtenu à un voltage de 32V est attribué à une structure résultant de la perte d'un acide gras du triglycéride initial.

Tableau-II-6. Principaux pics associés aux TG natifs : PM, structures hypothétiques et pourcentage par rapport à l'ensemble des TG natifs.

T _r (min)	m/z (17 V)	m/z (32 V)	λ _{max} (nm)	PM (Da)	Structure proposée (Composition en AG sur le glycérol)	Aire (%)
40,5	880,2	600	208	879,5	(C_{18:2}) x 3 (Trilinoléine)	21,3
41,4	882,2	602	208	881,5	(C_{18:2}) x 2 + (C_{18:1})	13,5
42,3	884,3	604	208	883,5	(C_{18:2}) + (C_{18:1}) x 2 ou (C _{18:2}) x 2 + (C _{18:0})	24,4
43,0	886,3	604	206	885,4	(C_{18:1}) x 3 ou (C _{18:2}) + (C _{18:1}) + (C _{18:0})	12,2
	887,6	604	206	887,4	(C_{18:2}) + (C_{18:0}) x 2 ou (C _{18:1}) x 2 + (C _{18:0})	
43,4	860,3	578	208	859,4	(C_{18:1}) x 2 + (C_{16:0}) ou (C _{18:2}) + (C _{18:0}) + (C _{16:0})	17,4
	884,3		208	883,5	(C_{18:2}) + (C_{18:1}) x 2 ou (C _{18:2}) x 2 + (C _{18:0})	
44,4	886,3	602	208	885,4	(C_{18:2}) + (C_{18:1}) + (C_{18:0})	6,7
45,1	888,3	606	208	887,5	(C_{18:1}) x 2 + (C_{18:0})	3
		604	208	887,5	(C_{18:2}) + (C_{18:0}) x 2	
45,6	860,2	576	208	859,4	(C_{18:2}) + (C_{18:0}) + (C_{16:0})	1,5
		604	208	859,4	(C_{18:1}) x 2 + (C_{16:0})	

b) TG oxydés

L'analyse des TG oxydés est effectuée après 8 heures de réaction. Elle révèle principalement des produits issus de l'insertion de 2 à 5 atomes d'oxygène sur les triglycérides majoritaires tels que la trilinoléine et le triglycéride composé de deux acides linoléiques et d'un acide oléique (Tableau-II-7). La plupart d'entre eux présentent une bande d'absorption UV dans le domaine 230-234 nm caractéristique de l'absorption des structures diéniques. Les composés majoritairement formés correspondent à l'ajout de 2 atomes d'oxygène et pourraient être des monohydroperoxydes conjugués, produits primaires d'autoxydation. Il a aussi été montré que des bis-hydroperoxydes et des époxydes pouvaient également se former (Figure-II-10) [43]. Les composés pour lesquels nous observons l'introduction d'un nombre impair d'atomes d'oxygène (3 ou 5) pourraient donc comporter un motif époxy ou alcool en plus des motifs hydroperoxydes. Notons que l'époxydation entraîne la suppression du motif diénique et donc de l'absorption dans le domaine 230-234 nm.

Tableau-II-7. Principaux pics associés aux TG oxydés : PM, structures hypothétiques.

Tr (min)	m/z (17 V)	λ_{\max} (nm)	PM (Da)	Structure proposée (Composition en AG sur le glycérol)
30,1	960,2	206; 234	959,5	(C _{18:2}) x3 + 5 O
31,1	962,2	208	961,5	(C _{18:2}) x2 + (C _{18:1}) + 5 O
32,0	944,2	230	943,5	(C _{18:2}) x3 + 4 O
34,0	928,5	222	927,5	(C _{18:2}) x3 + 3 O
36,1	912,3	208; 230	911,5	(C _{18:2}) x3 + 2 O
37,1	914,3	208; 234	913,5	(C _{18:2}) x2 + (C _{18:1}) + 2 O
37,6	912	234	911,5	(C _{18:2}) x3 + 2 O

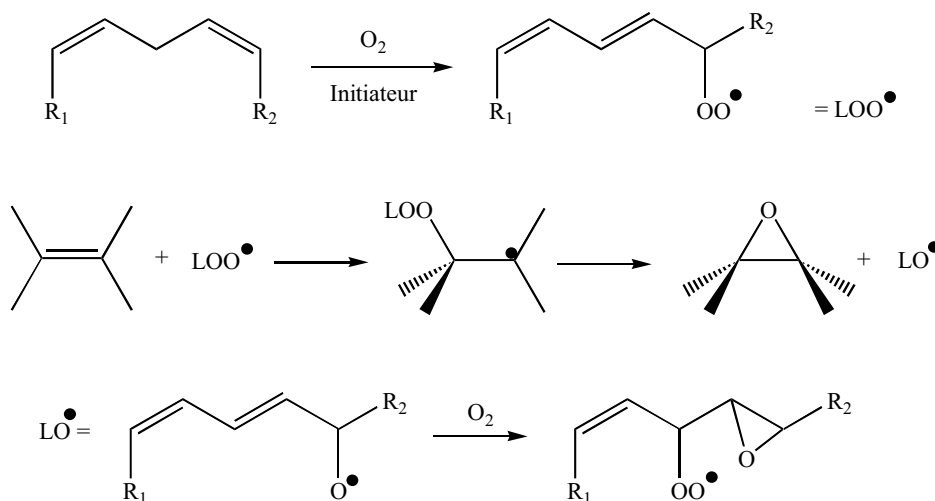


Figure-II-10. Illustration de la formation de radicaux oxygénés conduisant à divers produit d'oxydation (hydroperoxydes, alcools, époxyhydroperoxydes).

III.2 Inhibition de la peroxydation lipidique par les polyphénols

Plusieurs composés phénoliques et la vitamine C ont été introduits dans les modèles de bol alimentaire en conditions gastriques pour évaluer leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} (pH 5,8 ou pH 4). Dans le cas de la quercétine, composé modèle de cette étude, le pouvoir antioxydant a été testé sur l'accumulation des diènes conjugués, produits précoces de la réaction, ainsi que sur celle des composés volatils issus de l'oxydation avancée (pH 5,8). De plus, ce composé a été testé comme inhibiteur de la peroxydation lipidique initiée par l'hématine et par le fer non héminique.

III.2.1 Inhibition de la peroxydation lipidique par la quercétine

a) Initiation de la peroxydation lipidique par MbFe^{III} à pH 5,8

➤ Accumulation des diènes conjugués

Cette accumulation est mesurée par spectroscopie UV à 233 nm. Dans cette étude, la quercétine a été testée à des concentrations variant de 5 à 200 µM. Les cinétiques de peroxydation lipidique au sein des différents modèles sont représentées sur la Figure-II-11.

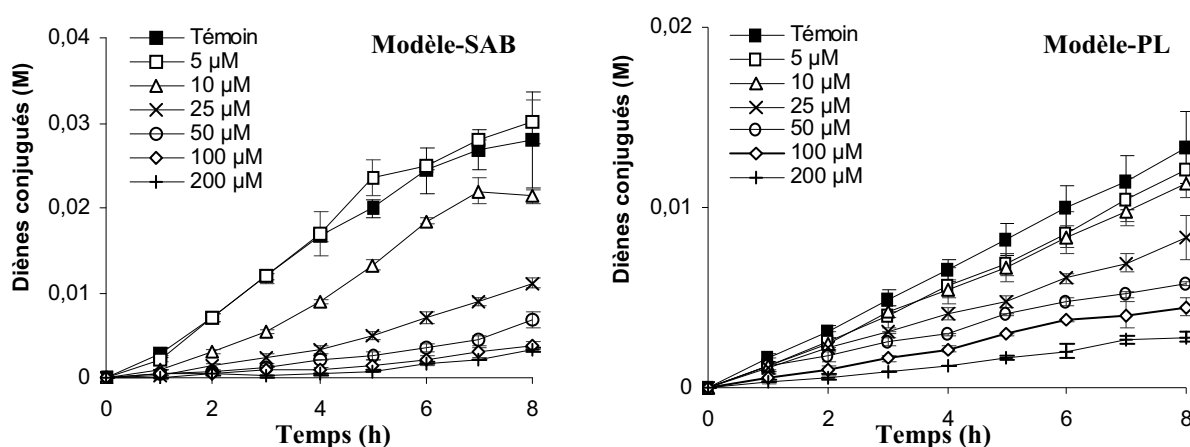


Figure-II-11. Formation de diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de différentes concentrations de quercétine à pH = 5,8. [Quercétine] = 0; 5; 10; 25; 50; 100; 200 µM, [MbFe^{III}] = 20 µM, T = 37°C.

Dans les deux modèles, la présence de quercétine entraîne un ralentissement notable de la peroxydation lipidique, et ce dès les plus faibles concentrations (5-10 µM).

Dans le modèle-SAB, aux fortes concentrations de quercétine (50, 100 et 200 µM), l'inhibition se caractérise par une phase de latence qui n'est pas observée dans le modèle-PL. Dans le modèle-PL, la vitesse de peroxydation lipidique est plus faible mais quasi-constante en présence de quercétine.

La vitesse de peroxydation décroît de façon biphasique en fonction de la concentration de quercétine (Figure-II-12), d'abord fortement puis de manière plus faible. Au delà d'une certaine concentration d'antioxydant (ca. 25 μM), l'inhibition de la peroxydation lipidique tend donc à saturer.

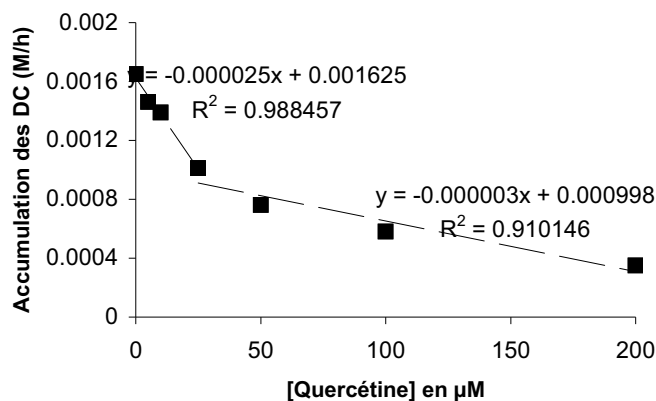


Figure-II-12. Relation entre la vitesse d'accumulation des diènes conjugués et la concentration de quercétine dans le modèle-PL à pH 5,8.

➤ Accumulation des composés secondaires d'oxydation

Cette accumulation est mesurée par CPG-SM comme décrit dans la partie Méthodes. Parmi les nombreux pics présents sur le profil chromatographique, cinq pics correspondant à l'hexanal, au hept-2-énal, au pentanal, à l'oct-1-èn-3-ol et à l'oct-2-énal ont été identifiés et quantifiés par CPG-SM. Les cinétiques d'apparition au cours de l'oxydation sont représentées sur la Figure-II-13 pour le modèle-SAB et sur la Figure-II-14 pour le modèle-PL.

Les cinétiques de formation des cinq composés volatils se rapprochent de celles observées pour les diènes conjugués pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la formation des volatils est bien plus rapide dans le modèle-SAB que dans le modèle-PL (d'un facteur 2 à 6 selon le composé volatil détecté). De plus, dans le modèle-SAB, quel que soit le composé volatil, l'inhibition par la quercétine à 25 μM est caractérisée par deux phases : une phase de latence de 0-6 h suivie d'une phase de reprise de l'oxydation de 6-8 h. En revanche, à la concentration de 100 μM , une seule phase est observée. Il semble qu'à forte concentration de quercétine, la phase de latence ne soit pas terminée en fin d'analyse ($t = 8$ heures).

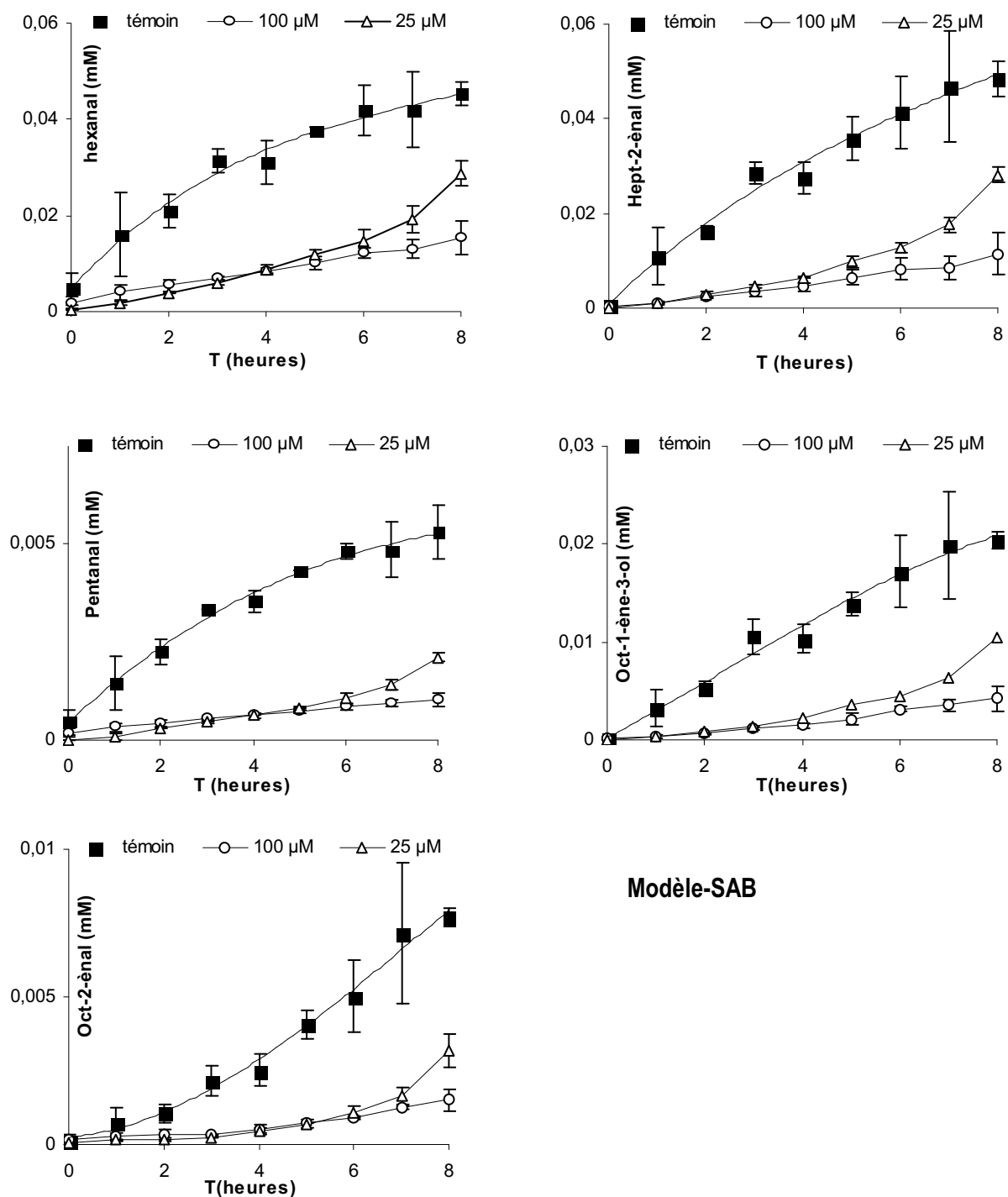


Figure-II-13. Formation des composés volatils (hexanal, hept-2-énal, pentanal, oct-1-ène-3-ol, oct-2-énal), dans le modèle-SAB en présence de différentes concentrations de quercétine. Initiation par MbFe^{III} , [Quercétine] = 0; 25; 100 μM . [MbFe^{III}] = 20 μM , $T = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,8$.

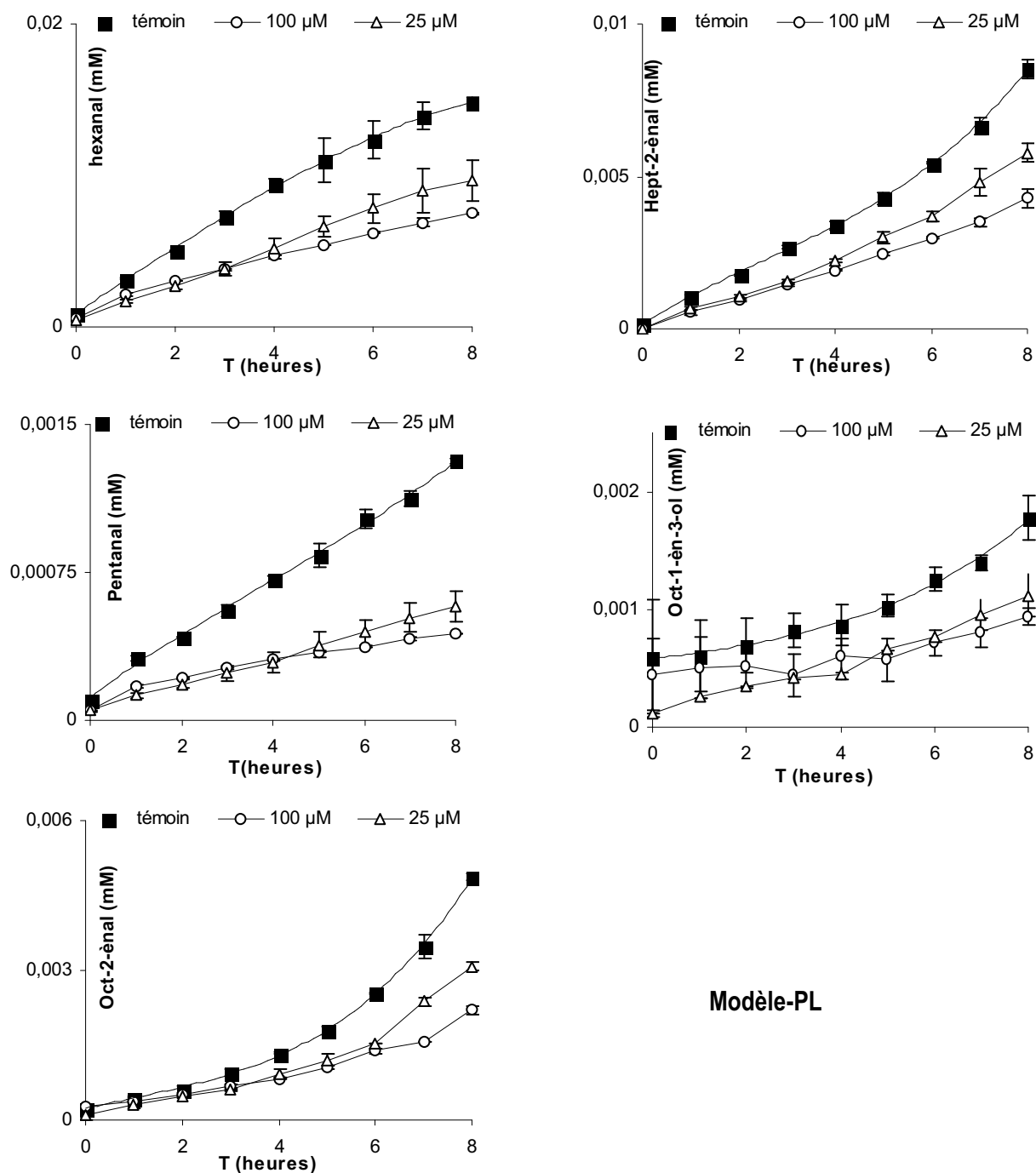


Figure-II-14. Formation des composés volatils (hexanal, hept-2-énal, pentanal, oct-1-èn-3-ol, oct-2-énal), dans le modèle-PL en présence de différentes concentrations de quercétine. Initiation par $MbFe^{III}$. [Quercétine]= 0; 25; 100 μM . $[MbFe^{III}] = 20 \mu M$, $T = 37^{\circ}C$, $pH = 5,8$.

Dans le modèle-PL, on n'observe aucune phase de latence (oct-2-énal mis à part) comme cela a été mentionné pour la formation des diènes conjugués. Plusieurs études ont rapporté que la nature de l'interface pouvait avoir un impact sur la rétention des composés volatils [5, 44]. Toutefois, les gammes étalon effectuées indépendamment sur les deux modèles sont très proches et infirment cette

hypothèse. La différence observée entre les deux modèles serait plutôt en corrélation avec la différence déjà observée dans les cinétiques de formation des composés primaires d'oxydation.

Comme cela a déjà été montré dans d'autres études sur l'huile de tournesol ou l'acide linoléique, l'hexanal et le hept-2-énal sont les deux produits majoritairement formés dans nos émulsions alors que les autres composés, pentanal, oct-2-énal et oct-1-èn-3-ol, apparaissent plus minoritaires [12, 45-47]. L'hexanal et le pentanal sont produits par la décomposition de l'acide 13-hydroperoxy-(9E,11E)-octadécadiénoïque. Quant à l'hept-2-énal, il est formé à partir de l'acide 9-hydroperoxy-(10E,12E)-octadécadiénoïque (Figure-II- 15) [48]. Ces composés constituent donc des marqueurs d'oxydation des différents hydroperoxydes régioisomères issus de l'oxydation de l'acide linoléique.

Ainsi, ces cinq composés volatils constituent des marqueurs supplémentaires de l'oxydation lipidique dans nos modèles. L'inhibition de leur formation est concentration-dépendante comme pour les diènes conjugués. Ces expériences permettent donc de conclure que la mesure des diènes conjugués est pertinente pour l'évaluation de l'oxydation lipidique dans nos modèles.

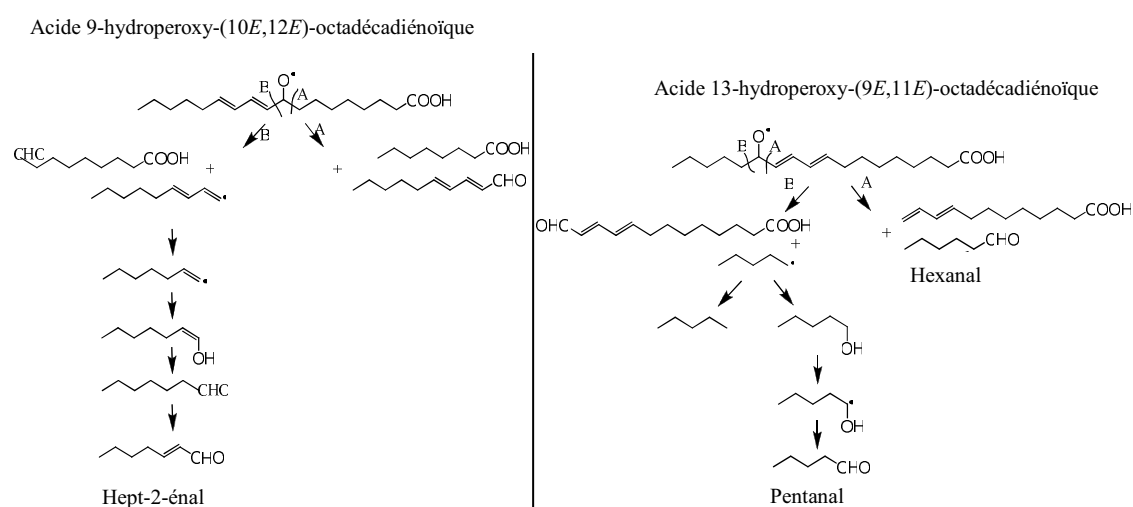


Figure-II- 15. Principales voies de formation des composés volatils issus des radicaux alkoxyyles.

b) Initiation de la peroxydation lipidique par la MbFe^{III} à pH 4

L'accumulation des DC induite par MbFe^{III} a été également évaluée à pH 4, pH de mi-digestion. La quercétine est introduite dans les modèles à deux concentrations distinctes : 25 et 100 µM.

A pH 4, l'inhibition par la quercétine à la concentration de 25 µM reste efficace dans le modèle-SAB, jusqu'à environ 6 heures de peroxydation lipidique. Au delà, la concentration de diènes conjugués

rejoint celle du témoin (Figure-II-16). Pour une concentration 100 μM de quercétine, une pseudo-phase de latence est observée et le ralentissement de la peroxydation est plus prononcé qu'à 25 μM . Dans le modèle-PL en revanche, il n'y a aucune inhibition de la peroxydation lipidique, quelle que soit la concentration testée de quercétine. La baisse du pH diminue donc très nettement le pouvoir antioxydant de la quercétine.

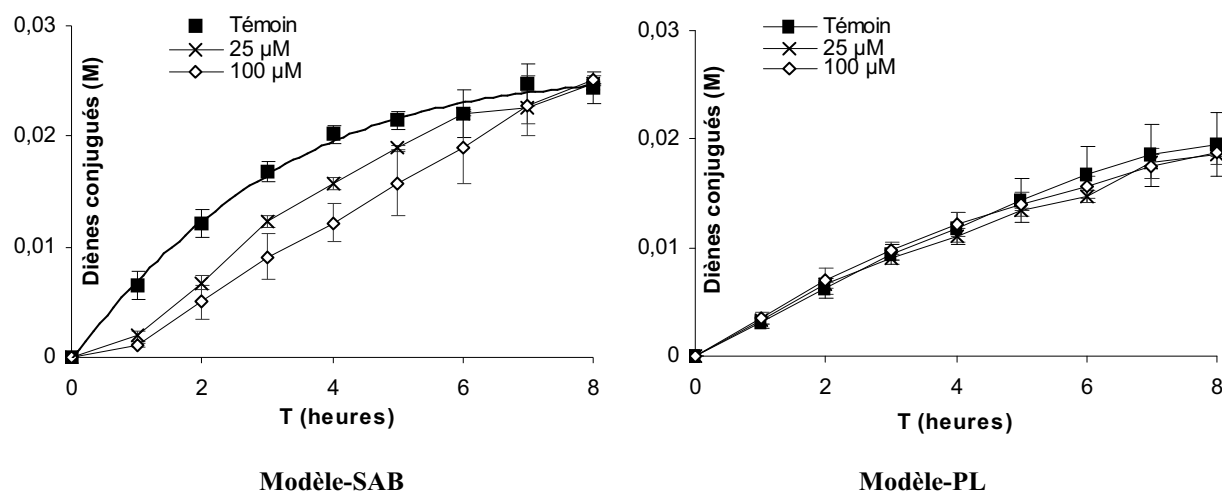


Figure-II-16. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} à $\text{pH} = 4$, en présence de différentes concentrations de quercétine. $[\text{Quercétine}] = 0; 25; 100 \mu\text{M}$. $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$, $T = 37^\circ\text{C}$.

L'effet du pH sur le pouvoir antioxydant a déjà été observé dans plusieurs études et il est souvent mis en relation avec la déprotonation des groupement hydroxyles des composés phénoliques testés [49-51]. Toutefois, dans notre système biphasique, d'autres composés comme les protéines MbFe^{III} et SAB peuvent changer d'état de charge et de structure, ce qui peut affecter le pouvoir antioxydant. Divers mécanismes seront discutés pour l'ensemble des antioxydants testés dans le paragraphe III.2.3.

c) Initiations de la peroxydation lipidique par l'hématine, Fe^{II} et le couple Fe^{III} /acide ascorbique à pH 5,8

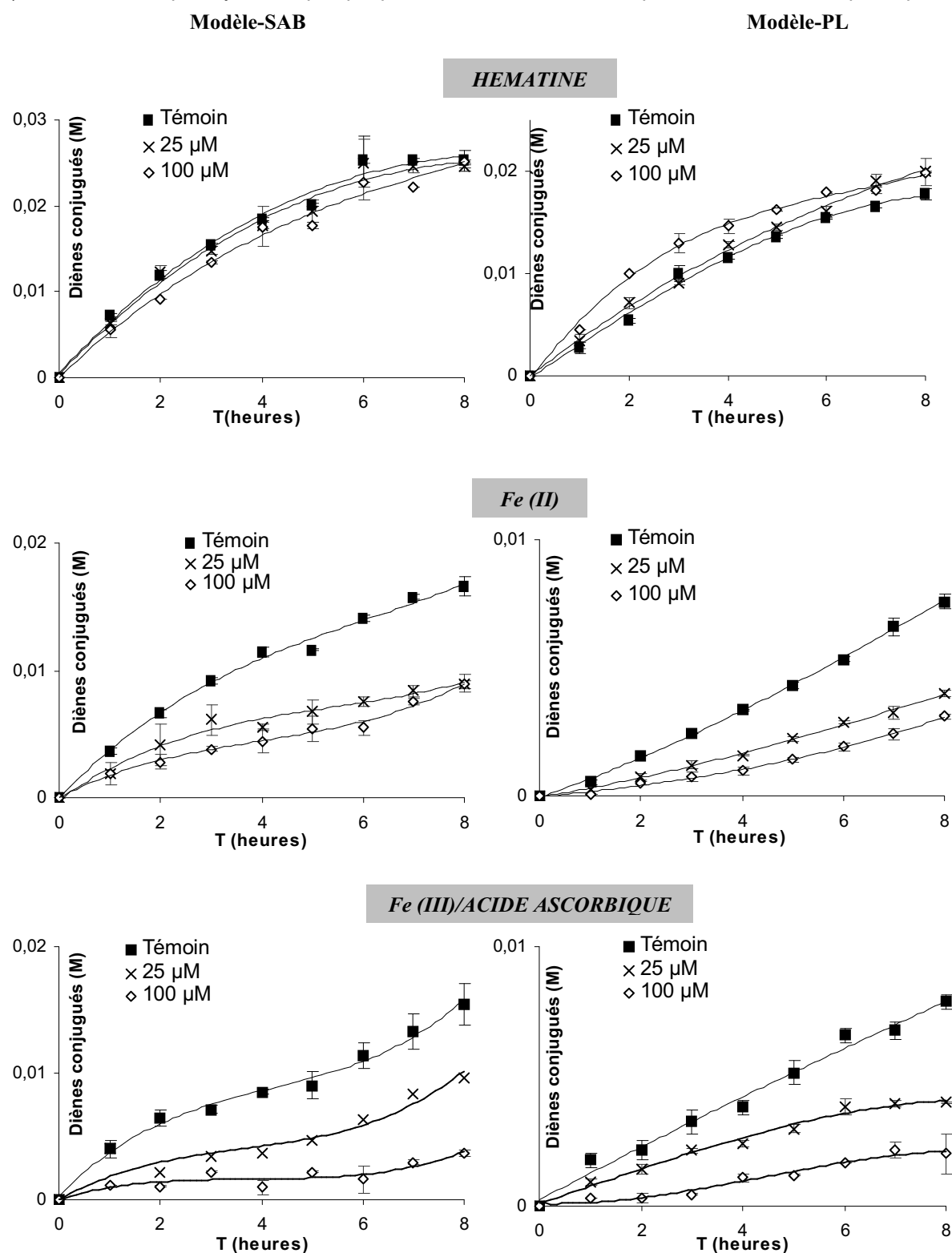


Figure-II-17. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par l'hématine, Fe^{II} et le couple Fe^{III} /acide ascorbique, en présence de différentes concentrations de quercétine à pH = 5,8. [Quercétine] = 0; 25; 100 μ M, T = 37°C. [Hématine] = $[Fe^{III}] = [Fe^{II}] = [Ac. Ascorbique] = 20 \mu$ M.

La quercétine (25 et 100 μM) a également été testée pour son pouvoir antioxydant dans des systèmes d'oxydation à base d'hématine ou de fer non hémérique (Figure-II-17).

Lorsque l'initiation est effectuée à l'aide d'hématine, la quercétine ne ralentit pas la peroxydation à 100 et à 25 μM , et ce dans les deux modèles. Il semblerait même qu'un léger effet pro-oxydant soit observé dans le modèle-PL à la concentration de 100 μM . En l'absence de la partie globine, l'hématine relativement hydrophobe est très certainement localisée à proximité de la phase lipidique, au contact de l'interface. En revanche, la quercétine étant toujours présente en phase aqueuse, la rencontre des deux espèces apparaît donc moins favorable, ce qui pourrait expliquer l'inefficacité de la quercétine dans ces systèmes.

Dans les systèmes d'oxydation initiée par Fe^{II} , les phénomènes sont bien différents. La quercétine, aux deux concentrations choisies, est un bon inhibiteur de peroxydation lipidique, dans le modèle-SAB comme dans le modèle-PL. Le mécanisme principal mis en jeu ici est probablement la chélation de Fe^{II} par la quercétine qui bloquerait la réaction de coupure homolytique des hydroperoxydes par Fe^{II} (réaction de Fenton) [52, 53].

Trois sites de chélation sont possibles sur la molécule de quercétine : le groupement 3',4'-dihydroxy du noyau catéchol et les groupements 3-hydroxy-4-oxo et 5-hydroxy-4-oxo. Une étude spectroscopique a montré que le noyau catéchol serait le site principal de complexation des flavonoïdes à pH neutre [54]. En outre, dans la gamme de pH 2-6, un flavonol possédant un noyau B de type catéchol pourrait former un complexe fer/ligand de stoechiométrie 2:1. Toutefois, une étude théorique (approche DFT), suggère que la complexation s'effectuerait préférentiellement avec le groupement 3-hydroxy-4-oxo. Un complexe formé de deux molécules de quercétine pour un ion du fer apparaît même comme la structure la plus stable énergétiquement [52, 55]. Quoi qu'il en soit, même si aux deux concentrations testées, la quercétine est présente en excès par rapport aux ions du fer, elle n'assure peut être pas leur complexation totale dans notre modèle.

C'est avec le système d'initiation constitué du couple Fe^{III} /acide ascorbique que la quercétine apparaît être le meilleur agent antioxydant. Dans le modèle-SAB, une phase de latence d'une durée de 6 heures est observée pour une concentration 100 μM de quercétine. La complexation des ions du fer par la quercétine reste l'interprétation privilégiée.

III.2.2 Inhibition par les autres composés phénoliques et la vitamine C de la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} à pH 5,8

a) Inhibition par la rutine

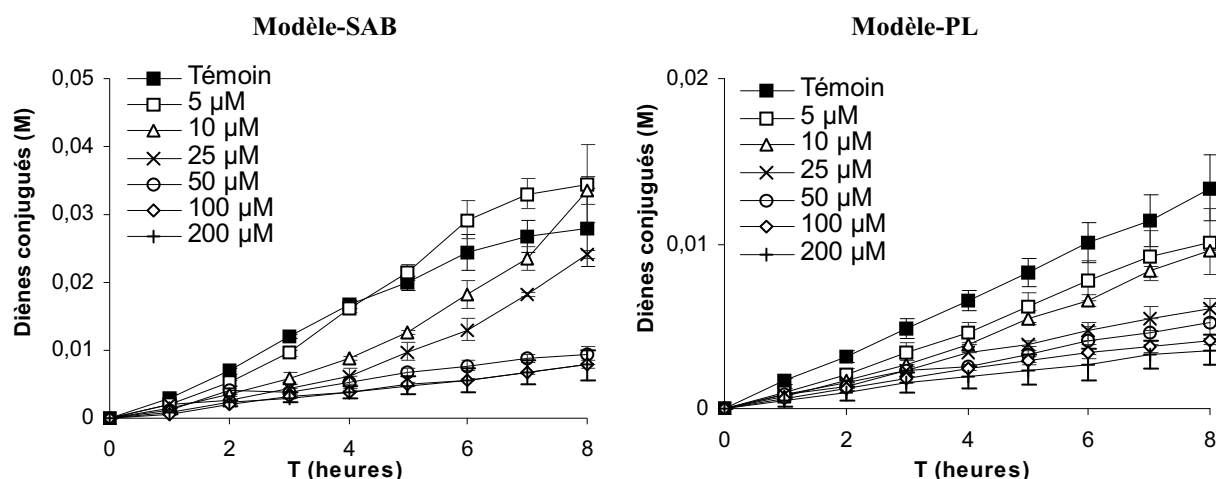


Figure-II-18. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de différentes concentrations de rutine à pH = 5,8. [Rutine]= 0 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 µM. [MbFe^{III}] = 20 µM. T=37°C.

La rutine se distingue de la quercétine par la présence du disaccharide rutinose (β -D-Glc-1,6- α -L-Rha) en position C3. Son pouvoir antioxydant est proche de celui de la quercétine dans les deux modèles (Figure-II-18). L'inhibition est significative et efficace dès la concentration de 10 µM.

b) Inhibition par la (+)-catéchine

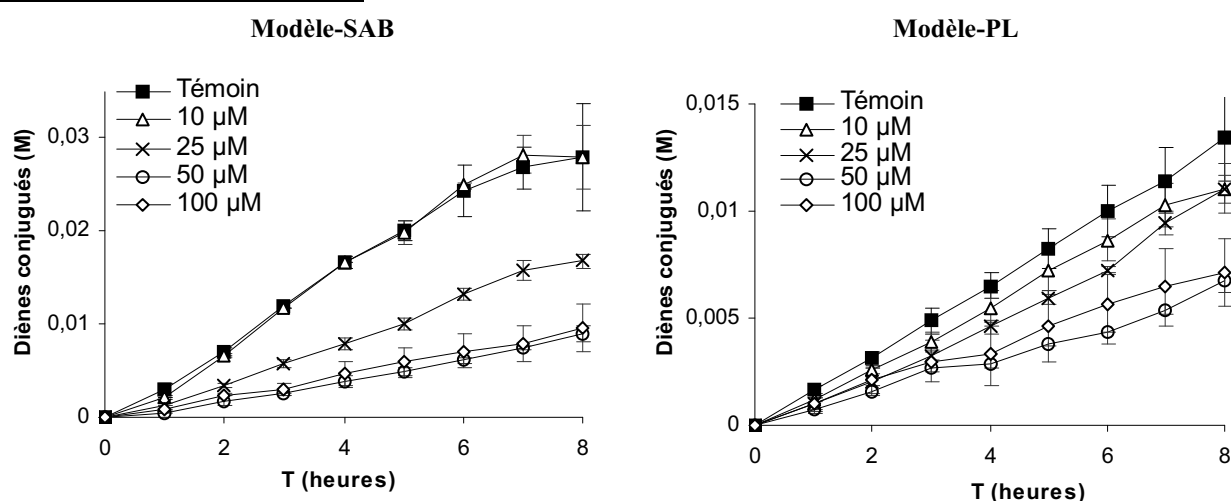


Figure-II-19. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de différentes concentrations de (+)-catéchine à pH = 5,8. [(+)-catéchine]= 0 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 µM. [MbFe^{III}] = 20 µM. T=37°C.

Pour la (+)-catéchine, il faut atteindre une concentration de 25 μM pour obtenir une inhibition significative. Dans les deux modèles, un effet de « saturation » de la capacité antioxydante est observé à partir de 50 μM , puisque l'ajout de 50 μM de (+)-catéchine ralentit autant la peroxydation lipidique qu'un ajout de 100 μM (Figure-II-19).

c) Initiation par l'acide caféique

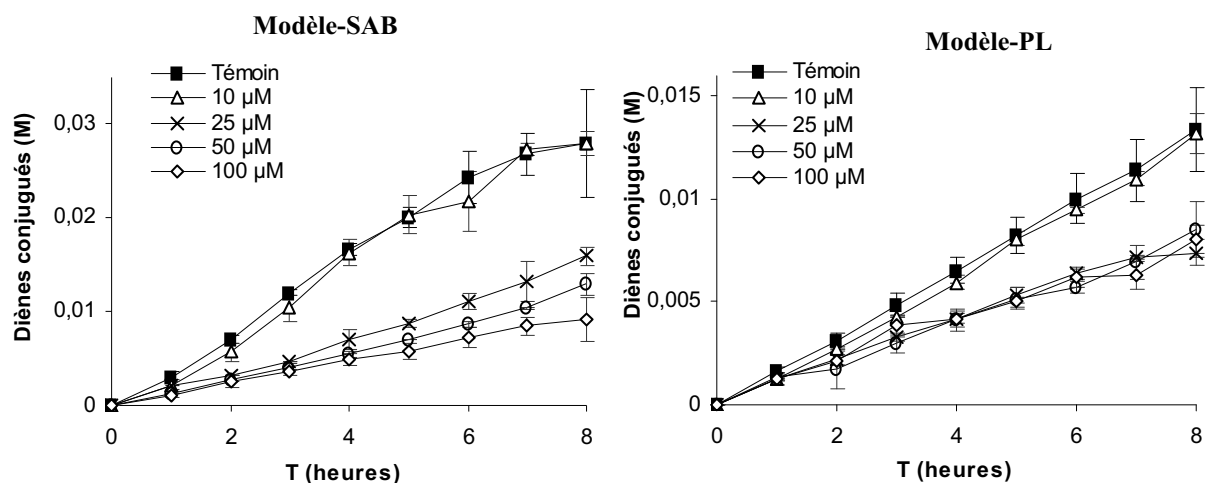


Figure-II-20. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de différentes concentrations d'acide caféique à $\text{pH} = 5,8$. [acide caféique] = 0 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 μM . $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$. $T = 37^\circ\text{C}$.

Comme pour la (+)-catéchine, 25 μM d'acide caféique sont nécessaires afin d'inhiber la peroxydation lipidique significativement (Figure-II-20). Dans le modèle-PL, un effet de « saturation » de la capacité antioxydante est également observé dès 25 μM .

d) Inhibition par l'acide chlorogénique

Dans le modèle-SAB, l'acide chlorogénique ralentit la peroxydation lipidique dès 25 μM . Comme pour la (+)-catéchine, un effet de saturation en capacité antioxydante est observé dès 50 μM . Dans le modèle-PL, les différentes concentrations testées sont peu différenciables (Figure-II-21).

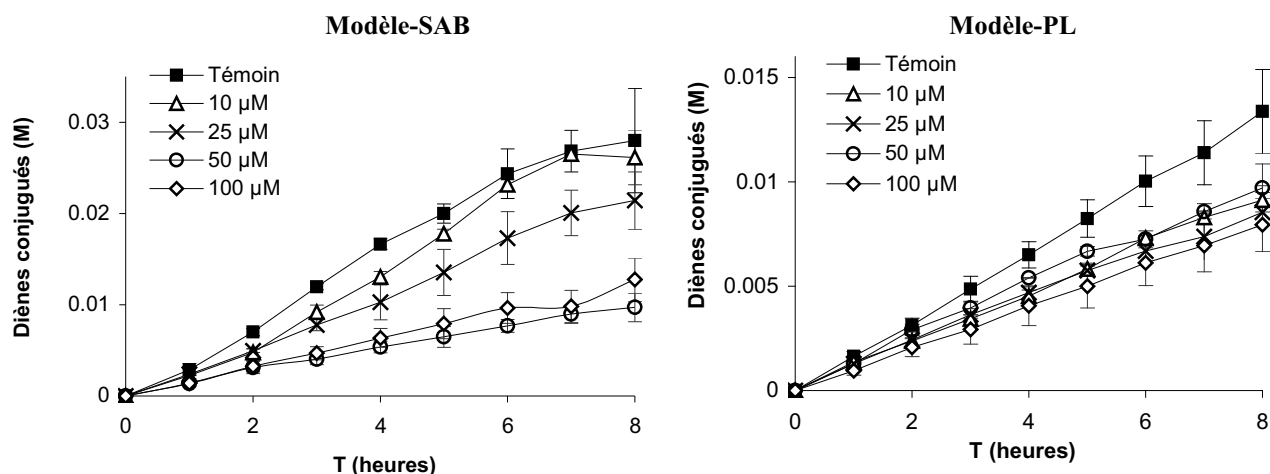


Figure-II-21. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de différentes concentrations d'acide chlorogénique à $\text{pH} = 5,8$. [acide chlorogénique] = 0; 10; 25; 50; 100 μM . [MbFe^{III}] = 20 μM . $T = 37^\circ\text{C}$.

e) Inhibition par l' α -tocophérol

Il est intéressant d'étudier le pouvoir antioxydant de l' α -tocophérol, car contrairement à l'ensemble des autres composés phénoliques testés, celui-ci a un caractère lipophile et une réputation bien établie d'antioxydant briseur de chaîne et par là-même de fort inhibiteur de la peroxydation lipidique.

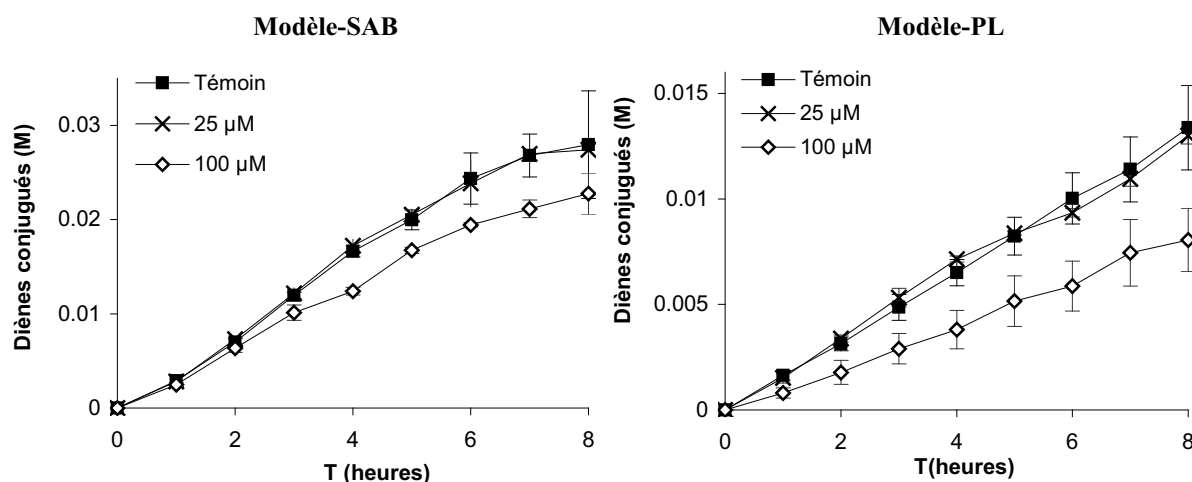


Figure-II-22. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de différentes concentrations d' α -Tocophérol à $\text{pH} = 5,8$. [α -Tocophérol] = 0; 25; 100 μM . [MbFe^{III}] = 20 μM . $T = 37^\circ\text{C}$.

Pourtant, dans le modèle-SAB, l' α -tocophérol n'est pas un bon inhibiteur de la peroxydation lipidique car, même à 100 μM , la peroxydation lipidique est faiblement inhibée comparativement aux

composés polaires. Dans le modèle-PL, il n'a aucun effet à 25 μM bien qu'étant aussi efficace que les polyphénols à 100 μM (Figure-II-22). La nature de l'interface a donc un impact sur le pouvoir antioxydant des composés. Cet aspect sera discuté dans une partie ultérieure.

f) Inhibition par la vitamine C (acide L-ascorbique)

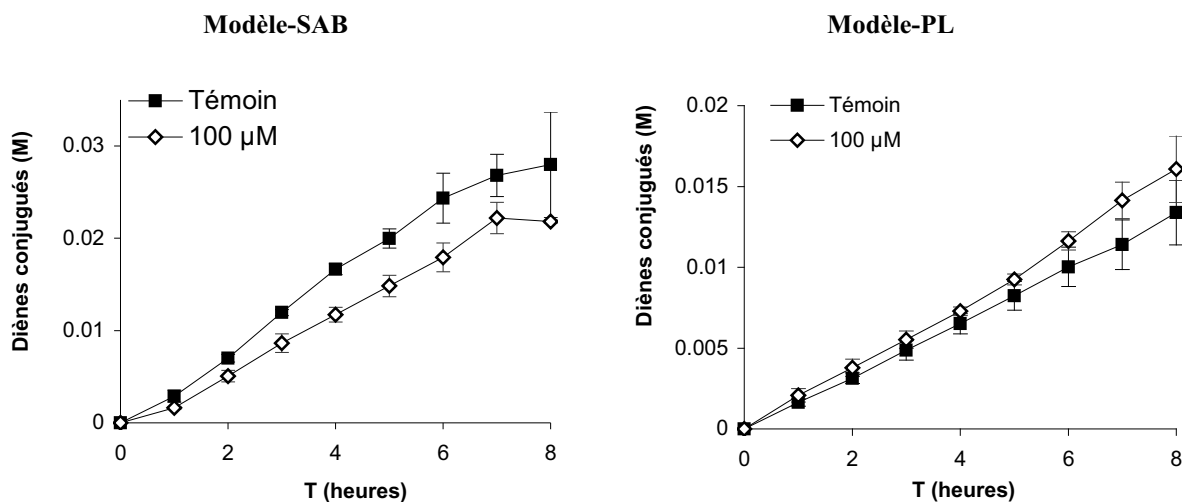


Figure-II-23. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de différentes concentrations de vitamine C à $\text{pH} = 5,8$. $[\text{Vitamine C}] = 0 ; 100 \mu\text{M}$. $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$. $T=37^\circ\text{C}$.

La vitamine C n'a été testée qu'à une seule concentration de 100 μM . Son pouvoir antioxydant est faible dans le modèle-SAB et nul dans le modèle-PL (Figure-II-23).

III.2.3 Inhibition par la rutine, l'acide chlorogénique et la vitamine C de la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} à pH 4

Les mêmes expériences ont été menées à pH 4, pour la rutine, l'acide chlorogénique et la vitamine C.

a) Inhibition par la rutine

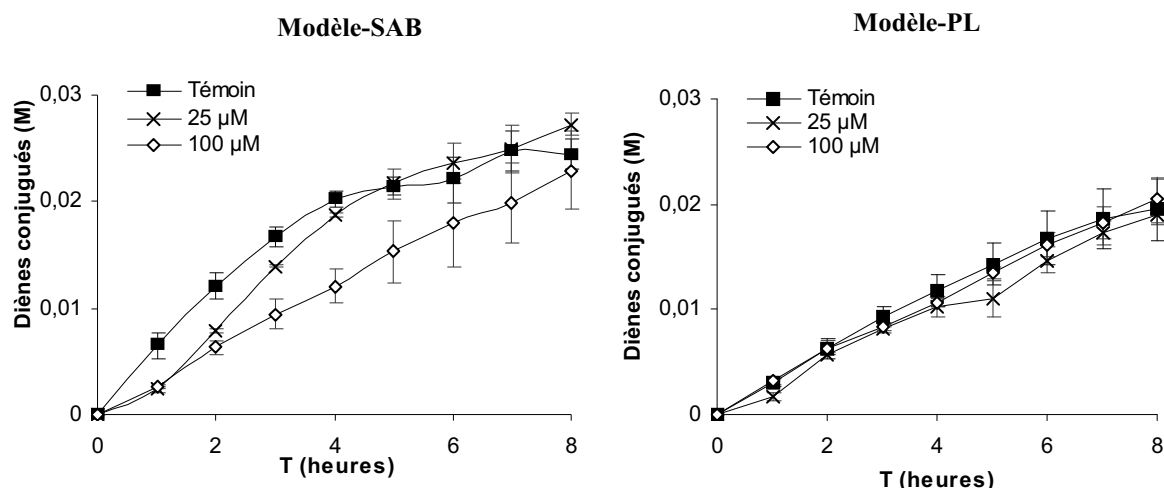


Figure-II-24. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de 25 et 100 μM de rutine à pH = 4. $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$. $T=37^\circ\text{C}$.

Comme cela a déjà été remarqué avec la quercétine, il est évident que la diminution du pH modifie complètement le comportement de la rutine. Sa capacité inhibitrice est fortement diminuée dans le modèle-SAB et inexistante dans le modèle-PL (Figure-II-24).

b) Inhibition par l'acide chlorogénique

Le même type de comportement est observé pour l'acide chlorogénique suite à la baisse du pH. L'inhibition dans le modèle-SAB est très faible et complètement nulle dans le modèle-PL (Figure-II-25).

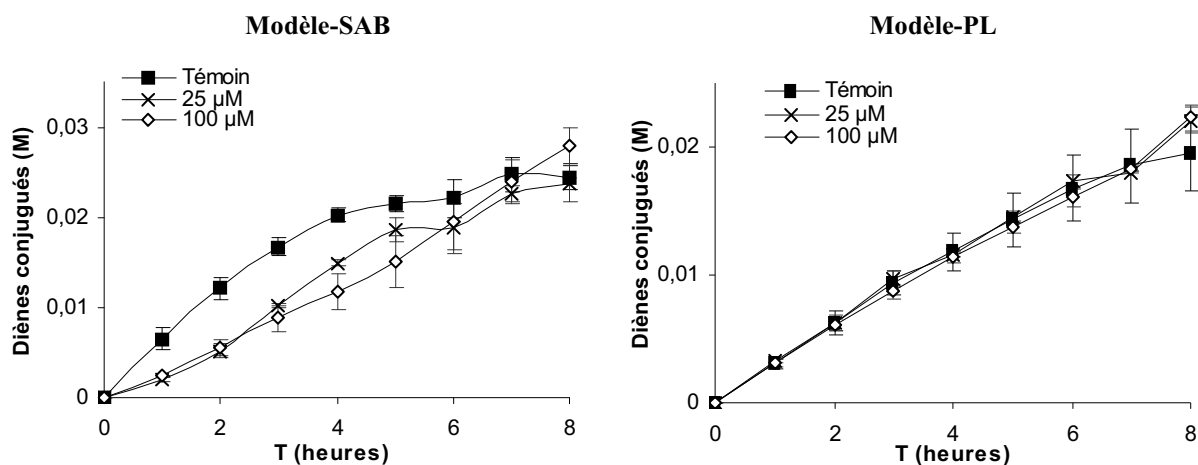


Figure-II-25. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de 25 et 100 μM d'acide chlorogénique à $\text{pH} = 4$. $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$. $T = 37^\circ\text{C}$.

c) Inhibition par la vitamine C (acide L-ascorbique)

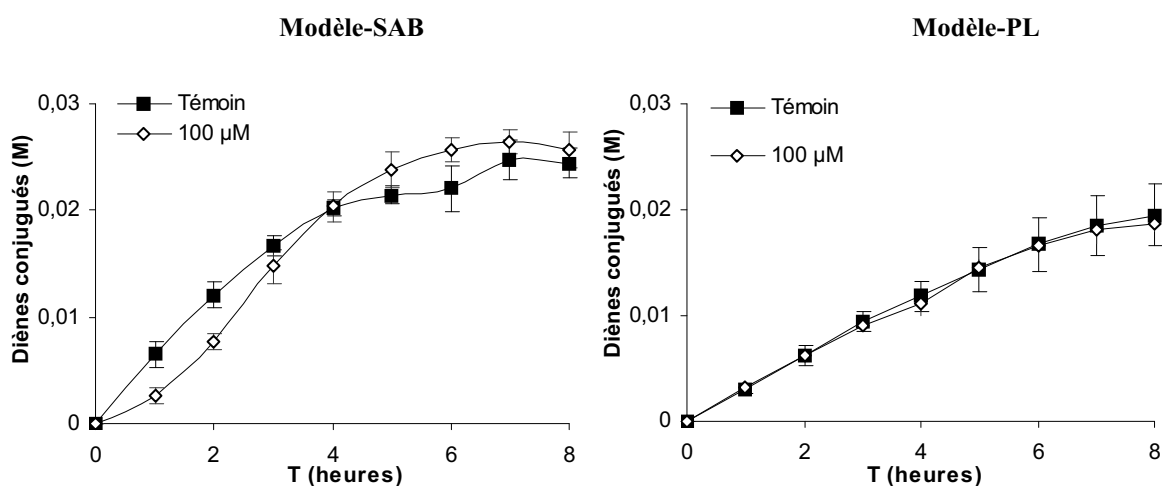


Figure-II-26. Formation des diènes conjugués durant la peroxydation lipidique initiée par MbFe^{III} en présence de 100 μM d'acide ascorbique à $\text{pH} = 4$. $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$. $T = 37^\circ\text{C}$.

Comme pour les autres composés, la baisse du pH affecte la capacité antioxydante de la vitamine C, la rendant inefficace dans le modèle-PL (Figure-II-26).

III.2.4 Comparaison de la capacité des différents composés à inhiber la peroxydation lipidique

a) A pH 5,8

Nous avons choisi de comparer les 6 composés phénoliques et la vitamine C pour leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique dans les modèles à la concentration de 100 μ M. Pour cela, l'aire sous la courbe $A_{233 \text{ nm}} = f(t)$ est calculée pour chaque composé et comparée à la valeur calculée pour un témoin ramenée en base 100. Ainsi plus l'aire calculée est petite, plus le composé inhibe fortement l'oxydation dans le modèle.

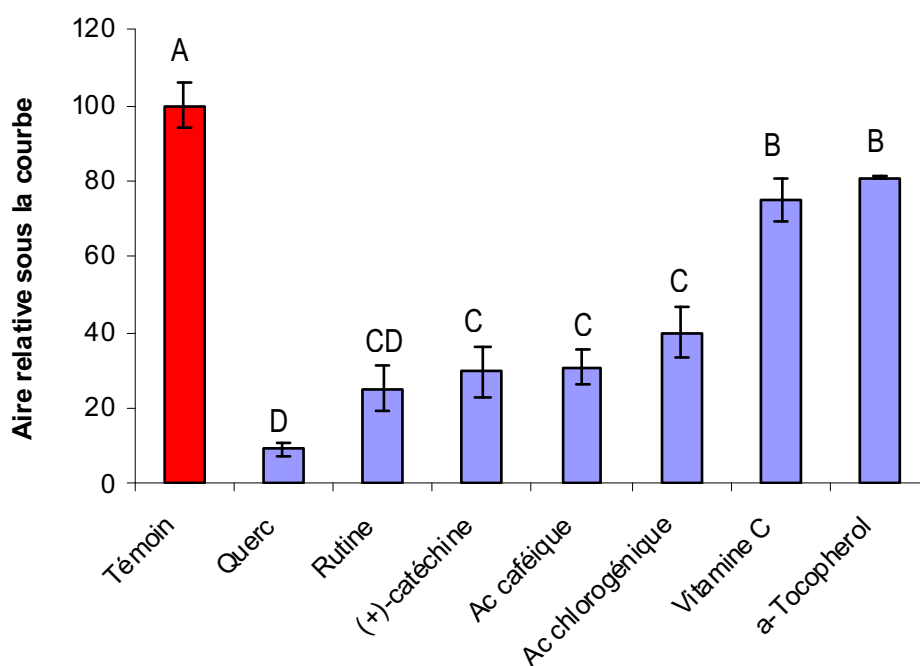


Figure-II-27. Capacités antioxydantes relatives des différents composés testés à la concentration de 100 μ M dans le modèle-SAB à pH 5,8. Les lettres indiquent des groupes de composés significativement différents (test post hoc de Tukey-Kramer) pour un intervalle de confiance de 95%.

Les différences observées entre l'ensemble des échantillons sont très significatives (ANOVA : $p < 0,0001$). Dans le modèle-SAB à pH 5,8, la quercétine est le meilleur antioxydant, suivi par la rutine. La (+)-catéchine, l'acide caféique et l'acide chlorogénique ralentissent aussi fortement l'oxydation lipidique et ce de façon similaire. En revanche, la vitamine C et l' α -tocophérol apparaissent bien moins efficaces (Figure-II-27). Dans ce modèle, l' α -tocophérol ne semble donc pas à même d'exercer son rôle d'antioxydant briseur de chaînes radicalaires. Ce classement est globalement en accord avec le classement des antioxydants selon leur pouvoir réducteur. Par exemple, dans le test CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity), le meilleur pouvoir réducteur a été mesuré pour la quercétine (TEAC : 4,38). Elle est suivie par la catéchine, l'acide caféique, la rutine et l'acide chlorogénique qui possèdent

des activités réductrices du même ordre de grandeur (TEAC : 3,09 → 2,47). Enfin, les activités réductrices de l' α -tocophérol et de l'acide ascorbique se sont révélées nettement moins marquées (TEAC : 1,10 et 0,96 respectivement) [56].

Dans les nombreuses études s'attachant au pouvoir antioxydant des composés phénoliques, la quercétine apparaît toujours comme le meilleur antioxydant quel que soit le test utilisé [56-59]. Ceci est en accord avec les aspects structuraux décrits dans l'étude bibliographique (présence d'un noyau catéchol et d'un groupement énoI possédant des atomes H labiles et permettant la capture de plusieurs équivalents d'ERO).

Pour la rutine, la glycosylation en position 3 abaisse, mais de façon peu significative, sa réactivité. Les potentiels rédox à pH 7 ont été évalués à $E = 0,60$ V et $E = 0,33$ V pour la rutine et la quercétine respectivement [60]. La rutine, dont le groupement énoI est désactivé par glycosylation, est donc un moins bon réducteur que la quercétine. C'est aussi un composé plus hydrophile et donc moins susceptible d'interagir avec une phase lipidique. Les pouvoirs antioxydants de l'acide chlorogénique et de l'acide caféique sont proches dans le modèle SAB avec un léger avantage à l'acide caféique. Des résultats semblables ont déjà été obtenus dans le test de décoloration du β -carotène et le test de réduction du radical DPPH [59].

La faible stabilité de la vitamine C (acide ascorbique), en raison de sa sensibilité à l'autoxydation [61], peut être une explication à son faible pouvoir antioxydant dans nos émulsions. Nos résultats sont en accord avec des travaux montrant que, même si l'ion ascorbate est un bon réducteur, sa capacité à inhiber la peroxydation lipidique en phase continue ou en émulsions est relativement faible sans doute en raison de son fort caractère hydrophile. En outre, des effets pro-oxydants peuvent se manifester, notamment en raison de la capacité de l'ion ascorbate à réduire les ions de métaux de transition pour conduire à des ions de basse valence impliqués dans la réaction de Fenton [62].

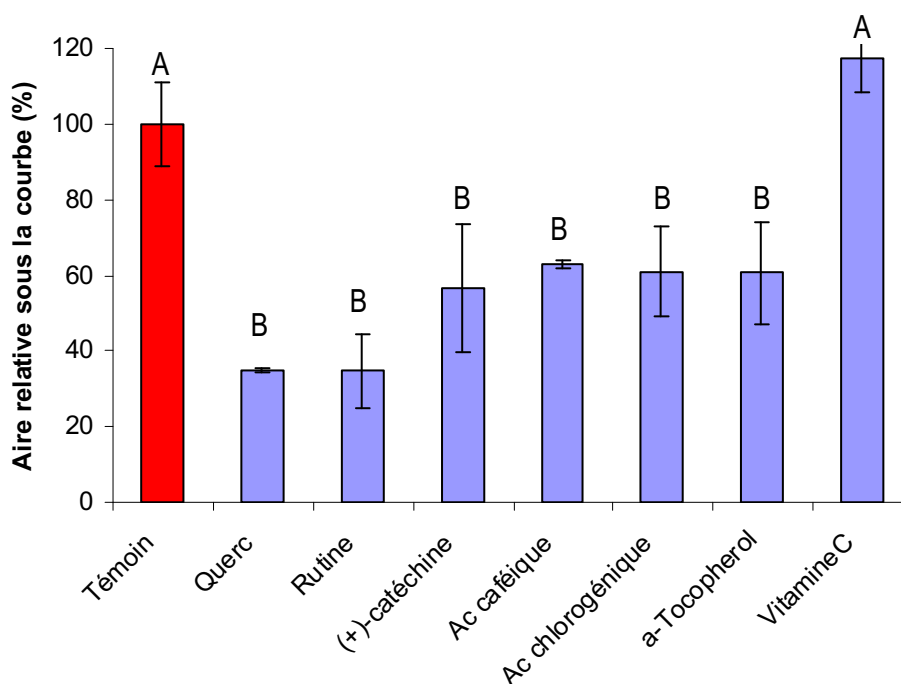


Figure-II-28. Capacités antioxydantes relatives des différents composés testés à la concentration de 100 μ M dans le modèle-PL, pH 5,8. Les lettres indiquent des groupes de composés significativement différents (test post hoc de Tukey-Kramer) pour un intervalle de confiance de 95%.

L'effet de l'inhibition par les différents antioxydants est aussi très significatif dans le modèle-PL (ANOVA : $p < 0,0001$) (Figure-II-28). La comparaison des histogrammes de la Figure-II-25 et de la Figure-II-26 montre clairement que l'inhibition de la peroxydation lipidique par les composés phénoliques est plus efficace dans le modèle-SAB que dans le modèle-PL. Dans le modèle-SAB, les aires mesurées pour la quercétine, la rutine, la (+)-catéchine et les acides caféique et chlorogénique sont inférieures à 50% de celle du témoin. En revanche dans le modèle-PL, les aires sont plus importantes et de l'ordre de 60% de l'aire du témoin. Cet effet est inversé dans le cas de l' α -tocophérol, qui voit son pouvoir antioxydant augmenter dans le modèle-PL. La vitamine C, qui possédait un faible effet antioxydant dans le modèle-SAB, perd toute activité dans le modèle-PL. La conjugaison avec le rutinose (rutine vs. quercétine) et avec l'acide quinique (acide chlorogénique vs. acide caféique) n'affecte pas la capacité antioxydante en système émulsionné par des PL.

b) A pH 4

Les effets observés à pH 4 dans le modèle-SAB sont hautement significatifs (ANOVA : $p = 0,002$). A pH 4, les trois composés phénoliques testés ont le même pouvoir antioxydant (Figure-II-29) alors qu'à pH 5,8 la quercétine était le meilleur antioxydant. De plus, la capacité antioxydante est fortement diminuée par rapport au pH 5,8.

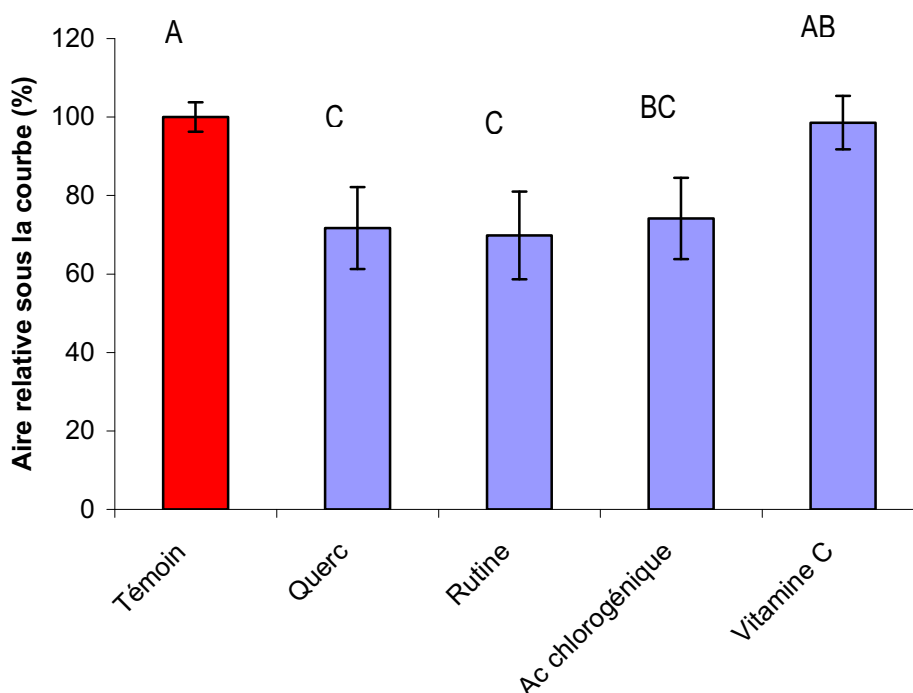


Figure-II-29. Capacités antioxydantes relatives des différents composés testés à la concentration de 100 μ M dans le modèle-SAB à pH 4. Les lettres indiquent des groupes de composés significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer) pour un intervalle de confiance de 95%.

Dans le modèle-PL (Figure-II-30) en revanche, aucun effet significatif n'est observé (ANOVA : $p = 0,988$). L'inhibition de la peroxydation est très affectée par la baisse du pH puisqu'aucun des composés testés n'exerce un pouvoir antioxydant à pH 4 dans ce modèle.

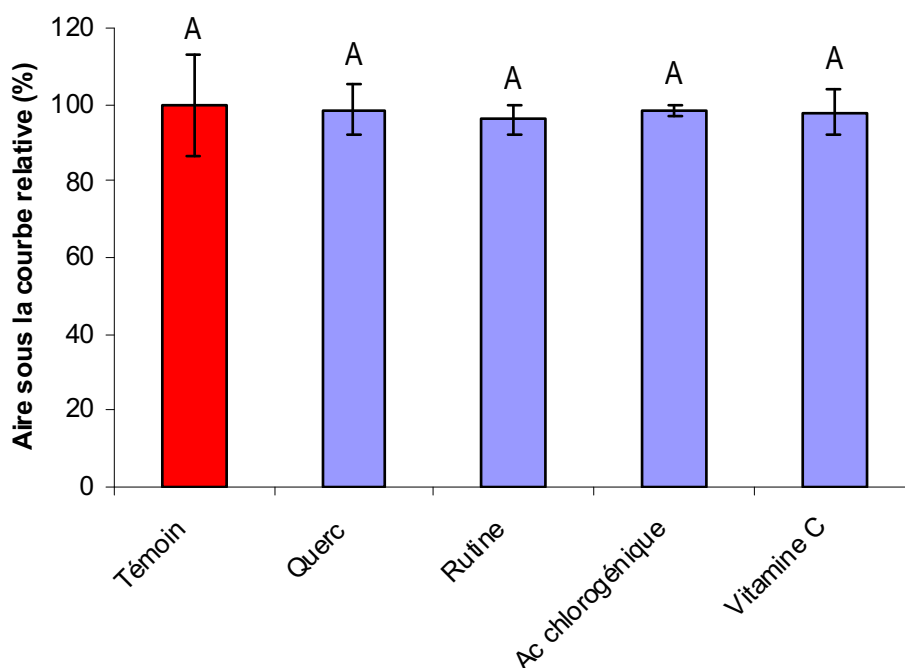


Figure-II-30. Capacités antioxydantes des différents composés testés à la concentration de 100 µM dans le modèle-PL à pH 4. Les lettres indiquent des groupes de composés significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer) pour un intervalle de confiance de 95%.

Les changements de pH entraînent des modifications dans l'état de protonation de la SAB des phospholipides et des composés phénoliques dictées par les valeurs de pH_i et de pK_a correspondantes. Aucun changement significatif n'intervient sur les phospholipides. Le Tableau-II-8 précise la forme de chaque espèce aux différents pH de l'étude.

Tableau-II-8. Forme des espèces présentes dans les systèmes émulsionnés à pH = 5,8 et à pH = 4. Les espèces en gras correspondent aux espèces majoritaires.

	Quercétine	Rutine	Acide chlorogénique	SAB	PL (PC et PE)	MbFe ^{III}
pKa	5,54; 6,95; 8,21; 9,77 (11,0) [18]	6,95; 8,30; 10,04 (10,9) [18]	7,60; 11,85 (4,44) [63]	$pH_i = 4,7-4,9$ [64]	H ₃ PO ₄ : $pK_a = 2,1$ PC : N+(CH ₃) ₃ PE : NH ₃ ⁺ /NH ₂ : $pK_a = 10,8$	$pH_i = 7$ [65]
pH 5,8	monoanion	neutre	monoanion	Charge -	Zwitterion +/-	Charge +
pH 4	neutre	neutre	mélange forme neutre + monoanion	Charge +	Zwitterion +/-	Charge + Séparation hème/globine

PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine

L'effet principal de la diminution du pH (pH 5,8 → pH 4) est le changement de la SAB d'une charge globale négative à une charge globale positive. En outre, les flavonoïdes sont totalement sous

forme neutre à pH 4 alors que l'acide chlorogénique est partiellement sous forme monoanionique. A pH 5,8, l'acide chlorogénique est sous forme monoanionique de même que la quercétine. Par conséquent, la diminution de pH entraîne très vraisemblablement des modifications dans l'intensité des interactions entre SAB et les composés phénoliques, ce qui pourrait altérer la capacité antioxydante dans le modèle-SAB. Cet aspect sera aussi développé dans le chapitre suivant. Il est à souligner que les valeurs de pK_a ne renseignent que sur les formes acido-basiques des antioxydants non liés mais que la distribution des différentes formes peut être fortement perturbée par interaction des antioxydants avec l'interface (SAB ou PL).

En outre, il est important de rappeler qu'à pH 4, MbFe^{III} subit une forte dénaturation avec relargage de l'hème, ce qui doit faciliter l'interaction de ce dernier avec l'interface. Les composés phénoliques présents en phase aqueuse seraient alors moins aptes à protéger la phase lipidique contre l'oxydation initiée par l'hème.

III.2.5 Inhibition par des mélanges d'antioxydants à pH 5,8

De nombreux travaux relatent des effets synergiques pour certains mélanges d'antioxydants, y compris en milieu émulsionné [66, 67]. Afin de tester cette possibilité, nous avons considéré différentes combinaisons de composés dans le modèle-SAB à pH 5,8 dans le respect d'une concentration totale d'antioxydants égale à 100 μM . Ainsi, des mélanges quercétine/vitamine C (1:1), quercétine/ α -tocophérol (1:1) et quercétine/rutine/(+)-catéchine/acide chlorogénique (1:1:1:1) ont été testés (Figure-II-31).

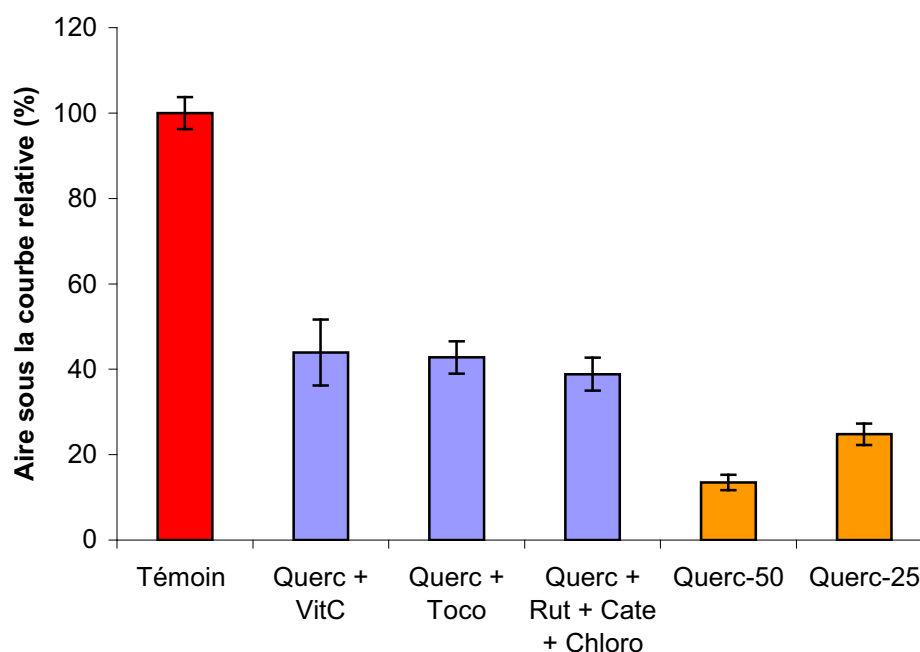


Figure-II-31. Capacités antioxydantes des mélanges de composés dans le modèle-SAB à pH 5,8. $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$. Dans les mélanges binaires, chaque composé est présent à une concentration de 50 μM . Dans le mélange quaternaire, chaque composé est présent à une concentration de 25 μM .

Si un effet synergique se manifeste, l'aire relative des mélanges de composés doit au minimum être inférieure à celle obtenue avec la quercétine en concentration 50 μM dans le cas des mélanges binaires et à celle obtenue avec la quercétine en concentration 25 μM dans le cas du mélange quaternaire. Ce n'est pas le cas. En fait, un fort antagonisme est même observé qui montre que l'activité antioxydante de la quercétine est fortement abaissée par les autres antioxydants.

De nombreux travaux indiquent un effet synergique entre les flavonoïdes et l' α -tocophérol en solutions homogènes aussi bien qu'en systèmes organisés (micelles, liposomes, émulsions). Par exemple, ce phénomène a été observé avec la myricétine, la quercétine et la rutine en solution

homogène [67, 68]. Il est classiquement associé à la régénération de l' α -tocophérol, à partir du radical α -tocophéryle, par les flavonoïdes.

Toutefois, le mécanisme inverse semble également opérer (régénération des flavonoïdes par le tocophérol). Par exemple, un effet synergique prononcé entre la quercétine et l' α -tocophérol a été observé dans l'inhibition de l'oxydation induite par MbFe^{III} de micelles d'acide linoléique stabilisés par le Tween 20. Il a été suggéré que la régénération de la quercétine par l' α -tocophérol intervient dans la cavité de l'hème où la quercétine peut interagir au niveau du centre fer-oxo de la ferrylmyoglobine (qu'elle réduit rapidement) alors que l' α -tocophérol n'interagit qu'au niveau du noyau porphyrine pour le protéger de la dégradation oxydante [35].

Dans nos systèmes émulsionnés, la quercétine et l' α -tocophérol sont probablement localisés dans des environnements trop distincts (phase aqueuse, interface ou phase lipidique) pour pouvoir interagir. En outre, l'affinité variable des polyphénols pour la SAB et leur présence à la fois à l'interface de l'émulsion et en phase aqueuse compliquent l'interprétation de nos résultats. Il est envisageable que des phénomènes de compétition pour la SAB interviennent entre la quercétine ($K_{\text{assoc}} = 86\text{-}134 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ [69]) et les autres antioxydants tels que la vitamine C ($K_{\text{assoc}} = 35 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ [64]) interviennent et modifient la localisation et le mode d'action antioxydante des composés dans le modèle.

III.3 Dégradation oxydante des composés phénoliques au cours du temps et caractérisation des produits néoformés

En parallèle des analyses de diènes conjugués, la dégradation oxydante des différents antioxydants phénoliques a été évaluée dans les deux modèles. L'analyse en spectrométrie de masse des nouveaux produits apparaissant durant l'oxydation a permis, dans certains cas, de proposer des structures ainsi qu'un schéma réactionnel pour leur formation.

III.3.1 Oxydation de la quercétine dans les émulsions à pH 5,8

a) Etude cinétique

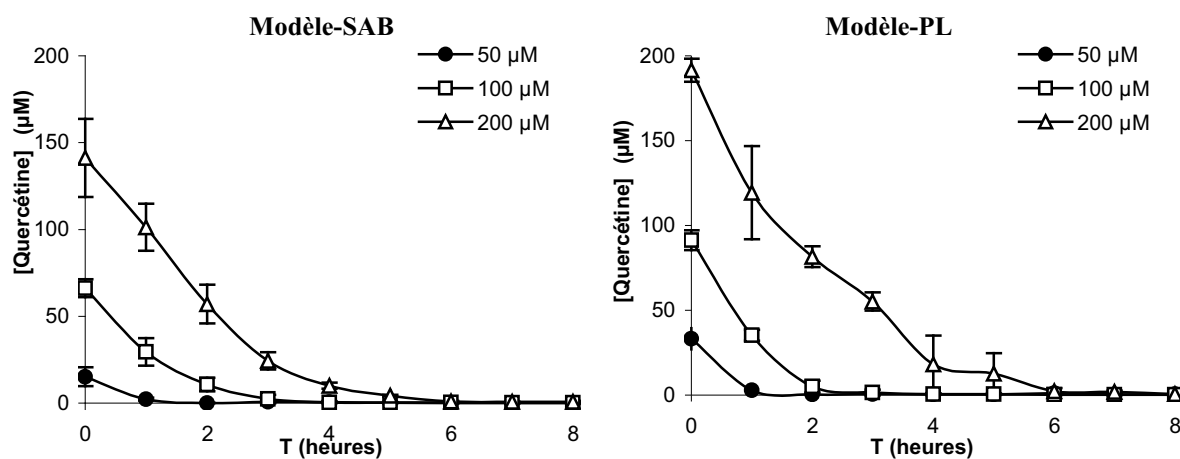


Figure-II-32. Dégradation oxydante de la quercétine, dans les deux modèles à pH 5,8. T = 37 °C. [MbFe^{III}] = 20 µM.

La quercétine se dégrade très rapidement au cours du temps. A deux, quatre et six heures, elle a complètement disparu dans les modèles qui en contenaient initialement 50, 100 et 200 µM, respectivement (Figure-II-32). Il est à noter que dans le modèle-SAB, son rendement d'extraction n'est que de 70%, 65% et 36% pour les concentrations initiales de 200, 100 et 50 µM respectivement. Ce résultat est probablement dû à l'association SAB/quercétine qui conduit à une rétention d'une partie de la quercétine dans le culot protéique lors de l'élimination de la SAB par centrifugation.

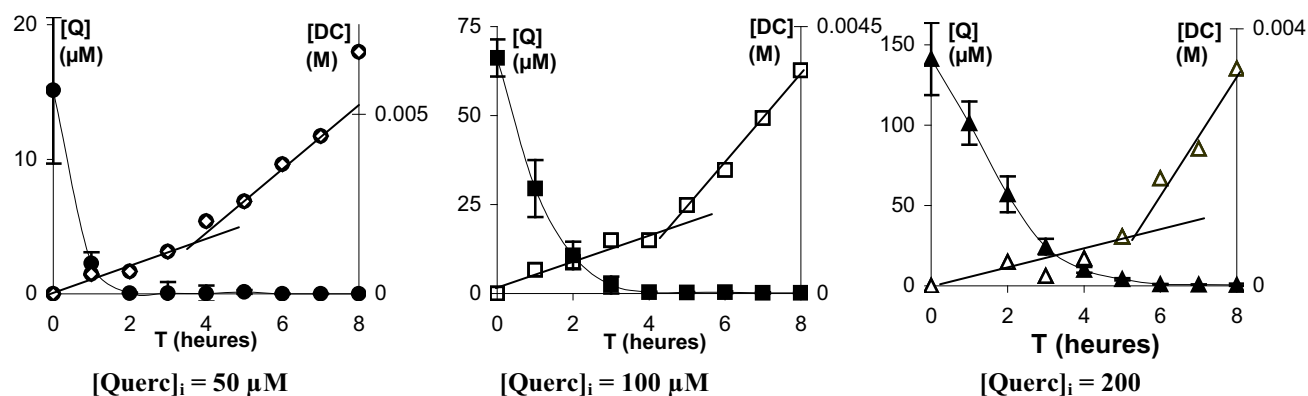


Figure-II-33. Superposition des courbes de dégradation de la quercétine (Q en μM) et de l'apparition concomitante des diènes conjugués (DC en μM) pour 50, 100 et 200 μM de quercétine dans le modèle-SAB à pH 5,8.

En superposant les courbes de dégradation de la quercétine à 50 et 100 μM avec celles d'apparition des diènes conjugués, on remarque que, même après la dégradation totale de la quercétine (2 et 3 heures aux concentrations de 50 et 100 μM), les phases de latence pour l'apparition des diènes conjugués perdurent (jusqu'à 3 et 4 heures pour 50 et 100 μM respectivement) (Figure-II-33). Ces observations montrent que les produits d'oxydation de la quercétine possèdent eux-même un potentiel antioxydant. A 200 μM , étrangement, ce phénomène n'est pas observé : il y a concordance entre la durée de la phase de latence et la durée nécessaire à la dégradation de la quercétine. Le Tableau-II-9 récapitule ces observations.

Tableau-II-9. Temps de dégradation et de phase de latence observée pour chaque concentration de quercétine testée.

Concentration de quercétine (μM)	Durée pour une dégradation totale de la quercétine (h)	Durée de la phase de latence pour l'apparition des diènes conjugués (h)
50	2	3
100	3	4
200	5	5

b) Identification des produits issus de l'oxydation de la quercétine

A partir des profils chromatographiques des émulsions oxydées et contenant de la quercétine (Figure-II-34), nous avons cherché à proposer des structures chimiques pour les produits de dégradation de la quercétine. L'identification des principaux produits formés est uniquement basée sur les spectres UV et les spectres de masse des principaux pics. Ceux-ci sont présentés en Annexe 2.

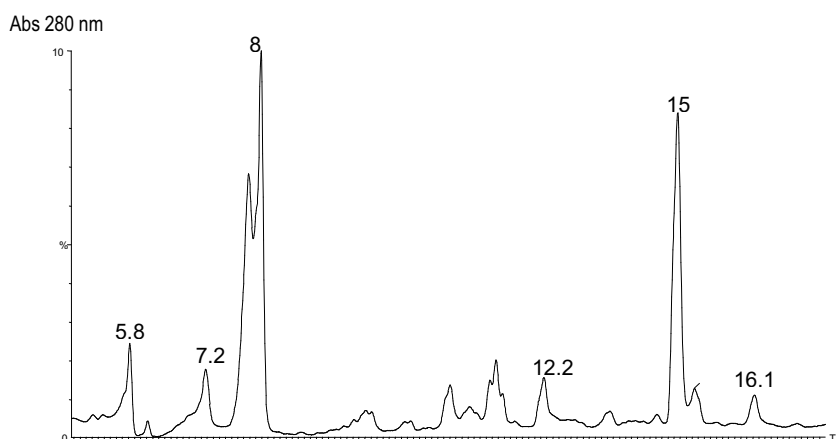
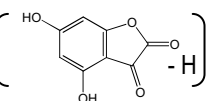
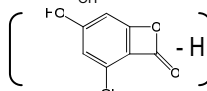


Figure-II-34. Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la quercétine, $\lambda = 280 \text{ nm}$ à $t = 4 \text{ h}$.

Plusieurs hypothèses de structures de composés ont pu être formulées (Annexe2 et Tableau-II-10).

Tableau-II-10. Hypothèses de structures des produits de dégradation de la quercétine. AH_2 =monomère, $(\text{AH})_2$ = dimère correspondant à $2(\text{AH}_2)-2\text{H}$, $(2\text{AH}+\text{A})$ = trimère correspondant à $3(\text{AH}_2)-4\text{H}$.

Tr (min)	Voltage du cône (V)	λ max (nm)	m/z	Abondance relative (%)	Hypothèse structurale des fragments	Type de produit proposé	Nom commun
5,8	25	290 270	153 109	100 60	$[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$	$\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2\text{CO}_2\text{H}$	Acide protocatéchique (PM = 154,12 g/mol)
7,2	25	290 220	197 179 153	40 100 25	$[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$	$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COCO}_2\text{H}$	Acide 2,4,6-trihydroxyphénylglyoxylique (PM = 198,13 g/mol)
8	25 50	294 ep 330	317 299 271 227 207 179 151	100 5 12 15 39 67 100	$[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}]^-$ $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$ $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{CO}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$  	$\text{AH}_2-2\text{H}+\text{H}_2\text{O}$ [70]	Benzofuranone (PM = 318,24 g/mol)
12,2	25	370 256	301	100	$[\text{M}-\text{H}]^-$	AH_2	Quercétine (PM = 302,24 g/mol)
15	25	364 304	601 299	55 100	$[\text{M}-\text{H}]^-$ $[\text{M}-\text{AH}_2-\text{H}]^-$	$(\text{AH})_2$	Dimère de quercétine (PM = 602,47 g/mol)
16,1	25	365 300	902 299	100 55	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$(2\text{AH}+\text{A})$	Trimère de quercétine (PM = 902,69 g/mol)

A des temps de rétention inférieurs à celui de la quercétine, trois composés de dégradation, plus polaires que la quercétine ont été mis en évidence. Il s'agit d'un composé de type benzofuranone, la 2-(3,4-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-3(2H)-benzofuranone, de l'acide 2,4,6-

trihydroxyphénylgyoxylique et de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (ou acide protocatéchine). Les identifications de la benzofuranone et de l'acide protocatéchine ont pu être confirmées par co-injection des deux composés témoins. A des temps de rétention supérieurs à celui de la quercétine, les deux composés apparaissant au cours du temps sont probablement un dimère et un trimère de quercétine.

Les cinétiques d'apparition de ces composés au cours du temps sont représentées en Figure-II-35. Dans le cas de l'acide protocatéchine ($T_r = 5,8$ min), la cinétique n'a pu être suivie dans le modèle-PL à cause des très faibles concentrations. Il est aussi à noter que dans le cas de la benzofuranone et de l'acide protocatéchine, l'échelle des ordonnées a pu être exprimée en concentration grâce à des gammes-étalon obtenues préalablement dans l'équipe. Dans le cas de l'acide 2,4,6-trihydroxyphénylgyoxylique, les concentrations sont approximatives et exprimées en équivalent acide protocatéchine, tandis que dans le cas du dimère et du trimère elles sont exprimées en équivalent quercétine.

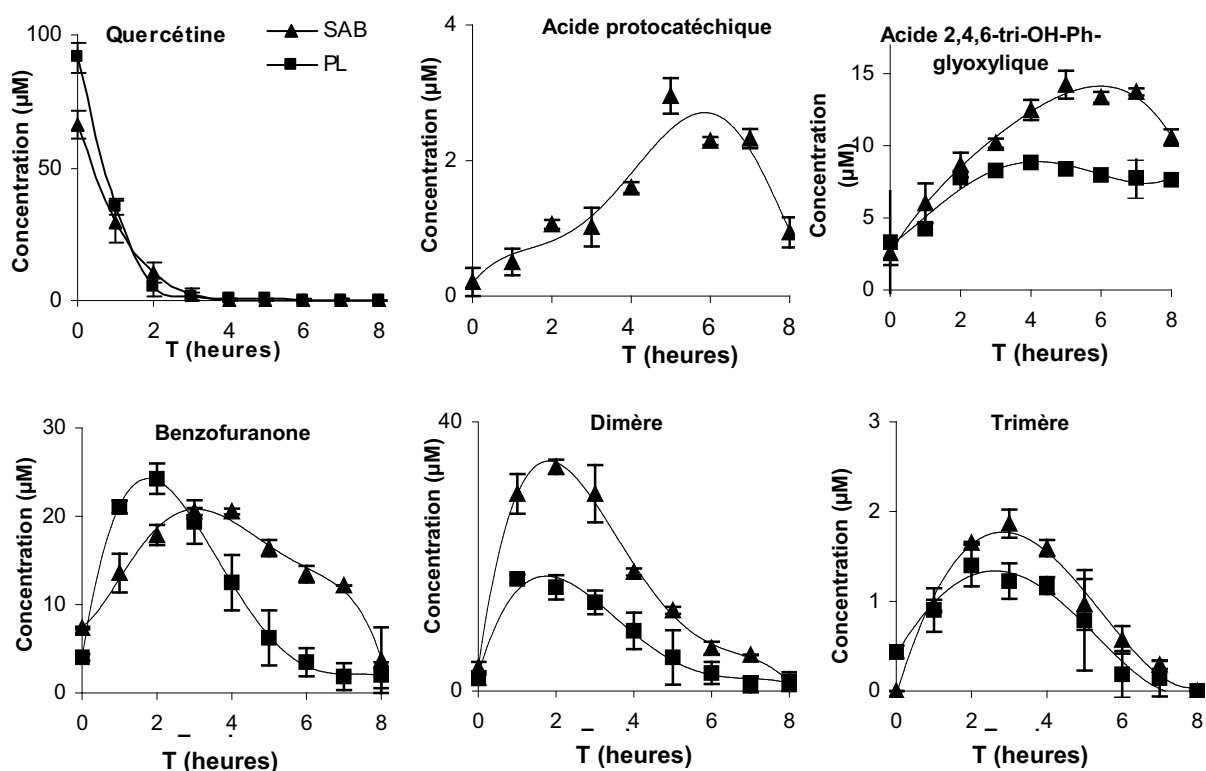


Figure-II-35. Cinétiques d'apparition des composés d'oxydation de la quercétine ($100 \mu\text{M}$ à pH 5,8), dans le modèle-SAB (triangle) et dans le modèle-PL (carré).

Il semble que dans le modèle-SAB les composés d'oxydation soient produits en plus fortes concentrations que dans les milieux contenant les PL. Cette remarque n'est pas tout à fait vérifiée dans le cas de la benzofuranone. Il est possible que l'extraction de cette molécule dans le modèle-SAB ne

soit pas totale (comme pour la quercétine extraite seulement à 65 %), en raison de son affinité pour la SAB. A $t = 2$ heures, la quercétine est largement dégradée ([quercétine] = 5-10 μM dans le modèle-PL et SAB respectivement). On observe que son premier produit de dégradation, la benzofuranone, est alors présente dans le milieu à une concentration de 24 μM . Le dimère ($T_r = 15$ min) apparaît également rapidement avec une concentration maximale atteinte à 2 heures dans les deux modèles. On peut donc supposer que la benzofuranone et le dimère sont produits par deux voies indépendantes. En revanche, l'acide protocatéchique et l'acide 2,4,6-trihydroxyphénylglyoxylique n'apparaissent en fortes concentrations qu'à partir de 5 ou 6 heures d'oxydation. Ainsi ces deux composés seraient formés par la dégradation de la benzofuranone dont la concentration décline dès 3-4 heures.

La Figure-II-36 représente les mécanismes d'oxydation possible de la quercétine. Le radical aryloxy (QH^\bullet) est généré par l'arrachage d'un atome H sur l'un des OH labiles de la quercétine (O3-H, O3'-H, O4'-H). L'arrachage d'un second atome d'hydrogène ou la dismutation des radicaux aryloxy conduit à une *o*-quinone et une *p*-méthylènequinone tautomères. Deux voies distinctes sont alors possibles selon le nucléophile (eau ou quercétine).

Suite à l'addition d'une molécule d'eau sur l'intermédiaire *p*-méthylènequinone, il se forme un composé de type benzopyranone, rapidement converti en une forme plus stable de structure benzofuranone. La coupure oxydante de celle-ci conduit aux acides protocatéchique (3,4-dihydroxybenzoïque) et 2,4,6-trihydroxyphénylglyoxylique.

En présence de fortes concentrations de quercétine, la quercétine elle-même peut jouer le rôle du nucléophile. Son addition via le noyau catéchol sur la *p*-méthylènequinone serait un premier mécanisme expliquant la formation du dimère. L'apparition d'une bande d'absorption vers 300-304 nm sur le spectre UV est caractéristique de la déconjugaison du noyau C qui se produit lors de la formation de ces composés (Annexe-2).

En milieu organique, un second mécanisme a été envisagé. Il suppose que la dimérisation se déroule via une réaction concertée de Diels-Alder entre la forme *o*-quinone et la double liaison C2-C3 du cycle C d'une autre unité quercétine [71].

Enfin, le couplage d'un radical aryloxy (issu de l'arrachement de l'atome H en O4'-H) avec un radical centré sur C2 (provenant du radical aryloxy issu de l'arrachement de l'atome H en O3-H) serait un troisième mécanisme expliquant la formation du dimère de la Figure-II-36. Il a été observé que la réaction de la quercétine avec des protéines héminiques conduisait à une oligomérisation très rapide du flavonol impliquant les radicaux de la quercétine [72].

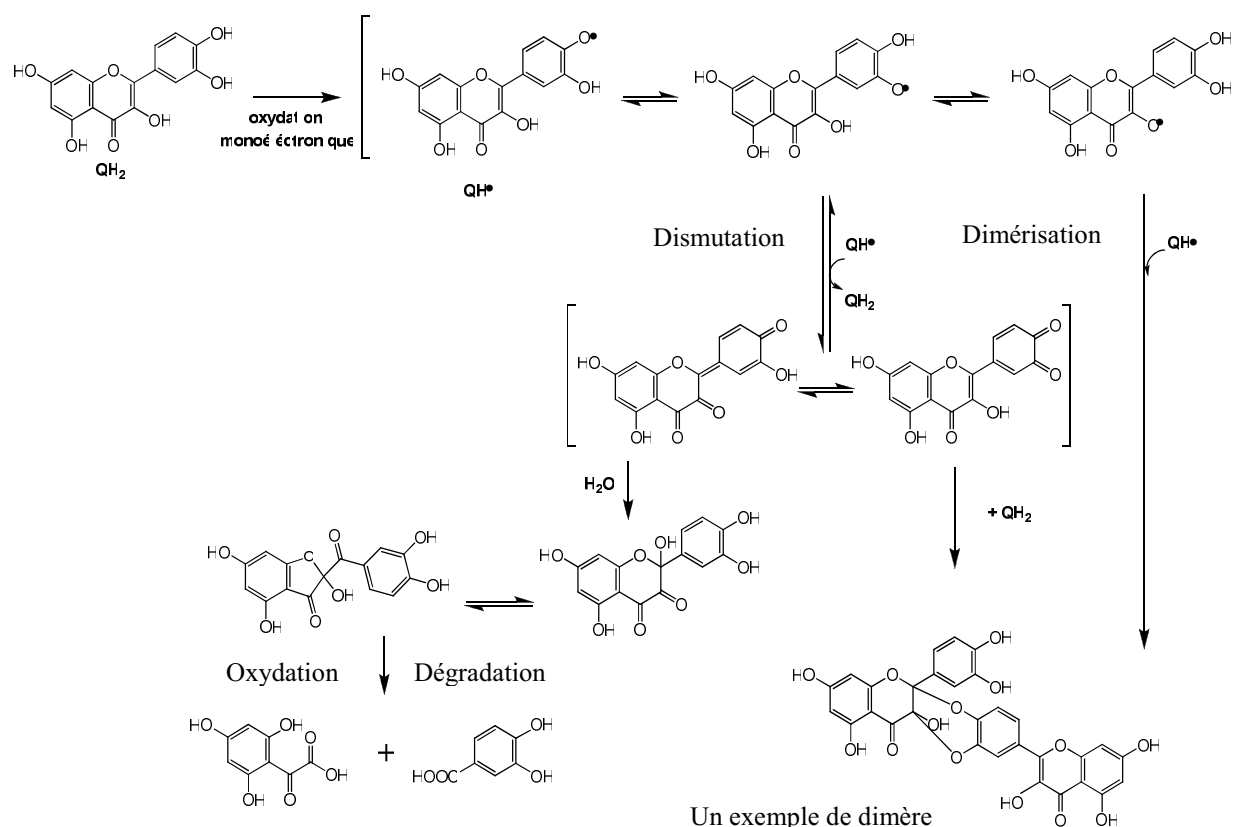


Figure-II-36. Mécanismes d'oxydation de la quercétine par MbFe^{III} à pH 5,8 et à 37°C.

Le composé de structure benzofuranone, l'acide protocatéchique, un dimère et un trimère de quercétine ont aussi été détectés dans l'oignon, suite à l'autoxydation de la quercétine. Ils ont été identifiés par spectrométrie de masse et leurs structures ont été confirmées par RMN (sauf pour le trimère) [73]. Dans une étude de l'inhibition par la quercétine de processus de nitration dans la salive humaine, la benzofuranone (caractérisée par son spectre UV) a également été détectée [74].

Nous avons pu vérifier que la dégradation de la benzofuranone conduisait essentiellement à la formation des composés de temps de rétention 5,8 et 7,2 minutes correspondant respectivement aux acides protocatéchique et 2,4,6-trihydroxyphénylglyoxylique (Figure-II-37).

En revanche, le suivi de la consommation de l'acide protocatéchique n'a pas permis de mettre en évidence ses produits d'oxydation.

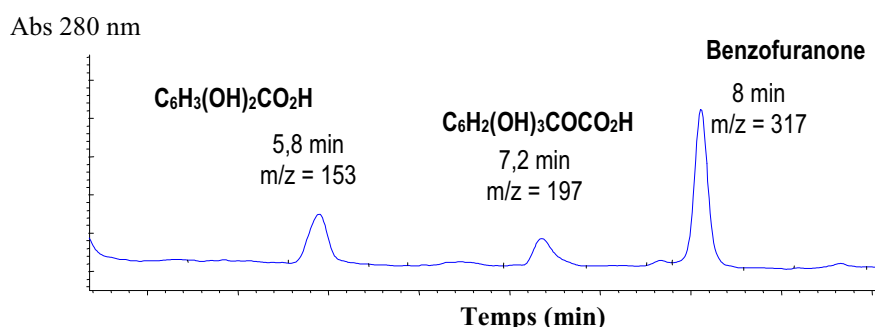


Figure-II-37. Chromatogramme CLHP de la dégradation de la benzofuranone, $\lambda = 280$ nm, à $t = 2$ h.

c) Pouvoir antioxydant de quelques produits d'oxydation de la quercétine

Comme on peut le voir sur la Figure-II-36, la majorité des produits d'oxydation identifiés possèdent un noyau catéchol (1,2-dihydroxybenzène). Ce noyau est réducteur (en raison de la stabilité du radical semiquinone auquel il conduit) et confère aux molécules identifiées un pouvoir antioxydant. Certaines études ont d'ailleurs pu vérifier que les composés issus de l'oxydation de la quercétine et notamment l'acide protocatéchique, la benzofuranone et le dimère de quercétine (dans une moindre mesure) possédaient un pouvoir antioxydant [73, 75-78].

L'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (acide protocatéchique) est commercialisé et le composé de type benzofuranone a été synthétisé dans l'équipe en oxydant la quercétine par le chlorure de cuivre ([36] travaux de Claire Dufour et Michèle Loonis). Ces composés ont donc été introduits dans les deux modèles et leur pouvoir antioxydant a été évalué dans les mêmes conditions que pour la quercétine à pH 5,8. Les résultats exprimés en aire relative sont présentés sur la Figure-II-38 et la Figure-II-39.

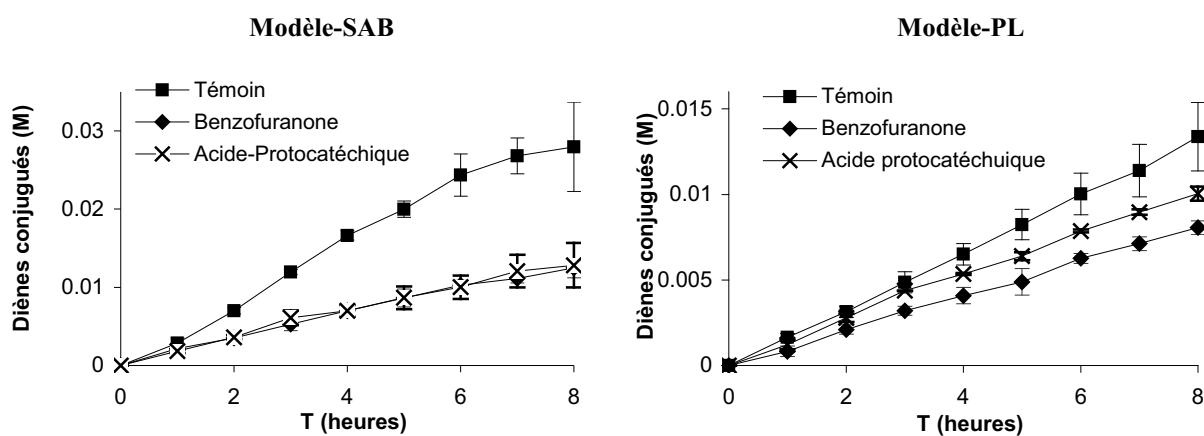


Figure-II-38. Inhibition de la formation des diènes conjugués en présence de $100 \mu\text{M}$ de benzofuranone ou d'acide protocatéchique (3,4-dihydroxybenzoïque) dans le modèle-SAB et dans le modèle-PL, $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5,8$ et $T = 37^\circ\text{C}$.

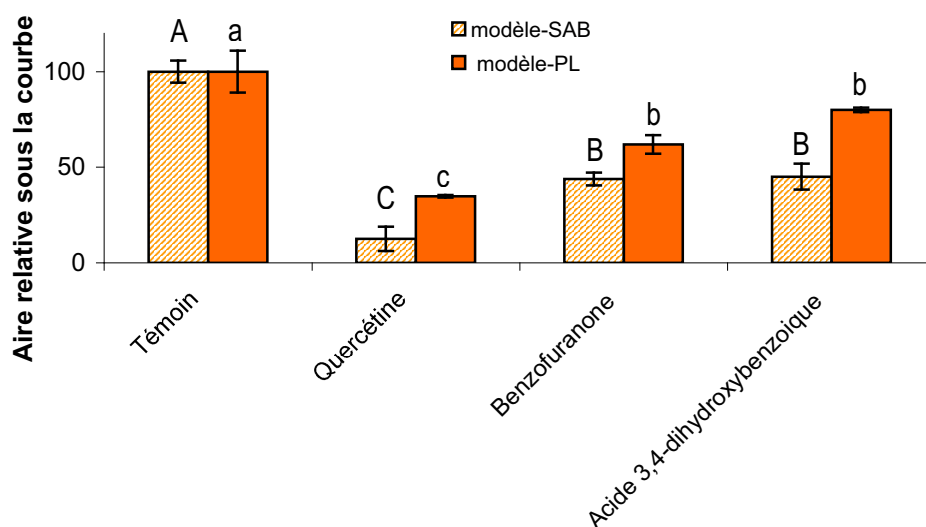


Figure-II-39. Pouvoir antioxydant du dérivé benzofuranone, de l'acide protocatéchique (3,4-dihydroxybenzoïque) et de la quercétine. Les lettres indiquent des groupes de composés significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer) pour un intervalle de confiance de 95% (C). $[MbFe^{III}] = 20 \mu M$, pH = 5,8 et T = 37°C

L'effet protecteur des deux produits d'oxydation est très significatif dans les deux modèles ($p < 0,0001$). Le dérivé benzofuranone et l'acide protocatéchique possèdent un pouvoir antioxydant équivalent. Dans les deux modèles, ces deux composés sont cependant de moins bons inhibiteurs de la peroxydation lipidique que la quercétine. Ce résultat est en accord avec les valeurs des potentiels rédox mesurés par voltamétrie cyclique (acétonitrile) : le potentiel de la benzofuranone (+ 0,69 V) est plus élevé que celui de la quercétine (+ 0,47 V) du fait de la perte de conjugaison au niveau du cycle C [36].

Les produits d'oxydation de la quercétine, notamment le dérivé benzofuranone et l'acide protocatéchique, possèdent donc un pouvoir antioxydant propre. Ils contribuent au pouvoir antioxydant global évalué pour la quercétine, ce qui explique pourquoi la quercétine est un très bon antioxydant en général, dont l'effet protecteur persiste même après sa consommation.

III.3.2 Oxydation de la rutine dans les émulsions à pH 5,8

La dégradation de la rutine ($\lambda_{max} = 365 \text{ nm}$) au cours du temps a été suivie de la même façon que pour la quercétine. Sa disparition est beaucoup plus lente que celle de la quercétine. Après 8 heures de peroxydation lipidique, la rutine à la concentration initiale de 200 μM n'est pas totalement consommée (Figure-II-40).

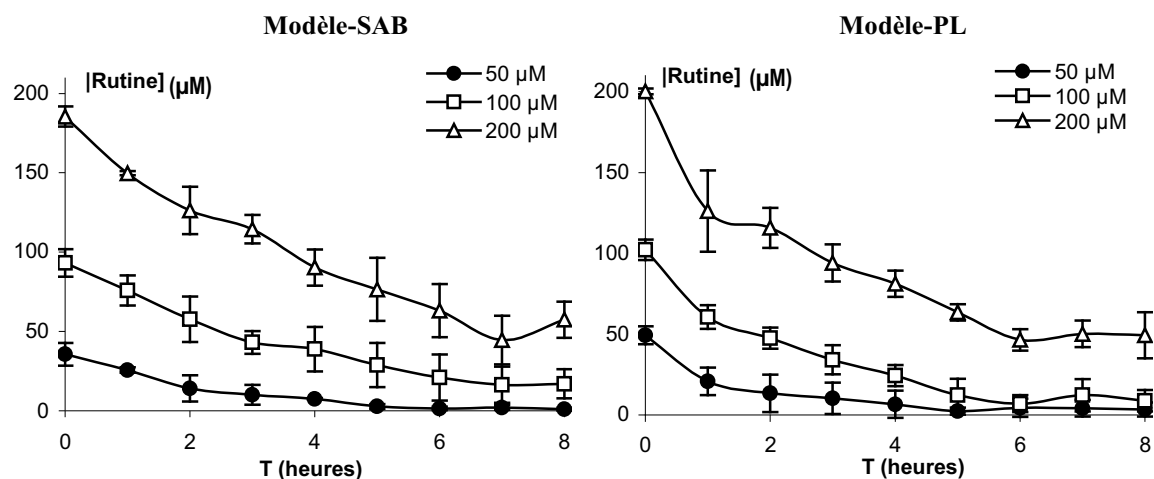


Figure-II-40. Dégradation oxydante de la rutine, dans les deux modèles à pH = 5,8. T = 37 °C. [MbFe^{III}] = 20 µM.

Il a souvent été remarqué que la rutine présentait une stabilité bien plus importante vis-à-vis de l'oxydation que son aglycone, la quercétine. En effet, la glycosylation du groupement OH du cycle C abaisse fortement le caractère réducteur du noyau flavonol [80, 81].

Comme nous l'avons observé pour la quercétine, l'extraction de la rutine n'est que partielle dans le modèle-SAB (92,5 %, 93 % et 72 % aux concentrations de 200, 100 et 50 µM respectivement) alors qu'elle est totale dans le modèle-PL. Ce résultat traduit l'association entre la rutine et la SAB. Le rendement d'extraction est cependant bien meilleur qu'avec la quercétine en accord avec l'affinité moindre de la rutine pour la SAB.

Dans l'analyse CLHP, trois pics importants ont été observés à des Tr inférieurs à celui de la rutine, laissant supposer que les nouveaux composés sont plus polaires que la rutine (Tableau-II-11). Les spectres de masse obtenus révèlent des masses environ deux fois plus importantes que celle de la rutine, en accord avec des structures dimériques. En outre, les spectres UV présentent une bande d'absorption vers 300 nm, indicative de la déconjugaison du noyau C. Le composé de Tr = 10,5 min serait également un dimère dont l'un des fragment correspond au produit d'addition d'une molécule d'eau sur la forme o-quinone de la rutine (m/z = 625 et PM = 626,5). Malheureusement, en raison de l'oxydation lente de la rutine, les signaux enregistrés sont très faibles et ces propositions restent hypothétiques. Les spectres UV et de masse des composés, quand il a été possible de les obtenir, sont présentés en Annexe 3.

Tableau-II-11. Hypothèses de structures des produits de dégradation de la rutine.

Tr (min)	Voltage du cône (V)	λ max (nm)	m/z	Abondance relative (%)	Hypothèse structurale des fragments	Type de produit proposé	Nom commun
9,4	25	300-360, 256	1247	35	[M-H] ⁻ ?	Structure dimérique? <i>Manque de sensibilité</i>	
9,7	25	300-360, 256	?	?	?	Structure dimérique? <i>Manque de sensibilité</i>	
10,5	25	308, 256	1204 625	35 100	[M-H] ⁻ ? [AH ₂ -2H+H ₂ O-H] ⁻ ?	Structure dimérique? <i>Manque de sensibilité</i>	
11,9	50	354, 256	609 301	100 8	[M-H] ⁻	Monomère	Rutine

Certains auteurs ont également étudié l'oxydation de la rutine, montrant que plusieurs composés, plus polaires que la molécule parent, étaient formés au cours du temps [82]. Il n'existe à l'heure actuelle aucune information sur la structure des produits d'oxydation de la rutine. Seul l'intermédiaire *o*-quinone, formé lors de l'oxydation de la rutine par le DPPH et le CAN, a été mis en évidence [83, 84].

III.3.3 Oxydation de la (+)-catéchine dans les émulsions à pH 5,8

La dégradation de la (+)-catéchine a été suivie en CLHP à 280 nm. Comme pour la quercétine, son oxydation est rapide et terminée en 4 et 2 heures pour des concentrations initiales de 100 et 50 μ M respectivement (Figure-II-41). L'extraction de la catéchine est totale dans les deux modèles, ce qui suggère qu'elle ne développe pas d'interactions fortes avec la SAB.

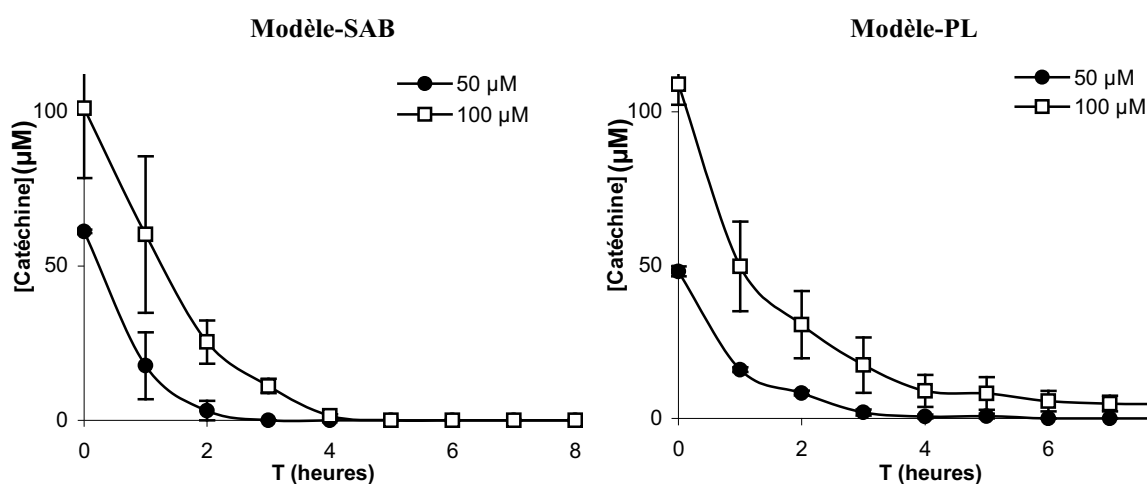


Figure-II-41. Dégradation oxydante de la (+)-catéchine, dans les deux modèles à pH = 5,8. T = 37 °C. [MbFe^{III}] = 20 μ M.

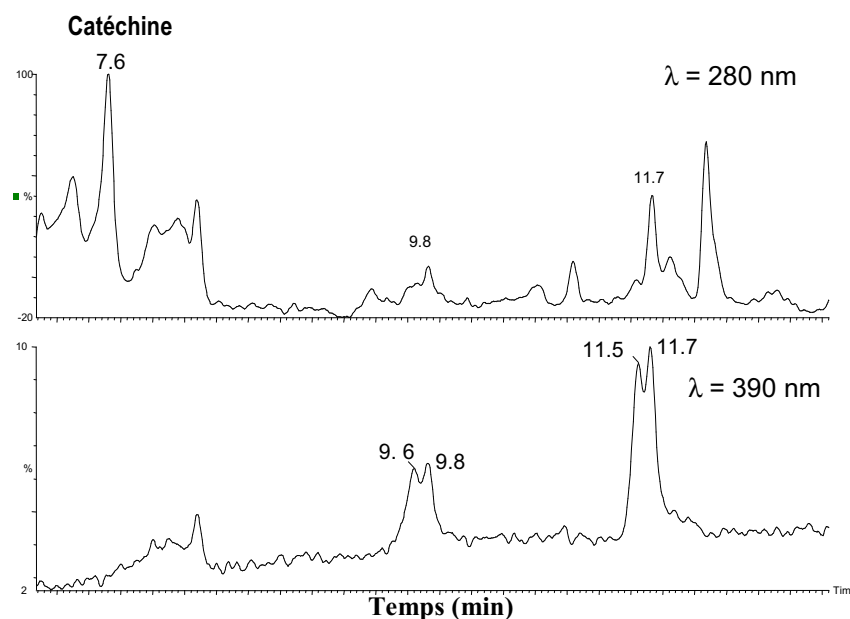


Figure-II-42. Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de la (+)-catéchine, à t = 4 h.

L'oxydation de la (+)-catéchine donne lieu à la formation de nombreux produits d'oxydation (Figure-II-42). La faible concentration des produits néoformés permet seulement de détecter l'ion parent $[M-H]^-$ en spectrométrie de masse. Par comparaison avec d'autres études portant sur l'oxydation des catéchines [85-87], nous avons toutefois pu mettre en évidence que l'évolution principale est la dimérisation. En effet, deux dimères oxydés ont été caractérisés (masse 576 Da), l'un possède une absorption maximale à 420 nm, l'autre à 386 nm (Annexe 4 et Tableau-II-12). Ces pics sont dédoublés sur les chromatogrammes enregistrés en raison d'un artefact dû au solvant CH_3CN qui a été vérifié par injection d'une solution de catéchine pure.

Tableau-II-12. Hypothèses de structures des produits de dégradation de la (+)-catéchine.

Tr (min)	Voltage du cône (V)	λ max (nm)	m/z	Abondance relative (%)	Hypothèse structurale des fragments	Type de produit proposé	Nom commun
7,6	25	278	289 245	100 18	$[M-H]^-$ $[M-CO_2-H]^-$	AH_2	(+)-Catéchine
9,6 et 9,8	25	420	575	100	$[M-H]^-$	$(AH)_2-2H$	Dimère oxydé coloré 1 de (+)-catéchine
11,5 et 11,7	25	386	575	100	$[M-H]^-$	$(AH)_2-2H$	Dimère oxydé coloré 2 de (+)-catéchine

Ces deux dimères oxydés et colorés ont déjà été observés dans plusieurs études portant sur l'oxydation de la (+)-catéchine par voie chimique ou enzymatique. Ils sont formés en plusieurs étapes. Tout d'abord, un dimère de type biaryle incolore est formé suite à l'attaque nucléophile du carbone C-6 ou C-

8 d'une unité catéchine sur les atomes électrophiles C-2' et C-6' du cycle B d'une autre catéchine préalablement oxydée sous forme o-quinone. Le noyau catéchol nouvellement formé s'oxyde à son tour et la *p*-méthylènequinone ainsi formée subit l'addition nucléophile intramoléculaire de groupes OH à proximité (Figure-II-43) [85-87]. Dans les deux types de dimères, un noyau catéchol est présent, ce qui laisse supposer qu'ils possèdent des propriétés antioxydantes. Ils sont effectivement consommés à leur tour et doivent donc contribuer à l'activité inhibitrice globale de la catéchine.

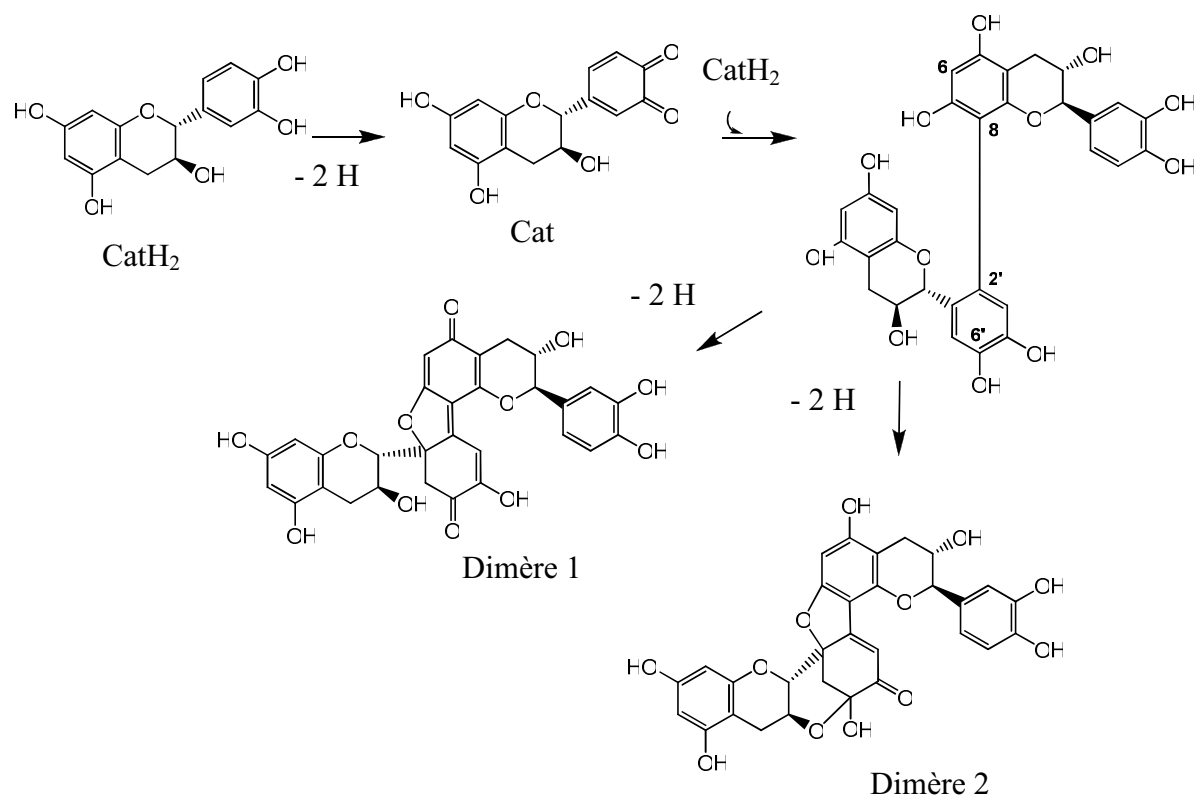


Figure-II-43. Mécanismes d'oxydation de la (+)-catéchine par MbFe^{III} à pH 5,8 et à 37°C.

Les deux dimères apparaissent en concentrations plus importantes dans le modèle-PL que dans le modèle-SAB (Figure-II-44). Leurs formations sont simultanées puisque leurs concentrations maximales sont atteintes après 2 heures d'oxydation dans le modèle-PL et après 3 heures d'oxydation dans le modèle-SAB. De plus, les aires mesurées à 400 nm sont équivalentes pour les deux dimères, ce qui suggère qu'aucune voie de dimérisation ne prévaut.

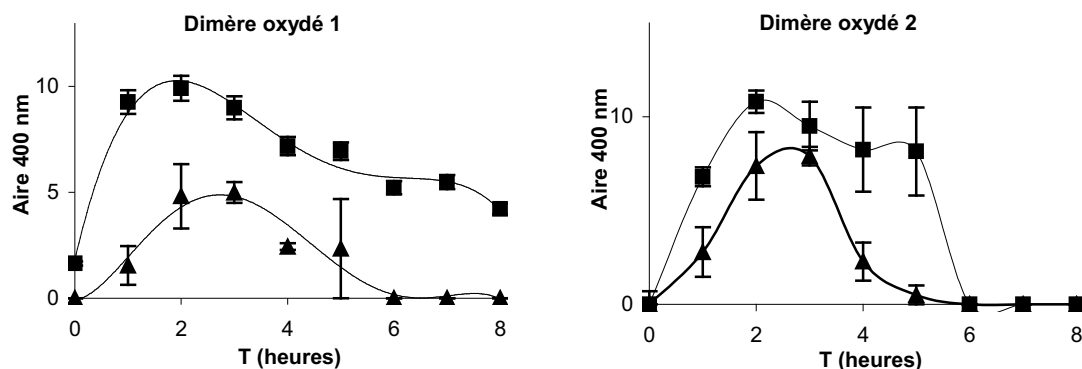


Figure-II-44. Cinétiques d'apparition des composés d'oxydation de la (+)-catéchine (concentration de 100 μM à pH 5,8) dans le modèle-SAB (triangle) et dans le modèle-PL (carré).

III.3.4 Oxydation de l'acide caféique dans les émulsions à pH 5,8

La dégradation de l'acide caféique a été suivie par analyse CLHP avec détection à 330 nm. Cette dégradation est totale après environ 6 et 3 heures pour des concentrations initiales de 100 et 50 μM respectivement (Figure-II-45). L'acide caféique est extrait quantitativement, ce qui indique qu'il n'est pas fortement associé à la SAB.

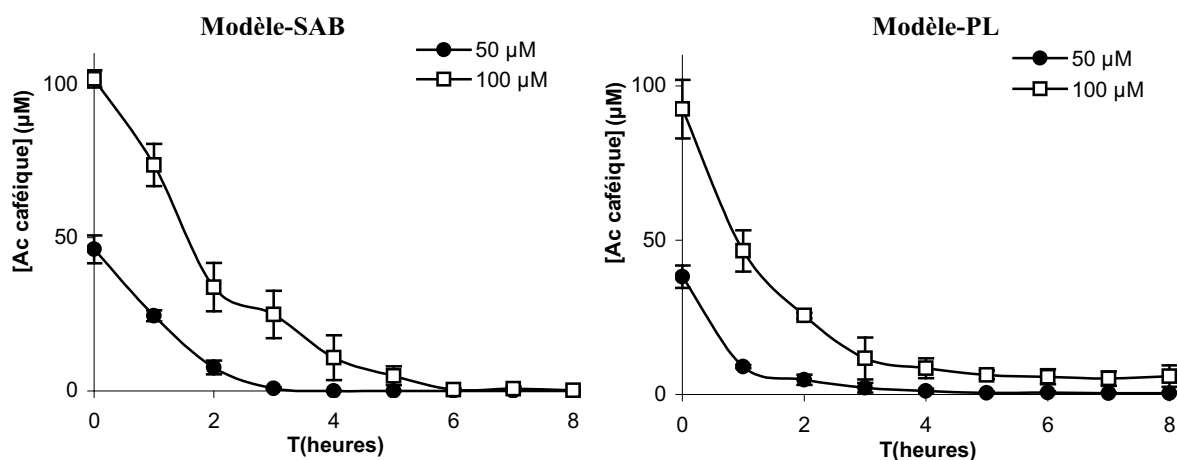


Figure-II-45. Dégradation oxydante de l'acide caféique dans les deux modèles à pH = 5,8 et à T = 37 °C. $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 20 \mu\text{M}$.

L'analyse des chromatogrammes avec détection UV-vis et par spectrométrie de masse (Figure-II-46) des échantillons d'émulsion oxydée contenant l'acide caféique nous a permis de retrouver deux des structures identifiées par Roche *et al.* [88, 89]. Ainsi, l'acide caféique conduit à la formation de dimères ayant conservé une absorption à 320 nm caractéristique des acides hydroxycinnamiques. Deux types de dimères seraient formés, l'un avec une liaison C-C forte entre les monomères (dimère de type

C-C ou biaryle), l'autre avec une liaison C-O plus fragile (dimère de type C-O ou biaryléther) (Tableau-II-13 et Annexe 5). Ces deux dimères ont conservé au moins un noyau catéchol, ce qui laisse supposer qu'ils contribuent au pouvoir antioxydant global de l'acide caféique.

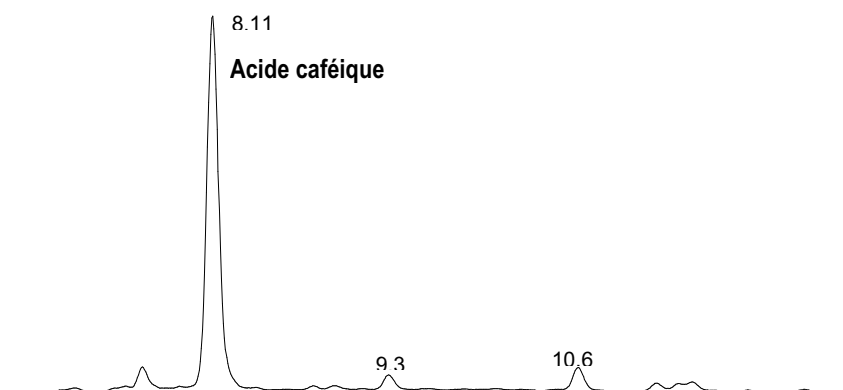


Figure-II-46. Chromatogramme CLHP des produits d'oxydation de l'acide caféique, $\lambda = 280$ nm, à $t = 4$ h.

La fragmentation obtenue au voltage de 25V souligne la fragilité du dimère C-O par rapport au dimère C-C. Elle permet notamment de produire le fragment monomérique d'origine ($m/z = 179$) qui n'est pas observé pour le dimère C-C. Le dimère C-C étant plus hydrophile que le dimère C-O (un groupement OH est consommé dans la formation de la liaison C-O), il est logiquement élué en premier sur la colonne chromatographique de silice greffée C18.

Tableau-II-13. Hypothèses de structures des produits de dégradation de l'acide caféique.

Tr (min)	Voltage du cône (V)	λ max (nm)	m/z	Abondance relative (%)	Hypothèse structurale des fragments	Type de produit proposé	Nom commun
8,1	25	324 295	179	75	[M-H] ⁻	AH ₂	Acide caféique
			135	100	[M-CO ₂ -H] ⁻		
9,3	25	326	313	35	[M-CO ₂ -H] ⁻	(AH) ₂	Dimère C-C
			269	100	[M-2CO ₂ -H] ⁻		
10,6	25	325	313	5	[M-CO ₂ -H] ⁻	(AH) ₂	Dimère C-O
			269	8	[M-2CO ₂ -H] ⁻		
			179	98	[AH ₂ -H] ⁻		
			177	18	[M-AH ₂ -H] ⁻		
			135	100	[AH ₂ -CO ₂ -H] ⁻		

III.3.5 Oxydation de l'acide chlorogénique dans les émulsions à pH 5,8

L'oxydation de l'acide chlorogénique est légèrement plus progressive que celle de l'acide caféique (Figure-II-47). De ce fait, l'intensité des produits d'oxydation issus de l'acide chlorogénique est trop faible pour permettre leur identification par CLHP-SM. Cependant, il a été montré dans la partie III.2.4 que l'acide caféique et l'acide chlorogénique exercent une activité antioxydante équivalente dans

les deux modèles. Comme pour l'acide caféique, l'extraction de l'acide chlorogénique est quasi-totale dans les deux modèles.

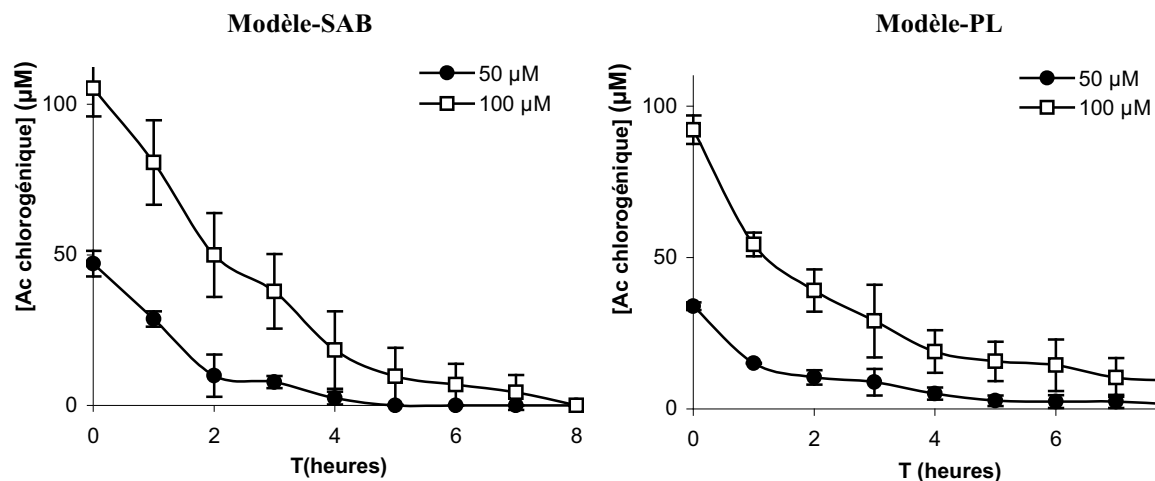


Figure-II-47. Dégradation oxydante de l'acide chlorogénique dans les deux modèles à pH = 5,8. T = 37 °C. [MbFe^{III}] = 20 µM.

III.3.6 Oxydation de l' α -tocophérol dans les émulsions à pH 5,8

La consommation totale de 100 µM d' α -tocophérol dans les émulsions est rapidement atteinte puisqu'en deux heures il n'est plus détectable sur les chromatogrammes. Dans le modèle-SAB, son extraction n'est que partielle (44%), soulignant son association possible avec la SAB. Aucun composé d'oxydation n'a pu être mis en évidence. L' α -tocophérol est le seul antioxydant lipophile de cette série d'expériences. De ce fait, il est localisé dans la phase lipidique ou à l'interface. A la différence des autres antioxydants, il est probablement consommé par réaction directement avec les radicaux oxy et peroxy lipidiques.

III.3.7 Oxydation de l'acide ascorbique dans les émulsions à pH 5,8

Compte tenu de la sensibilité de l'acide ascorbique à l'autoxydation, des prélèvements d'émulsion ont été effectués toutes les dix minutes pour la mesure de la concentration de la vitamine C au cours de l'oxydation. Son extraction est de 75 % dans le modèle-SAB, contrairement au modèle-PL (extraction totale), suggérant une légère association entre l'acide ascorbique et la SAB. Sa consommation est totale dans le modèle-SAB comme dans le modèle-PL au bout de 30 minutes. Cette disparition rapide par autoxydation pourrait être une des raisons à son faible pouvoir antioxydant dans

les émulsions (III.3.3). On peut noter que l'autoxydation de l'ascorbate peut impliquer MbFe^{III} et s'accompagner de la production d'ERO (effet pro-oxydant). Un mécanisme possible consiste en la réduction de MbFe^{III} en MbFe^{II} (myoglobine) par l'ascorbate puis en la ré-oxydation de MbFe^{II} en MbFe^{III} par le dioxygène avec production de superoxyde.

III.3.8 Oxydation de la quercétine, de la rutine et de l'acide chlorogénique dans les émulsions à pH 4

La consommation de la quercétine, de la rutine et de l'acide chlorogénique a été évaluée à pH 4, pour une concentration initiale de 100 µM de chaque composé.

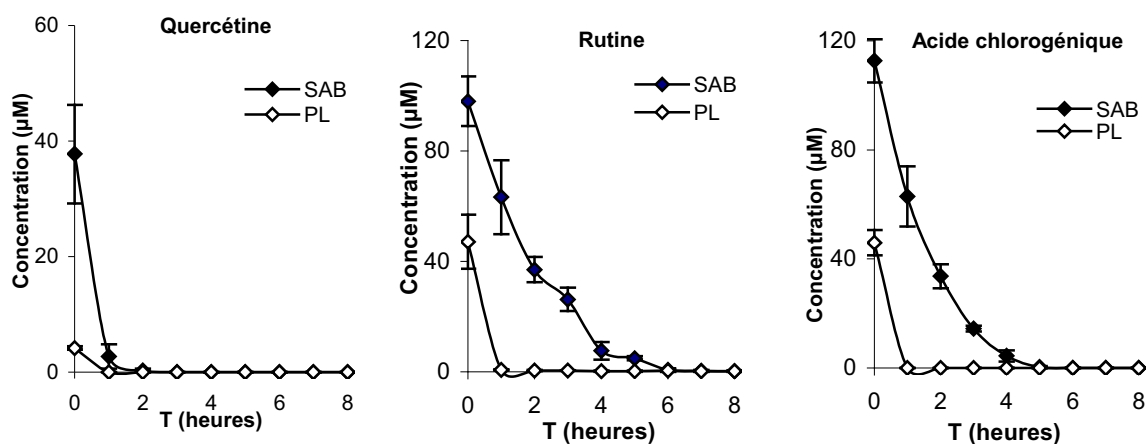


Figure-II-48. Dégradation oxydante de la quercétine, de la rutine et de l'acide chlorogénique dans les deux modèles à pH = 4. T = 37 °C. [MbFe^{III}] = 20 µM.

La consommation des trois composés étudiés est accélérée par la diminution du pH (Figure-II-48). Dans le modèle-SAB, la quercétine est totalement oxydée en 2 heures à pH 4 (3 heures à pH 5,8 (III.3.1)), la rutine en 5 heures (7 heures à pH 5,8 (III.3.2)) et l'acide chlorogénique en 4 heures (8 heures à pH 5,8 (III.3.5)). Dans le modèle-PL l'oxydation est si rapide qu'aucun composé n'est observé après une heure d'oxydation. Étonnement les rendements d'extraction à pH 4 sont faibles variant de 5 à 40 % selon les composés phénoliques. La répétition des expériences avec injection directe de l'échantillon après extraction a permis de vérifier que la dégradation continue des composés phénoliques au cours de la conservation des échantillons à - 20 °C n'était pas en cause. Il se peut qu'à pH 4, l'hème (ou une forme dégradée) débarrassé de la partie globine réagisse instantanément avec les composés conduisant à leur dégradation rapide.

III.4 Conclusion

Dans les deux modèles mis au point pour simuler le bol alimentaire en conditions gastriques, la peroxydation lipidique est initiée efficacement par la metmyoglobine. Cette protéine hémunique a été choisie pour simuler un stress oxydant d'origine alimentaire puisqu'elle constitue la principale forme de fer de la viande rouge. L'oxydation de l'huile de tournesol constituant la phase lipidique de nos modèles entraîne la formation rapide de composés diéniques (hydroperoxydes et alcools) et de nombreux volatils de type aldéhydes, cétones ou alcools à courte chaîne.

Dans ces modèles, des concentrations alimentaires (25-100 μ M) de différents composés phénoliques (quercétine, rutine, (+)-catéchine, acide caféique, acide chlorogénique, α -tocophérol) et d'acide ascorbique inhibent efficacement la peroxydation lipidique initiée par la metmyoglobine à pH 5,8. Dans tous les cas, la quercétine s'est montrée l'antioxydant le plus performant. L'analyse de ses produits d'oxydation a mis en évidence un composé de type benzofuranone, les acides 3,4-dihydroxybenzoïque et 2,4,6-trihydroxyphénylglyoxylique ainsi que des dimères et trimères. Le pouvoir antioxydant de la benzofuranone et de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque ont pu être vérifiés dans les deux modèles. Ainsi, l'activité antioxydante très élevée de la quercétine est la résultante de son activité propre et de celle de ses composés d'oxydation.

En revanche, la baisse du pH (pH 4) a entraîné une diminution notable de l'inhibition de la peroxydation lipique par l'ensemble des composés testés. La première modification marquante qui intervient lors de l'abaissement du pH de 5,8 à 4 est la dénaturation de la metmyoglobine qui libère ainsi son cofacteur, l'hématine, qui est l'initiateur effectif à pH 4. Enfin, des modifications de l'état de charge de la SAB et, dans une moindre mesure, des antioxydants eux-mêmes pourraient affecter la localisation des antioxydants et les interactions qu'ils développent. Dans le modèle-PL, aucun composé n'est capable d'inhiber la peroxydation lipidique tandis que dans le modèle-SAB un faible pouvoir antioxydant subsiste.

Grâce à l'élaboration de modèles chimiques du bol alimentaire, ce chapitre a permis de montrer que l'oxydation lipidique a toutes chances de se produire dans des conditions gastriques réelles. Cette oxydation est rapide et peut conduire à la formation de nombreux dérivés lipidiques à chaînes intactes et des produits de coupure plus ou moins volatils. Ces produits d'oxydation peuvent être absorbés à travers la barrière intestinale et sont potentiellement toxiques pour l'organisme comme cela a été rappelé dans l'étude bibliographique. Les composés antioxydants testés ont été choisis pour leur

abondance parmi les fruits et légumes et produits dérivés (vin, thé). Ils peuvent donc être ingérés au cours d'un repas, simultanément à l'ingestion de lipides. D'après nos résultats, établis à partir de modèles simples du contenu gastrique, ils permettraient d'inhiber l'oxydation lipidique. Cependant, leur action ne semble efficace qu'à un pH faiblement acide, tel que le pH de la première heure de la digestion. La baisse du pH tout au long de l'étape de digestion entraînerait ensuite une diminution du pouvoir antioxydant des composés ingérés. En fonction de sa composition (richesse en protéines, en lipides, en phospholipides, etc...), le repas ingéré modulerait lui aussi le pouvoir antioxydant des composés. Un autre point très important de nos modèles est qu'ils mettent en évidence la possibilité d'un catabolisme oxydant très efficace pour les antioxydants de l'alimentation lorsque ceux-ci sont consommés avec des lipides polyinsaturés et du fer héminique. La biodisponibilité et les effets santé potentiels des produits d'oxydation des composés phénoliques de l'alimentation susceptibles de s'accumuler dans le compartiment gastrique sont des aspects totalement inconnus à ce jour et qui, sans aucun doute, mériteraient d'être étudiés.

Après ce chapitre descriptif, des études plus fondamentales de l'oxydation de la sérum albumine dans les émulsions, de sa capacité à complexer les antioxydants et à moduler l'activation de la metmyoglobine par les hydroperoxydes, sont nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes à l'œuvre dans les émulsions. Elles font l'objet du chapitre suivant.

Références bibliographiques

1. Chemat F, Grondin I, Costes P, Moutoussamy L, Shum A, Sing ASC, Smadja J. **High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil.** *Ultrasonics Sonochemistry* 2004,11:281-285.
2. Chemat F, Grondin I, Shum A, Sing C, Smadja J. **Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound.** *Ultrasonics Sonochemistry* 2004,11:13-15.
3. Genot C, Meynier A, Riaublanc A. **Lipid oxidation in emulsions.** In: *Lipid oxidation pathways.* Edited by Kamal-Eldin. Champaign: AOCS Press; 2003.
4. Frankel EN, Satue-Gracia T, Meyer AS, German JB. **Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:2094-2099.
5. Villière A. **Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des protéines:** Thèse de la Faculté des Sciences et des Techniques de Nantes; 2005.
6. McClements DJ, Decker EA. **Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems.** *Journal of Food Science* 2000,65:1270-1282.
7. Osborn H, Akoh C. **Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions.** *Food Chemistry* 2004,84:451-456.
8. Ke PJ, Ackman RG. **Bunsen coefficient for oxygen in marine oils at various temperature determined by an exponential dilution method with a polarographic oxygen electrode.** *Journal of the American Oil Chemists' Society:* 50 (11) 429-435 1973,50:429-435.
9. Battino R, Evans FD, Danforth WF. **Solubilities of 7 Gases in Olive Oil with Reference to Theories of Transport through Cell Membrane.** *Journal of the American Oil Chemists Society* 1968,45:830-&.
10. Mancuso JR, McClements DJ, Decker EA. **The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999,47:4112-4116.
11. Mei L, McClements DJ, Decker EA. **Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999,47:2267-2273.
12. Villiere A, Viau M, Bronnec I, Moreau N, Genot C. **Oxidative stability of bovine serum albumin- and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:1514-1520.
13. Silvestre MPC, Chaiyasit W, Brannan RG, McClements DJ, Decker EA. **Ability of surfactant headgroup size to alter lipid and antioxidant oxidation in oil-in-water emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000,48:2057-2061.
14. Fomuso LB, Corredig M, Akoh CC. **Effect of emulsifier on oxidation properties of fish oil-based structured lipid emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:2957-2961.
15. Mei LY, McClements DJ, Wu JN, Decker EA. **Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl.** *Food Chemistry* 1998,61:307-312.
16. Heins A, McPhail DB, Sokolowski T, Stockmann H, Schwarz K. **The location of phenolic antioxidants and radicals at interfaces determines their activity.** *Lipids* 2007,42:573-582.
17. Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. **Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants - bulk oils vs emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994,42:1054-1059.

18. Dangles O. **Propriétés chimiques des polyphénols**. In: *Les polyphénols en agroalimentaire*. Edited by Sarni-Manchado P, Cheynier V. Paris: Lavoisier; 2006:29-54.
19. Almajano MP, Carbo R, Delgado ME, Gordon MH. **Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid**. *Journal of Food Science* 2007,72:C258-C263.
20. Frankel EN, Shu-Wen H, Aeschbach R, Prior E. **Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996,44:131-135.
21. Almajano MP, Delgado ME, Gordon MH. **Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions**. *Food Chemistry* 2007,102:1375-1382.
22. Medina I, Tombo I, Satue-Gracia MT, German JB, Frankel EN. **Effects of natural phenolic compounds on the antioxidant activity of lactoferrin in Liposomes and oil-in-water emulsions**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:2392-2399.
23. Almajano MP, Gordon MH. **Synergistic effect of BSA on antioxidant activities in model food emulsions**. *Journal of the American Oil Chemists Society* 2004,81:275-280.
24. Gaillard O. **La myoglobine. Myoglobin**. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2003,18:64-66.
25. Baron CP, Andersen HJ. **Myoglobin-induced lipid oxidation : a review**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:3887-3897.
26. Garcia MN, Martinez-Torres C, Leets I, Tropper E, Ramirez J, Layrisse M. **Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: iron absorption in humans from diets containing cooked meat fractions**. *Journal of Nutritional Biochemistry* 1996,7:49-54.
27. Igene JO, King JA, Pearson AM, Gray JI. **Influence of heme pigments, nitrite, and non-heme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1979,27:838-842.
28. Dosi R, Maro Ad, Chambery A, Colonna G, Costantini S, Geraci G, Parente A. **Characterization and kinetics studies of water buffalo (*Bubalus bubalis*) myoglobin**. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology* 2006,145:230-238.
29. Kanner J, Lapidot T. **The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants**. *Free Radical Biology and Medicine* 2001,31:1388-1395.
30. Reeder BJ, Wilson MT. **The effects of pH on the mechanism of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide consumption by myoglobin: A role for the protonated ferryl species**. *Free Radical Biology and Medicine* 2001,30:1311-1318.
31. Rao SI, Wilks A, Hamberg M, Demontellano PRO. **The lipoxygenase activity of myoglobin - Oxidation of linoleic-acid by the ferryl oxygen rather than protein radical**. *Journal of Biological Chemistry* 1994,269:7210-7216.
32. Baron CP, Skibsted LH, Andersen HJ. **Concentration effects in myoglobin-catalyzed peroxidation of linoleate**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:883-888.
33. Baron CP, Skibsted LH, Andersen HJ. **Prooxidative activity of myoglobin species in linoleic acid emulsions**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997,45:1704-1710.
34. Vulcain E, Goupy P, Caris-Veyrat C, Dangles O. **Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: action in the aqueous vs. lipid phase**. *Free Radical Research* 2005,39:547-563.
35. Goupy P, Vulcain E, Caris-Veyrat C, Dangles O. **Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism**. *Free Radical Biology and Medicine* 2007,43:933-946.

36. Jungbluth G, Ruhling I, Ternes W. **Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous media.** *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 2000;1946-1952.
37. Pryor WA, Castle L. **Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxydes.** In: *Oxygen Radicals in Biological Systems*. Edited by Packer L. Orlando Academic Press; 1984:293-295.
38. Zommara M, Tachibana N, Mitsui K, Nakatani N, Sakono M, Ikeda I, Imaizumi K. **Inhibitory effect of ethanolamine plasmalogen on iron-dependent and copper-dependent lipid-peroxidation.** *Free Radical Biology and Medicine* 1995;18:599-602.
39. Hidalgo FJ, Leon MM, Zamora R. **Antioxidative activity of amino phospholipids and phospholipid/amino acid mixtures in edible oils as determined by the Rancimat method.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54:5461-5467.
40. Hidalgo FJ, Nogales F, Zamora R. **Changes produced in the antioxidative activity of phospholipids as a consequence of their oxidation.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:659-662.
41. Roginsky V, Zheltukhina GA, Nebolsin VE. **Efficacy of metmyoglobin and hemin as a catalyst of lipid peroxidation determined by using a new testing system.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:6798-6806.
42. Soo Min K, Dong Uk A, Sam Kyung S. **Effect of free iron, heme pigments, and iron storage proteins on the oxidation of lipids in oil emulsion.** *Foods and Biotechnology* 1996;5:215-219.
43. Neff WE, Byrdwell WC. **Characterization of model triacylglycerol (triolein, trilinolein and trilinolenin) autoxidation products via high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 1998;818:169-186.
44. Landy P, Courthaudon JL, Dubois C, Voilley A. **Effect of interface in model food emulsions on the volatility of aroma compounds.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996;44:526-530.
45. Jelen HH, Obuchowska M, Zawirska-Wojtasiak R, Wasowicz E. **Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48:2360-2367.
46. Keszler A, Heberger K, Gude M. **Identification of volatile compounds in sunflower oil by headspace SPME and ion-trap GC/MS.** *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* 1998;21:368-370.
47. Guillen MD, Goicoechea E. **Formation of oxygenated [alpha],[beta]-unsaturated aldehydes and other toxic compounds in sunflower oil oxidation at room temperature in closed receptacles.** *Food Chemistry* 2008;111:157-164.
48. Keszler A, Kriska T, Nemeth A. **Mechanism of volatile compound production during storage of sunflower oil.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48:5981-5985.
49. Borkowski T, Szymusiak H, Gliszczynska-Swiglo A, Rietjens I, Tyrakowska B. **Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:5526-5534.
50. Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers A, Rietjens I. **The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones.** *Free Radical Biology and Medicine* 2001;31:869-881.
51. Kumamoto M, Sonda T, Nagayama K, Tabata M. **Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2001;65:126-132.
52. Ren J, Meng S, Lekka CE, Kaxiras E. **Complexation of flavonoids with iron: Structure and optical signatures.** *Journal of Physical Chemistry B* 2008;112:1845-1850.

53. Yoshino M, Murakami K. **Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization.** *Analytical Biochemistry* 1998,257:40-44.
54. Engelmann MD, Hutcheson R, Cheng IF. **Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3',4'-dihydroxyflavone.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:2953-2960.
55. Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, Toscano M. **Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006,54:6343-6351.
56. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Celik SE. **Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay.** *Microchimica Acta* 2008,160:413-419.
57. Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. **Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical.** *Talanta* 2007,71:230-235.
58. Zhang J, Stanley RA, Adaim A, Melton LD, Skinner MA. **Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants.** *Molecular Nutrition & Food Research* 2006,50:996-1005.
59. Chaillou LL, Nazareno MA. **New method to determine antioxidant activity of polyphenols.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006,54:8397-8402.
60. Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, Simic MG. **Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?** *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 1996:2497-2504.
61. Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Bovo S. **On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use.** *International Journal of Pharmaceutics* 1999,188:233-241.
62. Cuvelier ME, Lagunes-Galvez L, Berset C. **Do antioxidants improve the oxidative stability of oil-in-water emulsions?** *Journal of the American Oil Chemists Society* 2003,80:1101-1105.
63. Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. **Flavonoids as antioxidants.** *Journal of the American Chemical Society* 1994,116:4846-4851.
64. Peters T. **All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications.**: Academic Press; 1995.
65. Lehninger A. **Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires, 2nde édition:** Flammarion Médecine Sciences; 1977.
66. Becker EM, Ntouma G, Skibsted LH. **Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation.** *Food Chemistry* 2007,103:1288-1296.
67. Marinova E, Toneva A, Yanishlieva N. **Synergistic antioxidant effect of [alpha]-tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil.** *Food Chemistry* 2008,106:628-633.
68. Pekkarinen SS, Heinonen IM, Hopia AI. **Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999,79:499-506.
69. Dufour C, Dangles O. **Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy.** *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 2005,1721:164-173.
70. Fabre N, Rustan I, de Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. **Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2001,12:707-715.
71. Krishnamachari V, Levine LH, Zhou C, Pare PW. **In vitro flavon-3-ol oxidation mediated by a B ring hydroxylation pattern.** *Chemical Research in Toxicology* 2004,17:795-804.

72. Cherviakovsky EM, Bolibrukh DA, Baranovsky AV, Vlasova TM, Kurchenko VP, Gilep AA, Usanov SA. **Oxidative modification of quercetin by heme proteins.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006,342:459-464.
73. Ly TN, Hazama C, Shimoyamada M, Ando H, Kato K, Yamauchi R. **Antioxidative compounds from the outer scales of onion.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:8183-8189.
74. Takahama U, Hirota S, Oniki T. **Quercetin-dependent scavenging of reactive nitrogen species derived from nitric oxide and nitrite in the human oral cavity: Interaction of quercetin with salivary redox components.** *Archives of Oral Biology* 2006, In Press, Corrected Proof:629-639.
75. Hirota S, Takahama U, Tram Ngoc L, Yamauchi R. **Quercetin-dependent inhibition of nitration induced by peroxidase/H₂O₂/nitrite systems in human saliva and characterization of an oxidation product of quercetin formed during the inhibition.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:3265-3272.
76. Gulsen A, Makris DP, Kefalas P. **Biomimetic oxidation of quercetin: Isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its in vitro antioxidant properties.** *Food Research International* 2007,40:7-14.
77. Dufour C, Loonis M. **Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2007,1770:958-965.
78. Dufour C, Loonis M, Dangles O. **Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin.** *Free Radical Biology and Medicine* 2007,43:241-252.
79. Jorgensen LV, Cornett C, Justesen U, Skibsted LH, Dragsted LO. **Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring.** *Free Radical Research* 1998,29:339-350.
80. Buchner N, Krumbein A, Rohn S, Kroh LW. **Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006,20:3229-3235.
81. Makris DP, Rossiter JT. **Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000,48:3830-3838.
82. Makris DP, Rossiter JT. **An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols.** *Food Chemistry* 2002,77:177-185.
83. Krishnamachari V, Levine LH, Pare PW. **Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: A unified mechanism for quercetin radical scavenging.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:4357-4363.
84. Dangles O, Fargeix G, Dufour C. **One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media.** *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 1999:1387-1395.
85. Guyot S, Vercauteren J, Cheynier V. **Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase.** *Phytochemistry* 1996,42:1279-1288.
86. Dangles O, Fargeix G, Dufour C. **Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3',4',7-trihydroxyflavylium ion.** *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 2000:1653-1663.
87. Guyot S, Cheynier V, Souquet JM, Moutounet M. **Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995,43:2458-2462.

88. Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. **Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry.** *Organic & Biomolecular Chemistry* 2005,3:423-430.
89. Roche M. **Etude cinétique et mécanismes de l'activité antioxydante des phénols de l'olive dans différents systèmes modèles:** Thèse de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse; 2005.

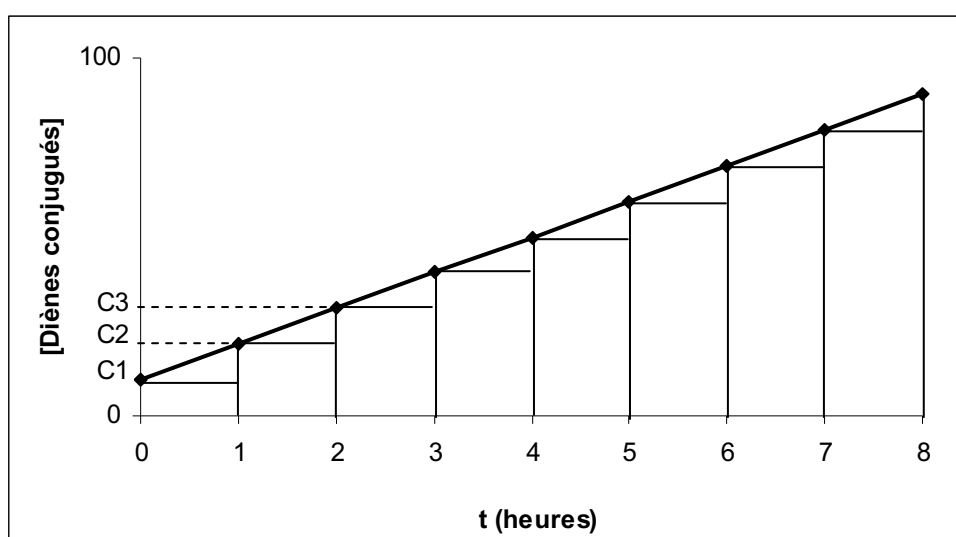
ANNEXES

ANNEXE 1 : Calcul de l'aire sous la courbe [Diènes conjugués] = f(t)

Soit la courbe [Diènes conjugués] = f(t) représentée sur 8 heures, pour 9 points expérimentaux mesurés. L'aire sous cette courbe peut être divisée en huit trapèzes, définis sur 8 intervalles de temps $\Delta t = 1$ heure. Chaque trapèze étant constitué d'un rectangle et d'un triangle, son aire sur un intervalle de temps $\Delta t = t_n - t_{n+1}$ est défini par la relation :

$$(\Delta t \times C_n) + [\Delta t \times (C_{n+1} - C_n)]/2$$

Avec $\Delta t = 1$ heure, on obtient : $C_n + (C_{n+1} - C_n)/2$

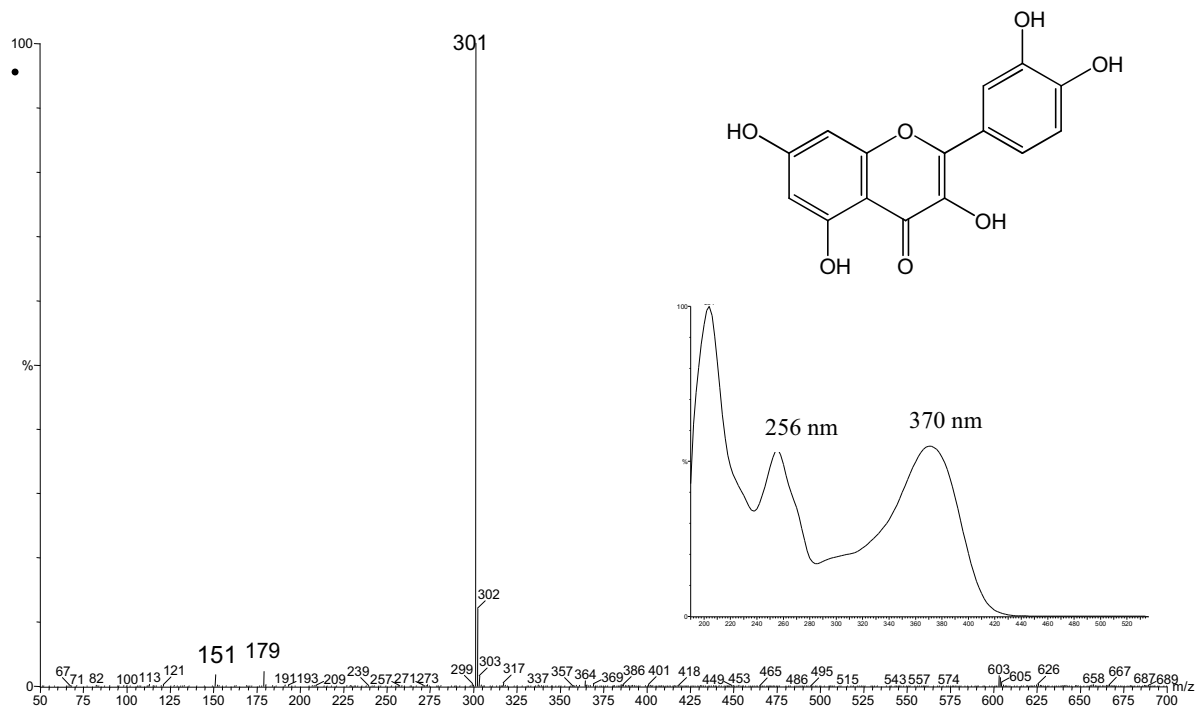


L'aire totale sous la courbe est donc définie par la relation :

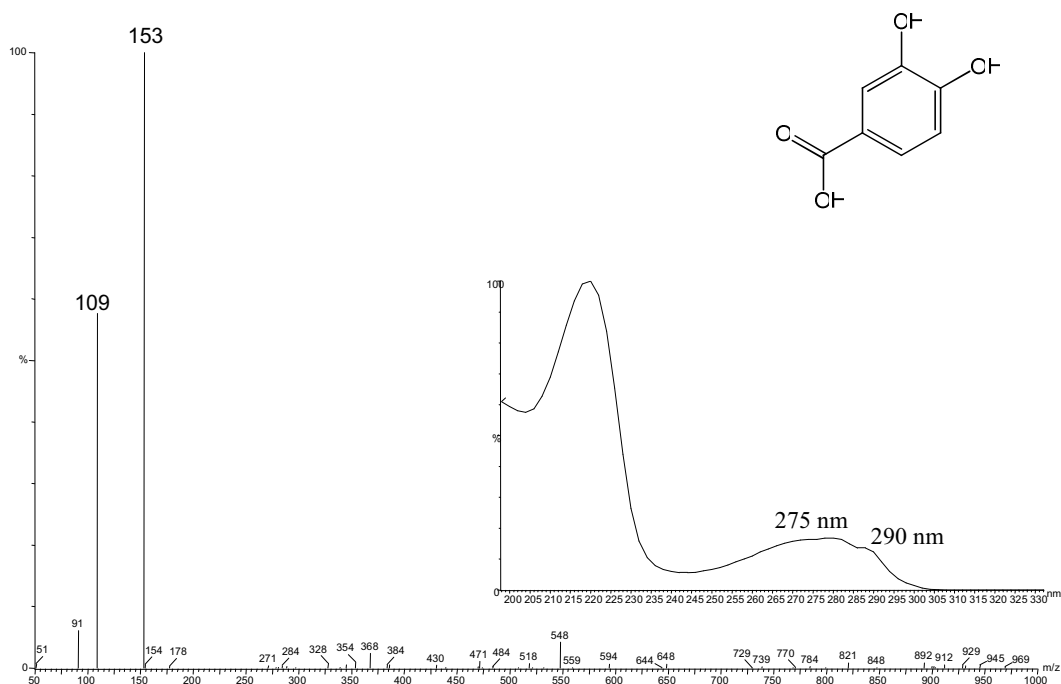
$$\sum_{n=0}^{n=8} (C_n + (C_{n+1} - C_n)/2)$$

ANNEXE 2 : Produits de dégradation de la quercétine

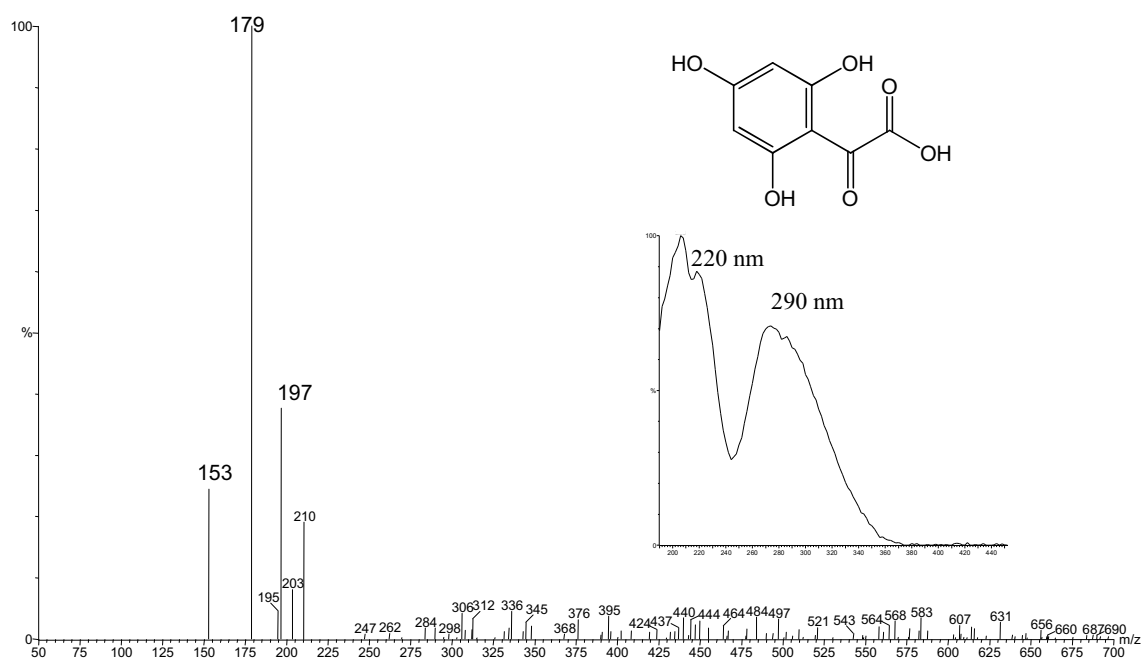
QUERCETINE (C₁₅H₁₀O₇ : PM = 302,24), Tr = 12,2 min (25 V)



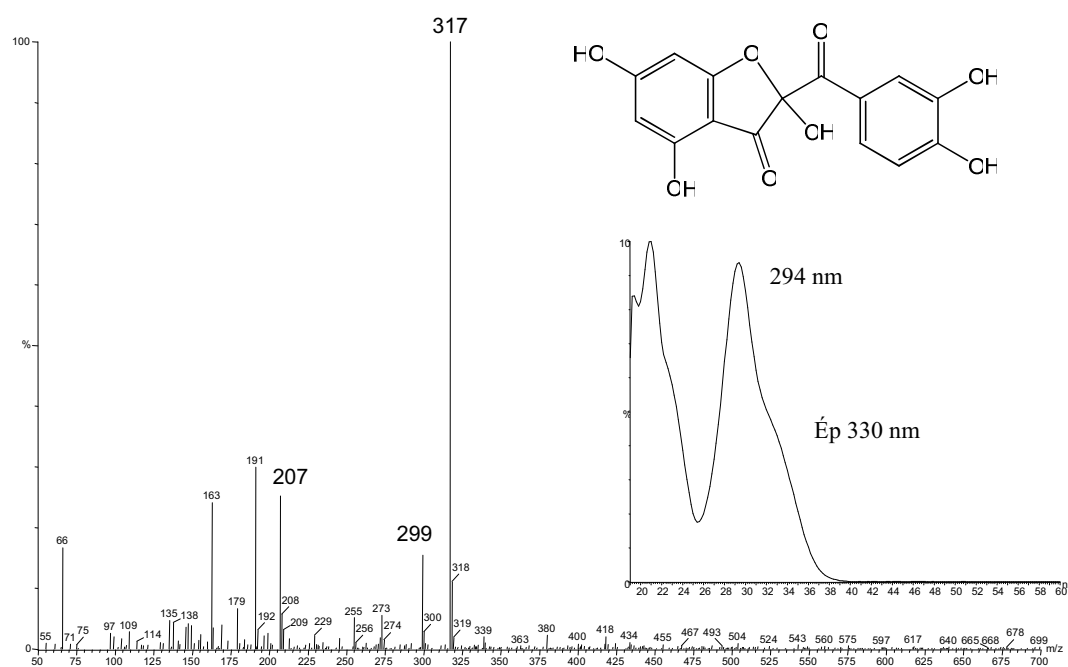
ACIDE PROTOCATECHIQUE (C₇H₆O₄ : PM = 154,12), Tr = 5,8 min (25 V)



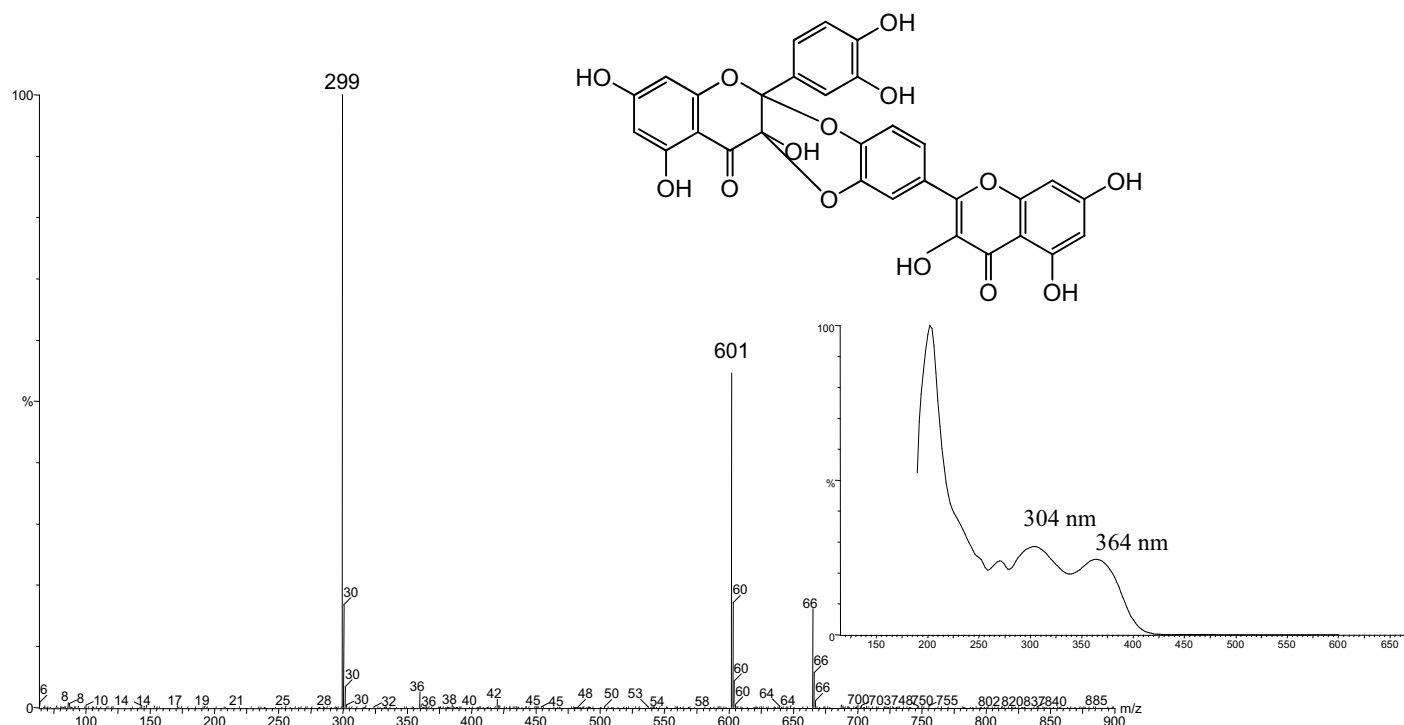
ACIDE 2,4,6-TRIHYDROXYPHENYLGLYOXYLIQUE ($C_8H_6O_6$: PM = 198,13), Tr = 7,2 min (25 V)



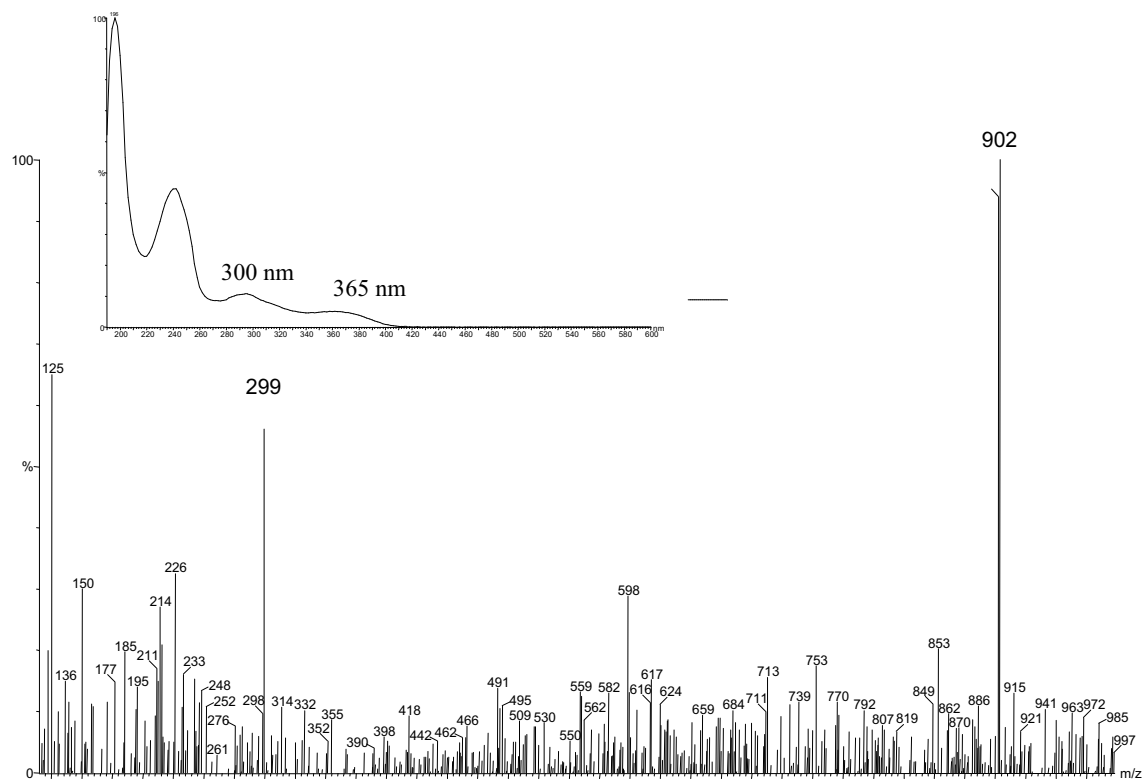
BENZOFURANONE ($C_{15}H_{10}O_8$: PM = 318,24), Tr = 8 min (25 V)



DIMERE DE QUERCETINE (C₃₀H₁₈O₁₄ : PM = 602,46) , Tr = 15 min (25 V)

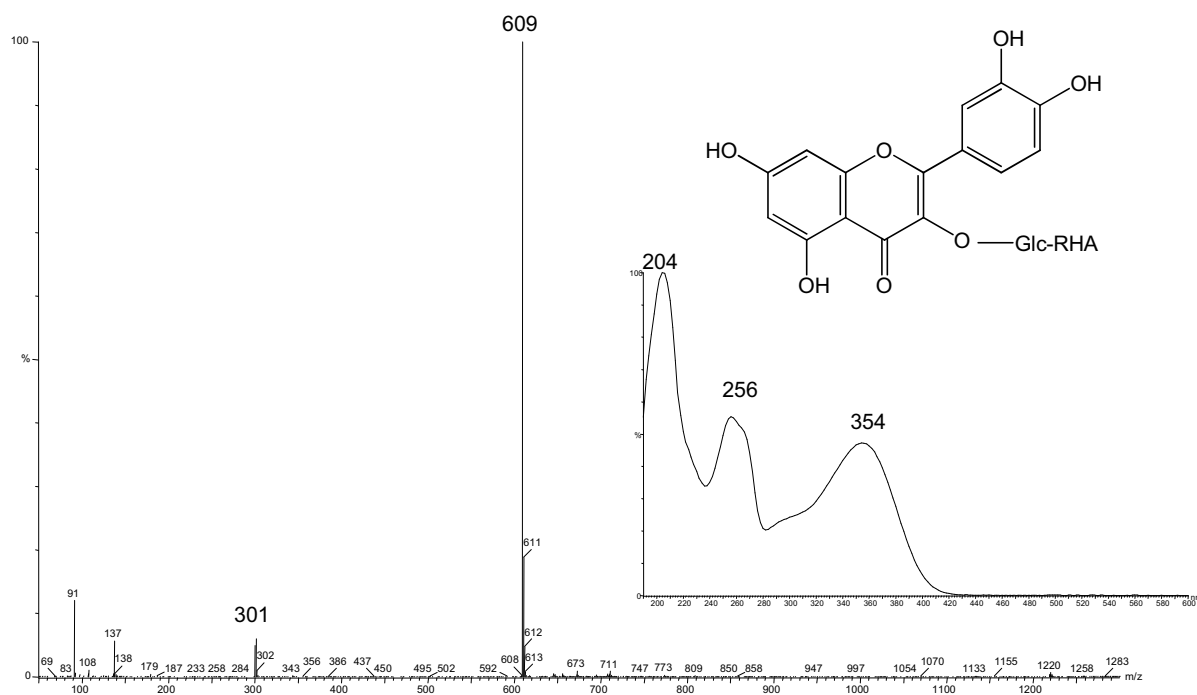


TRIMERE DE QUERCETINE (C₄₅H₂₆O₂₁ : PM = 902,69), Tr = 16,1 min (25 V)

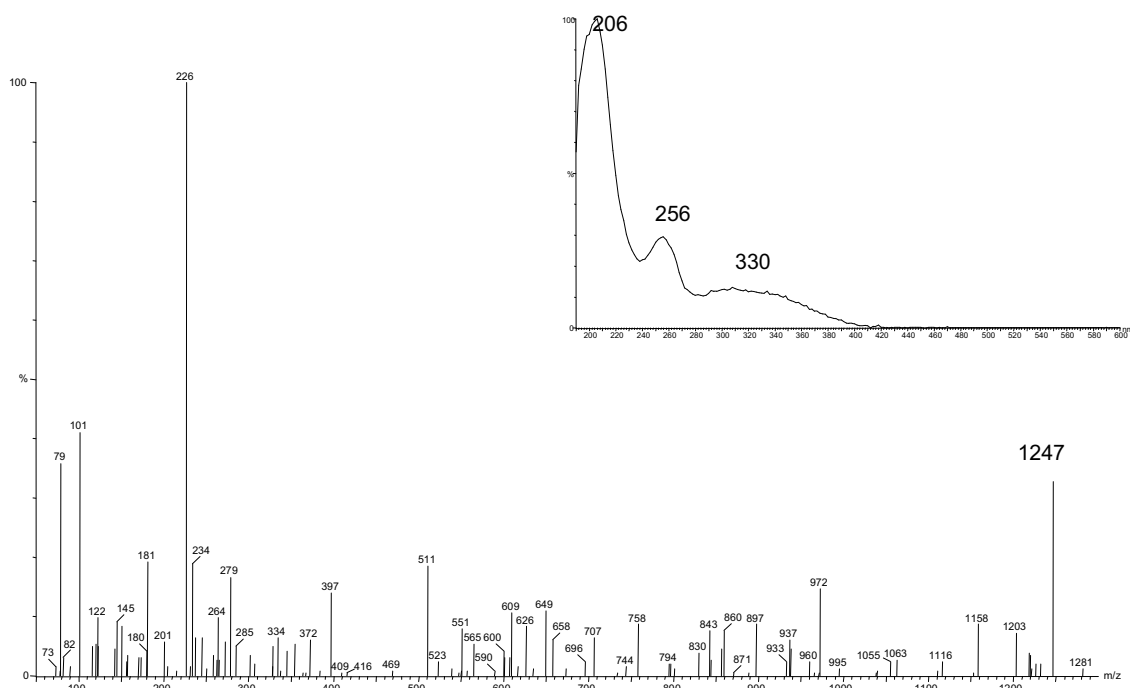


ANNEXE 3 : Produits de dégradation de la rutine

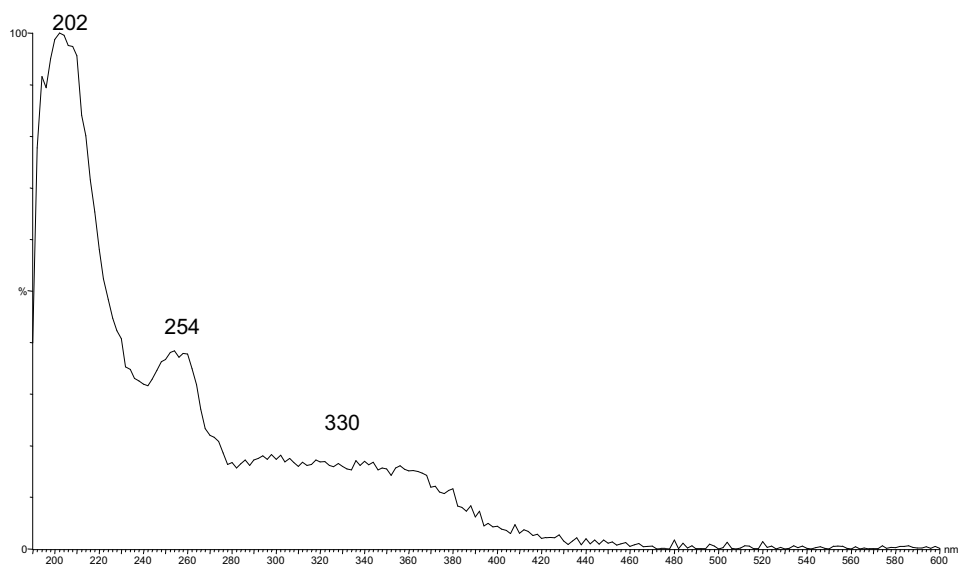
RUTINE (C₂₇H₃₀O₁₆ : PM = 610,53), Tr = 11,9 min (50 V)



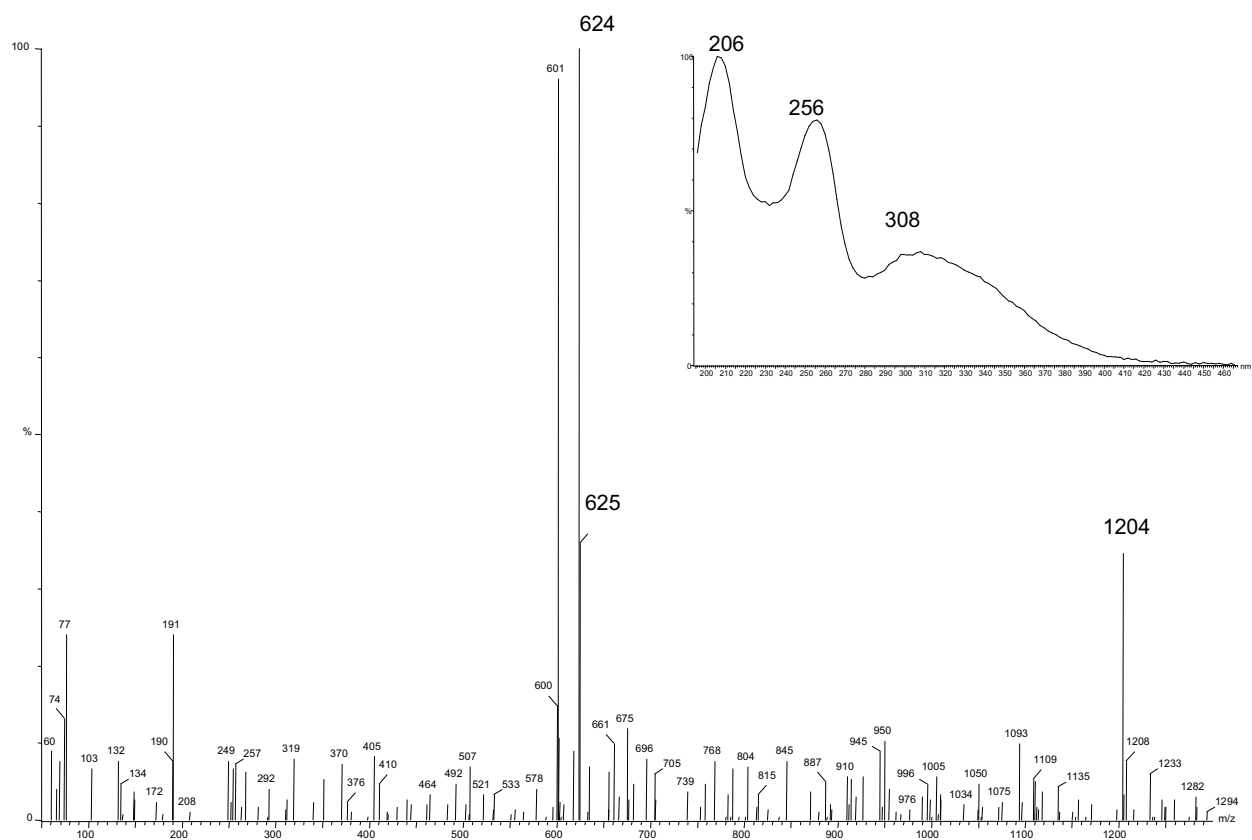
COMPOSE DE DEGRADATION DE LA RUTINE, Tr = 9,4 min (25 V)



COMPOSE DE DEGRADATION DE LA RUTINE, Tr = 9,7 min (spectre de masse non disponible)

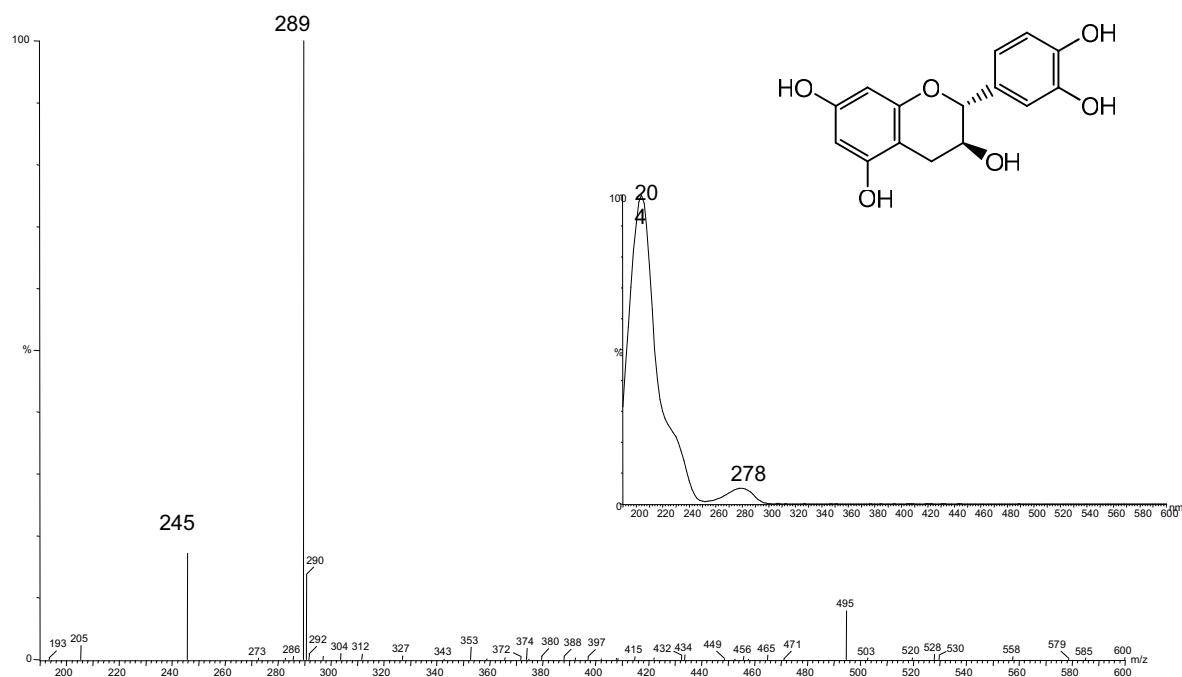


COMPOSE DE DEGRADATION DE LA RUTINE ($C_{27}H_{30}O_{17}$: PM = 626,53 ?), Tr = 10,5 min (25)

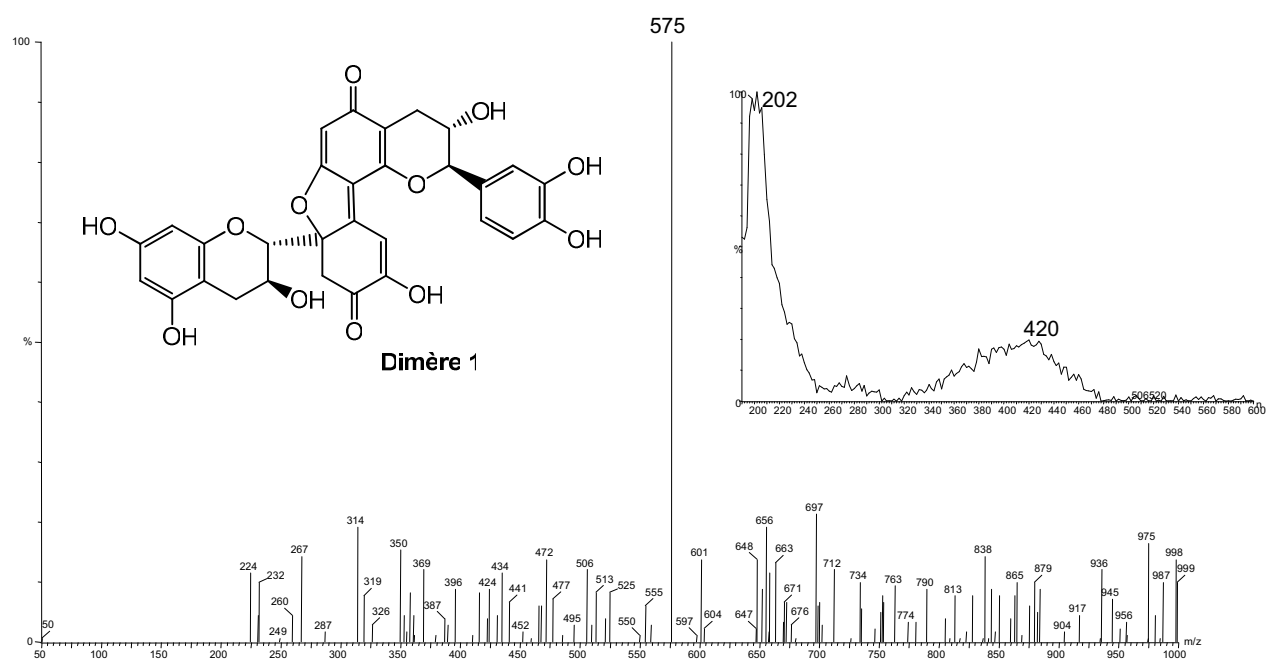


ANNEXE 4 : Produits de dégradation de la (+)-catéchine

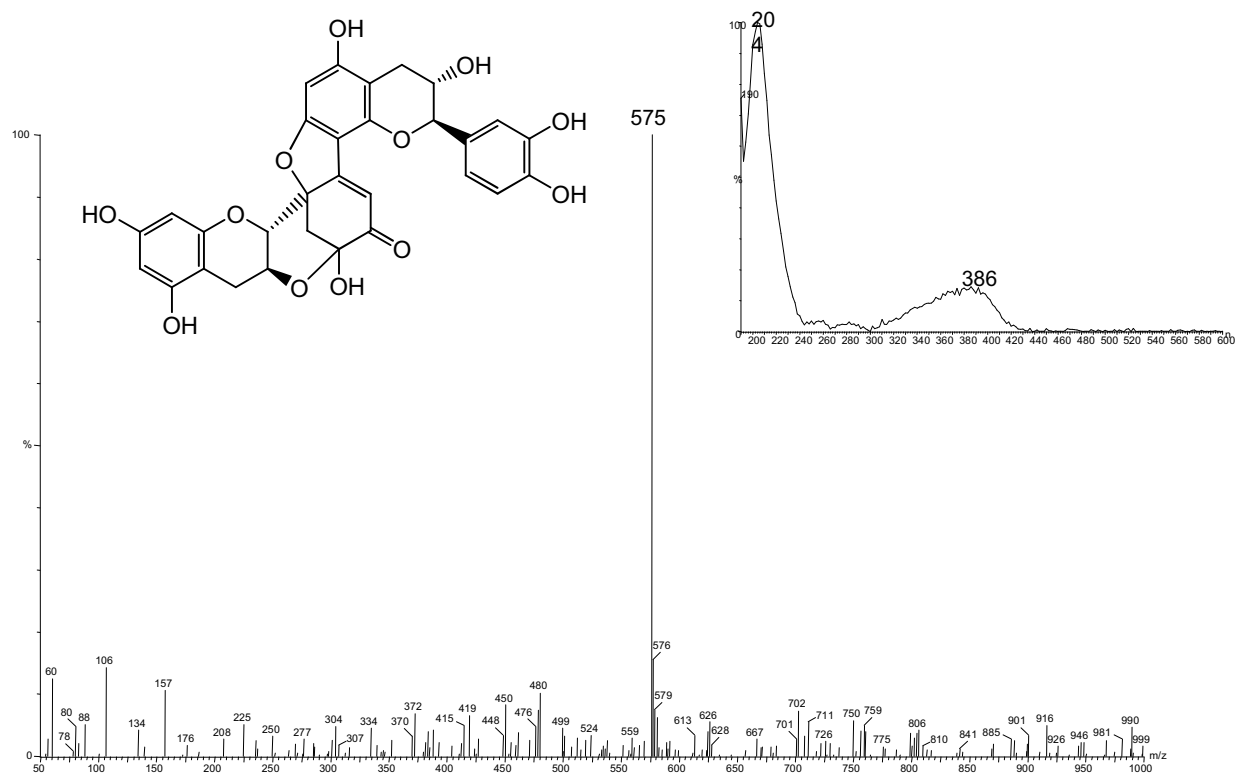
(+)-CATECHINE, (C₁₅H₁₄O₆ : PM = 290,27) Tr = 7,6 min (25 V)



DIMERE OXYDE 1 (C₃₀H₂₄O₁₂ : PM = 576,51), Tr = 9,6 et 9,8 min (pic dédoublé) (25 V)

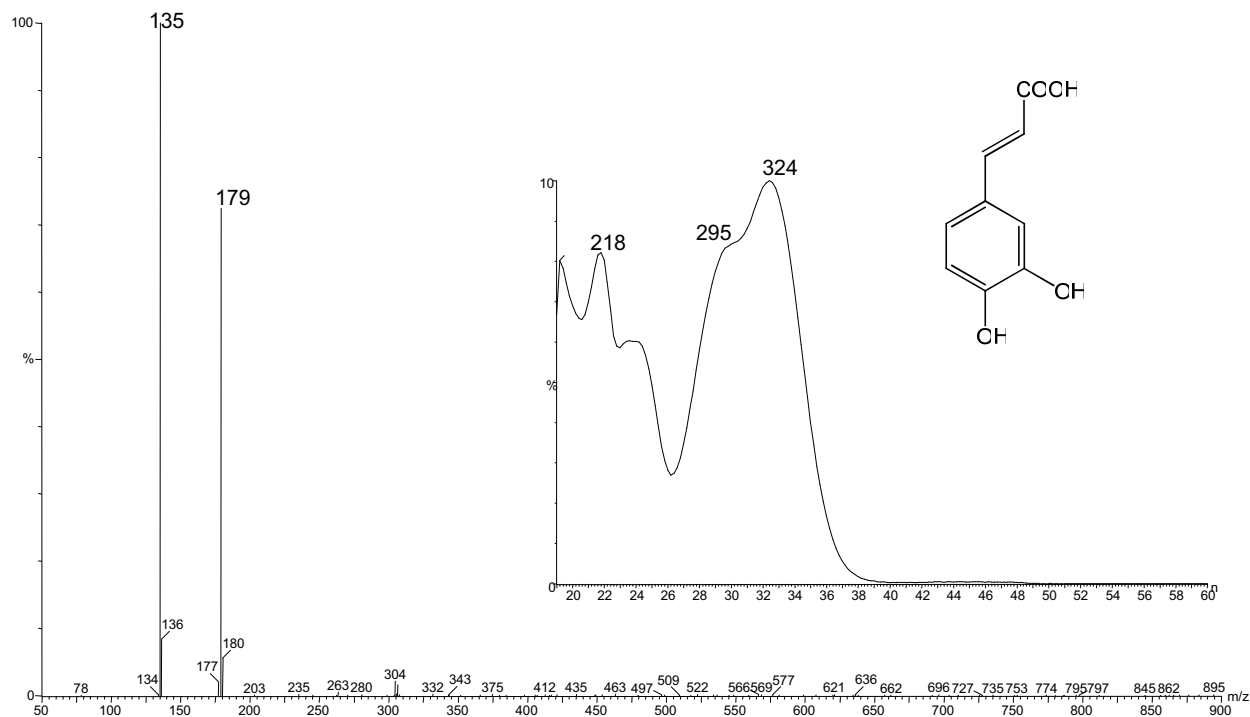


DIMERE OXYDE 2 (C₃₀H₂₄O₁₂ : PM = 576,51), Tr = 11,5 et 11,7 min (pic dédoublé) (25 V)

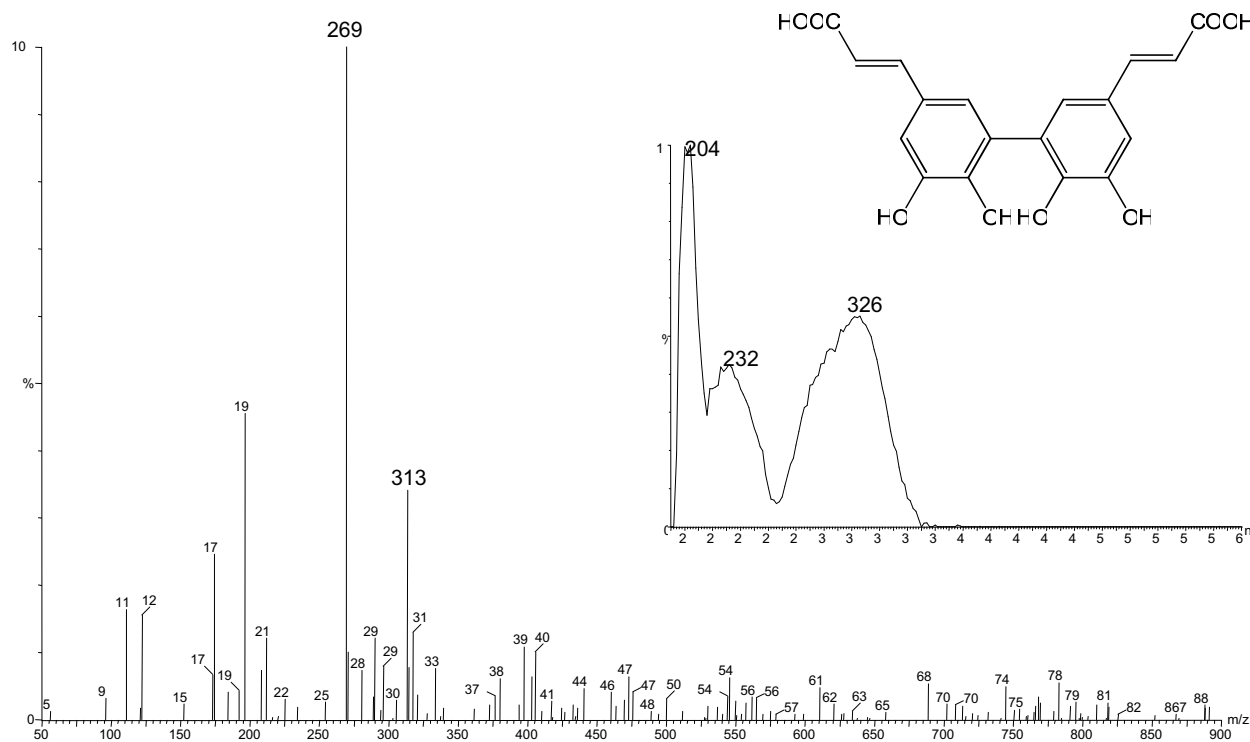


ANNEXE 5 : Produits de dégradation de l'acide caféique

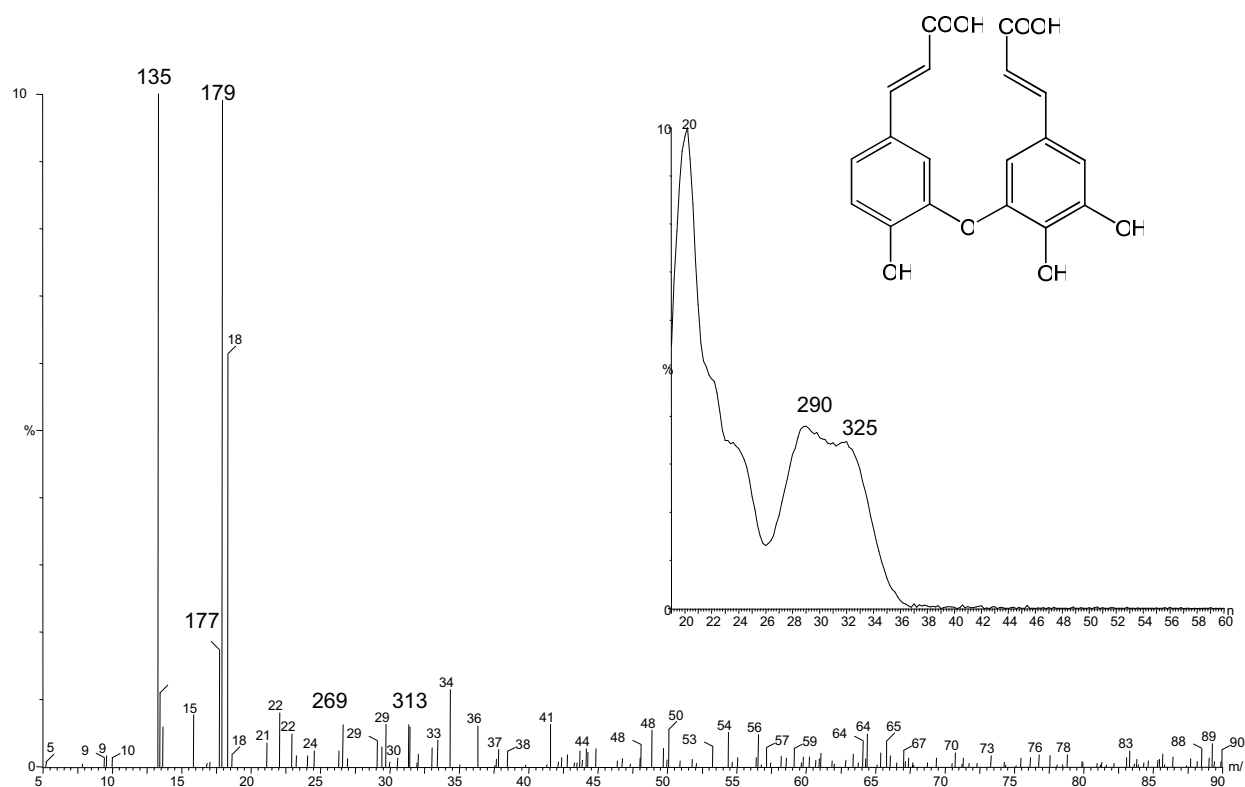
ACIDE CAFEIQUE (C₉H₈O₄ : PM = 180,16), Tr = 8,2 min (25 V)



DIMERE C-C D'ACIDE CAFEIQUE (C₁₈H₁₄O₈ : PM = 358,30), Tr = 9,3 min (25 V)



DIMERE C-O D'ACIDE CAFEIQUE ($C_{18}H_{14}O_8$: PM = 358,30), Tr = 10,6 min (25 V)



CHAPITRE 3.

ETUDE STRUCTURALE DE LA SAB EN EMULSION

IMPACT SUR L'ACTIVATION DE $MbFe^{III}$ PAR LES HYDROPEROXYDES

« La recherche fondamentale ne peut être pratiquée que dans un climat de liberté intellectuelle. »

Pierre Joliot, La Recherche Passionnément

<i>I. Etat des connaissances : l'albumine du sérum</i>	207
I.1 Généralités	207
I.1.1 Historique	208
I.1.2 Structure de la molécule de l'albumine	208
I. 2 Propriétés spectrales de l'albumine	210
I. 3 Les ligands de l'albumine	210
I. 3.1 Les acides gras liés à l'albumine	211
I. 3.1 Interactions entre les composés phénoliques et l'albumine	212
<i>II. Matériels et Méthodes</i>	215
II.1 Matériels	215
II.1.1 Produits chimiques	215
II.1.2 Equipements	215
II.2 Méthodes	216
II .2.1 Etude de la conformation de la SAB en émulsion et de ses modifications lors de l'oxydation	216
II.2.2 Etude de la liaison de la quercétine et de la rutine à l'albumine (SAB)	217
II.2.3 Activation de la metmyoglobine (MbFe ^{III}) par les hydroperoxydes en présence ou en absence de SAB	218
<i>III. Résultats et discussion</i>	222
III. 1 Etude de la conformation de la SAB en émulsion et de ses modifications au cours de l'oxydation lipidique	222
III.1.1 Etude de la conformation de la SAB en émulsion	222
III.1.2 Modifications de la SAB au cours de l'oxydation des émulsions	225
III.2 Association de la SAB avec les composés phénoliques	229
III.2.1 Association à pH 5,8	229
III.2.2 Association à pH 4	230
III.2.3 Conclusion	230
III.3 Activation de la metmyoglobine par les hydroperoxydes en présence ou en absence de metmyoglobine	233
III.3.1 Activation de MbFe ^{III} par H ₂ O ₂ et réduction des espèces hypervalentes de la myoglobine par la quercétine en présence ou en absence de SAB	234
III.3.2 Activation de la metmyoglobine par les hydroperoxydes issus de l'acide linoléique en présence ou en absence de SAB	240
III.4 Conclusion	246
<i>IV. Conclusion générale des chapitres I - II – III</i>	248
<i>Référence bibliographiques</i>	251
<i>ANNEXES</i>	255

I. Etat des connaissances : l'albumine du sérum

Dans ce travail de thèse, l'albumine (SAB) est utilisée en tant qu'émulsifiant dans un des modèles chimiques du bol alimentaire. Ce chapitre est tout d'abord consacré à son étude en émulsion et notamment aux changements structuraux découlant de son adsorption à l'interface et de son oxydation. Dans une seconde partie, l'association de la SAB avec certains composés phénoliques d'intérêt est étudiée. Enfin, l'activation de la metmyoglobine par H₂O₂ et les hydroperoxydes de l'acide linoléique, en présence ou en absence de SAB, sera étudiée.

Ces différentes études nécessitent, au préalable, de faire le point sur les caractéristiques structurales de la molécule d'albumine.

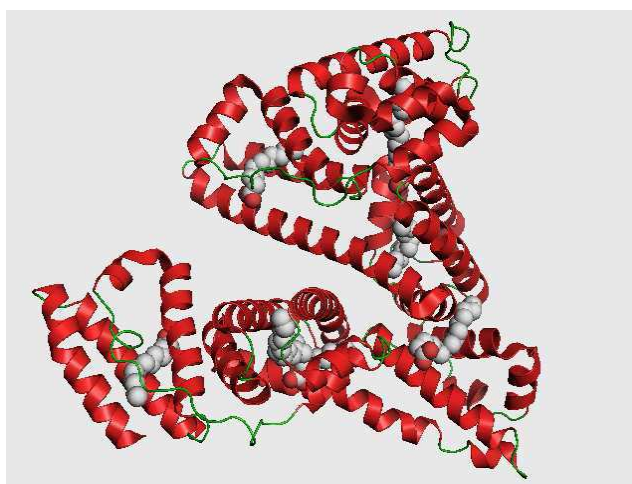


Figure-III-1. Albumine du sérum humain, Source : <http://fr.wikipedia.org>.

I.1 Généralités

Le plasma sanguin constitue la phase liquide du sang, débarrassée de ses globules rouges (érythrocytes), de ses globules blancs et de ses thrombocytes (plaquettes sanguines ou fragments de cellules). Son pH est compris entre 7,35 et 7,45. Il est composé de 92% d'eau, de gaz, d'ions inorganiques, de nutriments et de macromolécules comme les protéines. L'albumine y est majoritaire (60% des protéines totales de la circulation sanguine) et circule à une concentration de 35 à 45 g/L, soit 0,6 mM en moyenne. Elle contribue ainsi à 80% de la pression sanguine osmotique. Synthétisée par le foie puis délivrée à la circulation sanguine, elle y reste en moyenne 27 jours avant d'être éliminée [1].

Son rôle principal est le transport des acides gras libres (non estérifiés), des hormones et des médicaments. Ses multiples capacités de liaison et sa forte concentration plasmatique en font ainsi une protéine de transport et de détoxification très importante pour l'organisme.

I.1.1 Historique

Le terme albumine est tiré du terme albumen provenant lui même du latin « albus » signifiant blanc. Il fait donc référence à la couleur des protéines du blanc d'œuf après cuisson. Avec l'hémoglobine et la fibrine, l'albumine est l'une des premières protéines à avoir été étudiée. En 400 avant J.C., Hippocrate la détecte dans les urines de patients atteints de maladies rénales sous forme de mousse. En 1840, elle est purifiée par un physiologiste français, C. Denis, par dialyse à partir du sérum humain, puis par G. Kander, pharmacologiste suisse, à la fin des années 1800, par précipitation du sérum sanguin à l'aide de sulfate d'ammonium. En 1894, la cristallisation de l'albumine est obtenue à partir de sang équin par Gürber. En 1934, c'est par Hewitt que l'albumine est cristallisée, associée à des acides gras à longues chaînes [1]. En 1975, Meloun *et al.* caractérisent entièrement la séquence de l'albumine du sérum humain [2]. Enfin en 1979, le gène codant pour l'albumine est isolé et sa séquence déduite par Dugaiczky *et al.* en 1986 [1].

I.1.2 Structure de la molécule de l'albumine

L'albumine est une protéine globulaire constituée de 583-585 résidus d'acides aminés selon l'espèce considérée. Elle possède une masse moléculaire de 66500 Da environ.

a) Structure primaire

L'albumine humaine est composée de 585 acides aminés. Une de ces caractéristiques est sa faible teneur en tryptophane, de 1 à 2 résidus selon l'espèce considérée (Tableau-III-1). La méthionine, la glycine et l'isoleucine sont également faiblement représentées dans les albumines de mammifères.

Tableau-III-1. Composition en acides aminés de l'albumine du sérum de mammifères [1].

Acide aminé	Homme	Bovin	Rat
Acide aspartique	36	40	32
Asparagine	17	14	20
Thréonine	28	34	33
Sérine	24	28	24
Acide glutamique	62	59	57
Glutamine	20	20	25
Proline	24	28	30
Glycine	12	16	17
Alanine	62	46	61
Valine	41	36	35
Cystéine	35	35	35
Méthionine	6	4	6
Isoleucine	8	14	13
Leucine	61	61	56
Tyrosine	18	20	21
Phénylalanine	31	27	26
Lysine	59	59	53
Histidine	16	17	15
Tryptophane	1	2	1
Arginine	24	23	24
Total	585	583	584
Masse Molaire (Da)	66438,41	66411,17	65850,51

b) Structures secondaire et tertiaire

Parmi les acides aminés de l'albumine, 35 cystéines sont répertoriées. Elles participent à la formation de 17 ponts disulfure qui s'établissent au sein des segments d'hélices α . Ainsi, la molécule d'albumine est composée de 67% d'hélices α , de 10% de coudes β et de 23% de chaînes étendues. De nature flexible, elle peut adopter différentes conformations [1].

La sérum albumine est constituée de 9 boucles avec trois domaine I, II et III similaires d'un point de vue structural. Chaque domaine, composé de 10 hélices α , est divisé en deux sous-domaines A et B [3]. La sérum albumine est dépourvue de groupe prosthétique et de résidus glycosylés. L'étude par diffraction des rayons X montre que l'albumine est une molécule en forme de coeur inscrite dans un triangle équilatéral de 8 nm de côté et de 3 nm d'épaisseur en moyenne, soit un volume moléculaire de 88 nm³ environ (Figure-III-1) [1, 4].

I. 2 Propriétés spectrales de l'albumine

Le spectre d'absorption de l'albumine est semblable à ceux des protéines les plus simples (sans groupe prosthétique) avec un pic majeur à environ 280 nm dû aux résidus d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine (Phe), la tyrosine (Tyr) et le tryptophane (Trp) qui comptent respectivement 31, 18 et 1 résidus chez la SAH. L'intensité du pic à 280 nm de la SAH est 20 % plus faible que celui de la SAB car cette dernière possède deux Trp ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 5540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [1].

La fluorescence de l'albumine est largement attribuée aux résidus Trp. La contribution des nombreux résidus Tyr est mineure. Ainsi, quand pour une longueur d'onde d'excitation comprise entre 295 nm et 305 nm, les résidus Tyr ne sont pas excités, un spectre d'émission correspondant à celui du tryptophane seul est enregistré ($\lambda_{\text{max}} = 345 \text{ nm}$). Ce spectre est déterminé par l'environnement hydrophobe du Trp 212 dans le cas de la SAB et du Trp 214 dans le cas de la SAH. Le Trp 134 de la SAB, localisé dans un environnement hydrophile (fortement exposé au solvant), serait moins fluorescent. Les ligands de l'albumine peuvent entraîner des phénomènes de quenching de fluorescence permettant de localiser leurs sites de liaison dans la protéine [1].

I. 3 Les ligands de l'albumine

La propriété la plus reconnue de l'albumine est sans doute sa capacité à lier de façon réversible une grande variété de ligands différents. Elle transporte facilement les petites molécules produites par l'organisme ou apportées par l'alimentation. Par exemple, les acides gras, insolubles dans le plasma, mais aussi des métabolites toxiques comme la bilirubine (produit de dégradation de l'hème) sont fortement liés à l'albumine. Il en est de même pour les vitamines, les ions métalliques et les oligo-éléments (Tableau-III-2)

Tableau-III-2. Quelques ligands de l'albumine [1].

Composé	Constante d'association $K_a \text{ (M}^{-1}\text{)}$	Nombre de ligands liés (n)
Acides gras à longues chaînes	$1-69 \times 10^7$	1
Testostérone	$2,4 \times 10^4$	1
Bilirubine	$9,5 \times 10^7$	1
Hématine	$1,1 \times 10^8$	1
Folate	9×10^2	
Ascorbate	$3,5 \times 10^4$	
Cu ²⁺	$1,5 \times 10^{16}$	1
Zn ²⁺	$3,4 \times 10^7$	1
Ca ²⁺	$15,1 \times 10^4$	1

I. 3.1 Les acides gras liés à l'albumine

Les ligands principaux de l'albumine du sérum humain sont les acides gras libres. Des études *in vivo* ont mis en évidence que deux tiers des acides gras liés à l'albumine sont insaturés (AGI). Les principaux AGI sont l'acide oléique (C18:1), l'acide linoléique (C18:2) et l'acide arachidonique (C20:4) représentant respectivement 33 %, 20 % et 5 % des acides gras circulants dans un sérum normal [5]. La liaison de différents AGI (C18:1 et C20:4) et de différents acides gras saturés (C10:0 à C18:0) a été observée en 7 sites distincts de moyenne à forte affinité distribués sur toute la SAH (Figure-III-2). Deux sites de forte affinité sont situés dans les sous-domaines IB et IIIB tandis que les sous-domaines IIA et IIIA accueillent 1 à 2 acides gras respectivement. Enfin les interfaces IA-IIIA et IIA-IIIB sont également sites d'accueil des acides gras à longue chaîne [6, 7].

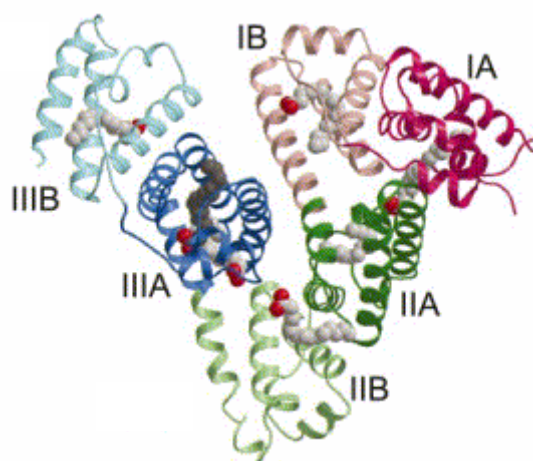


Figure-III-2. Modélisation de la structure tridimensionnelle de la SAH complexée à 7 anions oléates (C18:1). Les domaines I, II et III sont colorés en rouge, en vert et en bleu, respectivement. Les sous-domaines A et B sont différenciés par la nuance « foncée » ou « claire » respectivement. Les acides gras liés sont représentés dans l'espace et colorés selon le type d'atome. Résolution 2,4 Å. [6]

Les acides gras cruciaux dans le métabolisme des lipides tels que les acides oléique, palmitique, linoléique, stéarique, arachidonique et palmitoléique circulent dans le plasma à une concentration totale légèrement inférieure à 1 mM. Leur turnover est de moins de 10 minutes. Seulement 0,1 % d'entre eux sont non liés à l'albumine. Sachant que l'albumine circule à une concentration moyenne de 0,6 mM, il peut être estimé qu'une molécule d'albumine transporte en moyenne environ deux molécules d'acide gras non estérifiés [1].

Les acides gras sont fortement liés à l'albumine puisque leurs constantes d'associations sont toutes dans la gamme $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Tableau-III-3).

Tableau-III-3. Constantes d'association entre différents acides gras et l'albumine [1].

Composé	SAH		SAB	
	K _A (10 ⁷ x M ⁻¹)	n	K _A (10 ⁷ x M ⁻¹)	n
Stéarate	68,9	1		
Palmitate	14,5	1	12,2	1
Linoléate	13,5	1	4,5	1
Oléate (site1)	11,8	1	12,7	1
Oléate (site2)	11,8	1	10,0	1
Oléate (site3)	8,0	1	4,0	1
Oléate (site4)	5,5	1	3,0	1
Linoléate	9,5	1	2,7	1
Arachidonate (site1)	1,1	1	3,4	1
Arachidonate (site2)	7,8	1		

L'association des acides gras avec l'albumine conduirait à une augmentation de sa stabilité. En liant 1 ou 2 acides gras, la molécule devient plus compacte d'où une baisse de la constante diélectrique et une migration électrophorétique plus rapide. En comparaison à l'albumine seule, les complexes albumine-acides gras présentent une meilleure résistance à la dénaturation thermique et à la digestion protéolytique [1].

Cependant, les changements conformationnels causés par la liaison des acides gras à l'albumine peuvent faciliter l'oxydation du résidu cystéine 34, connu pour sa participation prépondérante à l'activité antioxydante de l'albumine. De plus, les acides gras peuvent induire une activité oxydo-réductrice de l'ion Cu²⁺ fixé à l'albumine, convertissant ainsi l'albumine d'un état antioxydant à un état pro-oxydant [8].

I. 3.1 Interactions entre les composés phénoliques et l'albumine

L'assemblage d'hélices α dans les sous-domaines IIA et IIIA forme des cavités qui permettent de lier de nombreux ligands exogènes. Ainsi, deux sites de forte affinité pour les composés aromatiques et les hétérocycles sont localisés dans les sous-domaines IIA et IIIA, appelés aussi site I et site II respectivement (nomenclature de Sudlow, 1975). Le sous-domaine IIIA est séparé du sous-domaine IIA par une surface chargée positivement qui lui permet de lier de petits acides aromatiques sous forme d'anions carboxylates.

Les interactions albumine-phénols ont largement été étudiées pour les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques (Tableau-III-4).

Tableau-III-4. Liaison de différents polyphénols à l'albumine du sérum bovin.

Composé	K (M ⁻¹)	Méthode utilisée	Référence
Quercétine	134 x 10 ³ (pH 7,4)	Fluorescence	Dufour and Dangles [9]
	86 x 10 ³ (pH 5)		Dufour and Dangles [9]
	110 x 10 ³ (pH 7)		Rawel <i>et al.</i> [10]
Rutine	10,7 x 10 ³ (pH 7,4)	Fluorescence	Dufour and Dangles [9]
	2-1,6 x 10 ³ (pH 7,4)	Electrophorèse capillaire	Lu <i>et al.</i> [11]
Acide caféique	30 x 10 ³ (pH 7,4)	Dialyse à l'équilibre	Adzet <i>et al.</i> [12]
	8 x 10 ³ (pH 7,4)	Précipitation au TCA	
Acide chlorogénique	13-16 x 10 ³ (pH 7,4)	Dialyse à l'équilibre	Prigent <i>et al.</i> [13]
	4,8 x 10 ³ (pH 7) n= 2	Fluorescence	Rawel <i>et al.</i> [14]

Divers auteurs ont montré que les flavonoïdes manifestent une affinité modérée pour l'albumine avec des constantes d'association variant de 1 à 15 x 10⁴ M⁻¹ [9, 10]. A l'aide de marqueurs de sites (warfarine et DNSA pour le sous-domaine IIA, ibuprofène et diazépam pour le sous-domaine IIIA), il a été montré que la complexation albumine-flavonoïde se déroule majoritairement dans le sous-domaine IIA, en accord avec le quenching de fluorescence du résidu Trp-214 (lui-même localisé dans ce sous-domaine) qu'elle produit [9]. La stœchiométrie des complexes est 1:1 dans la plupart des études [9, 15].

L'association entre flavonoïdes et albumine ne modifierait pas notablement la conformation de la protéine. Les principales interactions responsables de l'association protéine-flavonoïde se répartissent entre liaisons hydrogène, interactions ioniques et interactions de van der Waals [16]. L'influence de l'hydroxylation du noyau B sur les interactions des flavonols avec la SAB a été étudiée. Il semblerait que l'affinité protéine/flavonols augmente avec le nombre de groupements hydroxyles portés par le cycle B [17].

Concernant l'association entre les acides hydroxycinnamiques et l'albumine, l'association se déroulerait également dans le sous-domaine IIA. Elle résulterait à la fois d'interactions de van der Waals entre le cycle aromatique de l'acide et des résidus hydrophobes, d'interactions ioniques entre le groupement carboxylate et les résidus cationiques (basiques) et de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles et la chaîne polypeptidique [18].

L'albumine est donc une protéine complexe pouvant lier de nombreux composés dont un certain nombre de polyphénols. Dans un de nos modèles de bol alimentaire, elle est en interaction

potentielle avec des triglycérides issus de l'huile de tournesol, des composés phénoliques et de la metmyoglobine. Ainsi, de nombreux phénomènes (changement de conformation, oxydation, interactions de différentes natures) peuvent l'affecter au sein des émulsions. Une étude s'impose pour interpréter plus finement les résultats obtenus dans le chapitre précédent (Chapitre 2).

Ainsi, le chapitre présent relate nos efforts pour modéliser les phénomènes impliquant les protéines du modèle-SAB (SAB et metmyoglobine). Pour une analyse quantitative, les milieux d'étude seront parfois simplifiés. Ce chapitre présente trois parties distinctes :

- Dans un premier temps, la spectroscopie de fluorescence en mode frontal est utilisée pour étudier la conformation de la SAB en émulsion et ses modifications au cours de l'oxydation de l'émulsion.
- Une seconde partie aborde l'étude de l'association de la quercétine et de la rutine à la SAB (spectroscopie de fluorescence à angle droit)
- Enfin la troisième partie de ce chapitre concerne une étude plus spécifique de la metmyoglobine et de son activation par différents types d'hydroperoxydes en présence ou en absence de SAB.

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Produits chimiques

Les produits chimiques, SAB, MbFe^{III}, quercétine et rutine, tampon phosphate pH 5,8, et les solvants utilisés dans ce chapitre sont ceux utilisés dans les chapitres 1 et 2.

Il faut y ajouter le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (H1009, PM = 34.01 g.mol⁻¹, 30% dans l'eau) et l'acide linoléique (L1376, PM = 280.45 g.mol⁻¹, 99%) qui proviennent de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Le gel de silice (Grade 9385, 60Å) provient de Merck (Darmstadt, Germany). L'hexane et l'acétate d'éthyle ont été fournis par Fisher Bioblock (Illkirch Cedex, France). Le THF (tétrahydrofurane) provient de VWR (Fontenay sous Bois, France).

II.1.2 Equipements

a) Spectroscopie de fluorescence en mode frontal

Généralement appliquée aux échantillons dilués optiquement transparents avec un montage à angle droit, la spectroscopie de fluorescence peut aussi être utilisée en mode frontal sur des échantillons opaques tels que les émulsions [19]. Elle apporte des informations sur l'environnement des résidus tryptophanyles (Trp) des protéines et leurs interactions avec les lipides. Dans des émulsions stabilisées par des protéines, la spectroscopie de fluorescence peut permettre de mieux comprendre leur mode d'action et d'optimiser leur utilisation [20].

Les spectres de fluorescence en mode frontal sont enregistrés sur un spectrofluorimètre 3-D Hitachi F-4500 équipé d'un porteur d'échantillon solide pour des mesures en mode frontal. Les fentes d'obturation sont fixées à 5 nm en excitation et en émission. Les échantillons sont déposés dans des cellules en quartz de 26 µL et 0,4 mm de chemin optique.

b) Spectroscopie de fluorescence à angle droit

Les spectres de fluorescence à angle droit, utilisés pour l'étude de l'association de la quercétine et de la rutine à la SAB puis pour celle de la metmyoglobine au complexe SAB-quercétine, sont enregistrés sur un spectrofluorimètre Xénus (SAFAS) équipé d'un dispositif de thermostatisation de la

cuve de mesure (T = 25 ou 37 (\pm 1) °C). Les largeurs des fentes d'obturation sont fixées à 10 nm en excitation et en émission. L'analyse est effectuée dans une cuve en quartz de 1 cm de chemin optique.

c) Spectres d'absorption

Les spectres ont été enregistrés sur le spectrophotomètre à barrettes de diodes décrit au chapitre 2 (Hewlett-packard 8453), utilisé en mode cinétique et équipé d'une cellule en quartz de 1 cm de trajet optique. La température dans la cuve est maintenue à 37°C à l'aide d'un bain à thermostat. L'agitation magnétique dans la cellule est réglée à une vitesse constante (1000 tr/min) à l'aide d'un agitateur Variomag (Telemodul 20C).

d) Expériences CLHP

Les analyses en CLHP-UV ont été menées sur un appareil HP 1100 (voir chapitre 2) couplé à un détecteur spectrophotométrique à barrettes de diodes. La colonne utilisée est une colonne Alltima de silice greffée C18 (5 μ m, 150 mm x 4,6 mm) placée dans un compartiment thermostaté à 35 °C et munie d'une colonne de garde. La phase mobile dépend du type d'expérience réalisée.

II.2 Méthodes

II.2.1 Etude de la conformation de la SAB en émulsion et de ses modifications lors de l'oxydation

Les émulsions du modèle-SAB à pH 5,8 sont préparées selon le protocole du chapitre 1. L'oxydation est initiée par l'ajout de MbFe^{III} (20 μ M).

a) Etude des résidus tryptophanyles (Trp)

Les spectres d'émission des résidus tryptophanyles des protéines (Trp) sont enregistrés sur l'émulsion avant l'ajout de MbFe^{III} et sur chacune de ses phases (aqueuse ou lipidique) après séparation par centrifugation de deux heures à 4000 g, 10°C. La phase inférieure liquide (sérum) est prélevée à l'aide d'une aiguille, en perçant la couche de crème supérieure. L'échantillon est déposé directement dans la cuve sans préparation particulière. Ces expériences ont été menées sur trois émulsions indépendantes.

Les spectres sont enregistrés de 300 à 450 nm (pas de 1 nm) pour une longueur d'onde d'excitation de 290 nm et à une vitesse de balayage de 240 nm.min⁻¹.

Pour le suivi de l'oxydation, un prélèvement de l'émulsion du modèle-SAB contenant MbFe^{III} est déposé dans la cuve et directement analysé à 25 (± 1)°C, en triplicata toutes les heures. Cette série d'expériences a été réalisée sur trois émulsions oxydées indépendantes. Le lissage et le calcul des dérivées quatrièmes sont effectués en utilisant la procédure de Stavitzky-Golay modifiée (logiciel Peakfit, version 4, Jandel).

b) Etude des pigments fluorescents

L'oxydation des protéines conduit à la formation de pigments fluorescents pouvant être décelés par fluorescence-3D en mode frontal. Pour une sensibilité optimale, la longueur d'onde excitation a été balayée de 320 à 400 nm (de 5 nm en 5 nm) sur une émulsion oxydée. Pour chaque longueur d'onde d'excitation, le spectre d'émission a été enregistré en parallèle de 350 à 550 nm avec un pas de 1 nm. La vitesse de balayage était de 1200 nm.min⁻¹. Ces expériences préliminaires permettent d'obtenir des spectres en 3-D dont l'exploitation permet de déterminer le couple (λ_{exc} , $\lambda_{ém}$) optimal pour le suivi de la formation des pigments fluorescents, toutes les heures, en triplicata et sur trois émulsions oxydées indépendantes.

II.2.2 Etude de la liaison de la quercétine et de la rutine à l'albumine (SAB)

Les constantes d'affinité de la quercétine et de la rutine pour l'albumine ont été déterminées par spectrofluorimétrie à pH 5,8 et à pH 4 (25 °C). La SAB est diluée quotidiennement dans le tampon phosphate (pH 5,8) ou dans le tampon acétate (pH 4).

A 2 mL d'une solution d'albumine 75 μ M placée dans la cellule en quartz sont ajoutés successivement à l'aide d'une seringue de petites aliquotes (3-20 μ L) d'une solution de quercétine dans le méthanol (7,5 mM). La même procédure a été répétée en modifiant les concentrations initiales des solutions à 7,5 μ M pour la SAB et 1,5 mM pour la quercétine.

Pour la rutine, la même procédure est utilisée avec une solution initiale de SAB 75 μ M et une solution de rutine de concentration plus importante (22 mM). La concentration maximale de MeOH dans les solutions est de 6%.

Après quelques minutes, les spectres d'émission sont enregistrés avec excitation à 450 nm (quercétine liée) et collecte de l'intensité émise à 530 nm en triplicata. Il a été vérifié que l'absorbance des ligands (phénols non liés) restait faible à 450 nm ($A < 0,2$), ce qui constitue une condition de proportionnalité de l'intensité émise et de la concentration. Une analyse de Scatchard a été réalisée, ce

qui suppose n sites de liaison identiques sur l'albumine. La constante d'affinité (K_1), la fluorescence molaire du complexe (f_1) et la stoechiométrie n ont été estimées en ajustant les courbes F (intensité de fluorescence du complexe SAB/composé phénolique) vs. L_t (concentration totale du ligand) aux équations (1) et (2) par utilisation d'un programme de régression non-linéaire (Scientist, MicroMath) [9]. $[L]$ est la concentration du ligand libre et c la concentration totale d'albumine. Pour les valeurs de n proches de l'unité, les données ont été réévaluées en utilisant un modèle de complexation 1:1 (Annexe 1).

$$F = f_1 c \frac{nK_1[L]}{1 + K_1[L]} \quad \text{Equation 1}$$

$$L_t = [L] \left(1 + \frac{ncK_1}{1 + K_1[L]} \right) \quad \text{Equation 2}$$

Les expériences sont effectuées au minimum trois fois à partir de nouvelles solutions. L'absence de fluorescence des autres phénols d'intérêt, (+)-catéchine, acide caféique et acide chlorogénique, en présence et en absence de SAB n'a pas permis l'évaluation de leur affinité pour la SAB par cette méthode.

II.2.3 Activation de la metmyoglobine (MbFe^{III}) par les hydroperoxydes en présence ou en absence de SAB

Dans toute cette partie, les concentrations des solutions de MbFe^{III} et de H₂O₂ sont déterminées par spectrophotométrie ($\epsilon_{525} = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour MbFe^{III} [21], $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour H₂O₂).

a) Activation de la MbFe^{III} en présence de H₂O₂ et réduction par la quercétine

Une solution 60 μM de metmyoglobine (MbFe^{III}) dans le tampon phosphate à pH 5,8 est préalablement thermostatée à 37°C directement dans la cuve du spectrophotomètre, en présence ou en absence de 3 équivalents de SAB (180 μM). Après quelques minutes, 30 μL d'une solution aqueuse concentrée de H₂O₂ (4 mM) sont additionnés pour atteindre une concentration finale dans la cellule de 60 μM (1 équivalent). La cinétique de conversion de MbFe^{III} en ferrylmyoglobine (MbFe^{IV=O}) est alors suivie par l'augmentation de l'absorbance dans le visible à 590 nm. L'auto-réduction ultérieure de MbFe^{IV=O} en MbFe^{III} est également enregistrée à 590 nm sur plusieurs minutes.

Dans un second temps, la même procédure est appliquée avec un fort excès de H₂O₂ (10 équivalents soit 600 µM) afin de maximiser la concentration de MbFe^{IV}=O et ainsi déterminer son coefficient d'absorption molaire de la façon la plus précise possible. Dans les séries d'expériences suivantes, lorsque le plateau d'absorbance maximale à 590 nm est atteint, 20 µL d'une solution concentrée de quercétine (6,2 ou 3,1 ou 1,5 mM dans le méthanol) sont ajoutés (concentrations finales de quercétine dans la cellule : 60, 30 et 15 µM) et la réduction rapide de MbFe^{IV}=O en MbFe^{III} est enregistrée à 590 nm (intervalle entre 2 spectres consécutifs : 0,5 s).

Les procédures de dérivation et d'ajustement aux courbes (*curve-fitting*) des graphes représentant l'absorbance en fonction du temps ont été effectuées à l'aide du programme « Scientist » (MicroMath, Salt Lake City, USA). La loi de Beer et les différents systèmes d'équations différentielles exprimant les lois cinétiques ainsi que les conditions initiales sur les concentrations ont été implémentés dans les programmes. Les ajustements de courbe sont effectués par une régression non linéaire (méthode des moindres carrés) et donnent des valeurs optimisées pour les différents paramètres calculés (constantes de vitesse, stœchiométries, coefficients d'absorption molaire). Les écart-types liés aux calculs sont également donnés.

b) Quenching de la fluorescence du complexe SAB-quercétine par la metmyoglobine

L'intensité de fluorescence du complexe SAB-quercétine (notée I_F) à 535 nm est progressivement quenchée par addition de metmyoglobine (notée L) en concentration croissante. Compte tenu de la faible affinité apparente de la quercétine pour MbFe^{III} (fluorescence propre de MbFe^{III} non affectée par la quercétine) et de son affinité relativement forte pour la SAB (K de l'ordre de 10⁵ M⁻¹), ce quenching est supposé refléter la formation d'un complexe ternaire quercétine-MbFe^{III}-SAB. La procédure expérimentale est la suivante : à 2 mL d'un mélange équimolaire de SAB et de quercétine (concentration = 40 µM, pH 5,8 T = 37 °C) placé dans la cellule en quartz sont ajoutés par seringue des aliquotes (10 µL) d'une solution de metmyoglobine de concentration 450 µM dans le tampon à pH 5,8. En supposant une association 1:1 entre les deux protéines, une valeur optimisée de la constante d'association (K) a été estimée en ajustant les courbes I_F vs. L_t aux équations 3-5, avec L_t concentration totale de MbFe^{III}, C concentration totale de SAB et f_P intensité de fluorescence molaire du complexe SAB-quercétine.

$$I_F = f_P[P] \exp(-\varepsilon_L l L_t) \quad \text{Equation 3}$$

$$L_t = [L](1 + K[P]) \quad \text{Equation 4}$$

$$C = [P](1 + K[L]) \quad \text{Equation 5}$$

Parce que la MbFe^{III} absorbe considérablement à la longueur d'onde d'excitation (450 nm), une correction de filtre interne est nécessaire. Dans l'équation 3, ϵ_L correspond au coefficient d'absorption molaire de MbFe^{III} à 450 nm. Sa valeur est déterminée indépendamment par spectroscopie UV-vis à partir de la loi de Beer ($\epsilon_L = 8270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 450 nm). Enfin, l est la distance moyenne parcourue par la lumière incidente jusqu'au site de détection de la lumière émise. Elle est évaluée à 0,65 cm pour notre spectrofluorimètre.

c) Activation de MbFe^{III} en présence d'hydroperoxydes d'acide linoléique

➤ Préparation des hydroperoxydes issus de l'oxydation de l'acide linoléique

Les hydroperoxydes de l'acide linoléique (LOOH) ont été préparés par autoxydation à température ambiante, durant 72 heures de 1 g d'acide linoléique, d'après le protocole de Dufour et Loonis [22]. Les LOOH sont ensuite purifiés par chromatographie sur gel de silice (50 g) avec un gradient d'élution hexane/acétate d'éthyle de ratio volumique initial 95:5 et dont la teneur en hexane décroît de 5% par volume de 200 mL jusqu'au ratio final 55:45. Les fractions sont analysées par CLHP avec détection UV. La phase mobile est constituée d'un gradient d'acide formique (0,05% dans l'eau) (A) et d'acétonitrile (B) (Tableau-III-5) à un débit constant de 1 mL min⁻¹. Une colonne C₁₈ (4.6 x 150 mm, taille des particules = 5 μm), équipée d'une pré-colonne et thermostatée à 25°C, est utilisée. Le volume d'injection est de 10 μL .

Tableau-III-5. Gradient CLHP utilisé pour la séparation des LOOH.

T (min)	A (%)	B (%)
0	50	50
5	50	50
15	40	60
30	23	73
40	0	100

Les fractions contenant les LOOH sont regroupées en fonction de leur composition en régioisomères. Ainsi 3 groupes sont obtenus, l'un comportant majoritairement les 9-LOOH, l'autre les 13-LOOH et le dernier un mélange des deux régioisomères. Les fractions ainsi réunies sont concentrées à sec et conservées sous argon à -18°C. Les concentrations de LOOH sont déterminées à partir des gammes-étalon de Dufour et Loonis [22].

➤ **Analyses cinétiques par spectroscopie UV-vis**

Les expériences d'activation de MbFe^{III} par les hydroperoxydes ont été réalisées en remplaçant H₂O₂ par des solutions de LOOH dans l'isopropanol. Dans un premier temps, 30 µL d'une solution 13,5 mM de LOOH dans l'isopropanol sont ajoutés à 2 mL d'un mélange de SAB et de MbFe^{III} de concentrations respectives 180 et 60 µM (pH = 5,8, T = 37 °C). La formation de la ferrylmyoglobine est suivie par l'enregistrement de l'absorbance à 590 nm (intervalle entre 2 spectres consécutifs = 1s). Dans un second temps, pour éviter les problèmes de solubilité (solubilisation lente des LOOH en milieu aqueux), le mélange équimolaire de SAB et de LOOH (190 µM, teneur en iPrOH < 1,5%) est préformé et agité quelques minutes. Deux mL de ce mélange sont alors introduits dans la cuve en quartz à 37 °C. L'addition dans la cuve de 0,1 mL de MbFe^{III} (1,25 mM dans le tampon à pH 5,8) permet d'amorcer la réaction. Lorsque le plateau à 590 nm est atteint, la quercétine (20 µL) est ajoutée à partir d'une solution concentrée dans le méthanol. Au final, dans la cuve, les concentrations des espèces sont les suivantes : [SAB] = [LOOH] = 180 µM, [MbFe^{III}] = 60 µM et [quercétine] = 32, 63 et 125 µM.

L'évolution de la bande de Soret ($\lambda_{\max} = 410$ nm) a aussi été suivie dans cette partie. Pour ces expériences, le protocole est identique au précédent avec des solutions plus diluées afin de se situer dans un domaine de linéarité ($A < 2$) pour l'application de la loi de Beer, Les concentrations des espèces sont : [SAB] = [LOOH] = 12 µM, [MbFe^{III}] = 3 µM. L'expérience a aussi été reproduite en remplaçant LOOH par H₂O₂ ([H₂O₂] = 3 µM) pour comparaison.

➤ **Suivi de la consommation des hydroperoxydes d'acide linoléique par CLHP-UV-vis**

En parallèle des expériences menées en spectroscopie, des analyses CLHP sont effectuées à partir du mélange contenant MbFe^{III} et les LOOH en présence ou en absence de SAB ([SAB] = 18 µM, [MbFe^{III}] = 6 µM et [LOOH] = 24 µM). Toutes les 30 secondes, 200 µL du milieu réactionnel sont prélevés, acidifiés par 10 µL d'HCl 0,12 M et mélangés à 200 µL de THF/CH₃CN (2:3). Le mélange est centrifugé pendant 3 minutes à 10000 tr.min⁻¹ et le surnageant est congelé jusqu'à l'injection sur la colonne de silice C18 (voir méthode précédente et gradient du Tableau-III-5, volume d'injection = 30 µL).

III. Résultats et discussion

III. 1 Etude de la conformation de la SAB en émulsion et de ses modifications au cours de l'oxydation lipidique

Ces travaux ont été réalisés lors d'un stage à l'INRA de Nantes sous la direction de Madame Claude Genot (Unité BIA).

III.1.1 Etude de la conformation de la SAB en émulsion

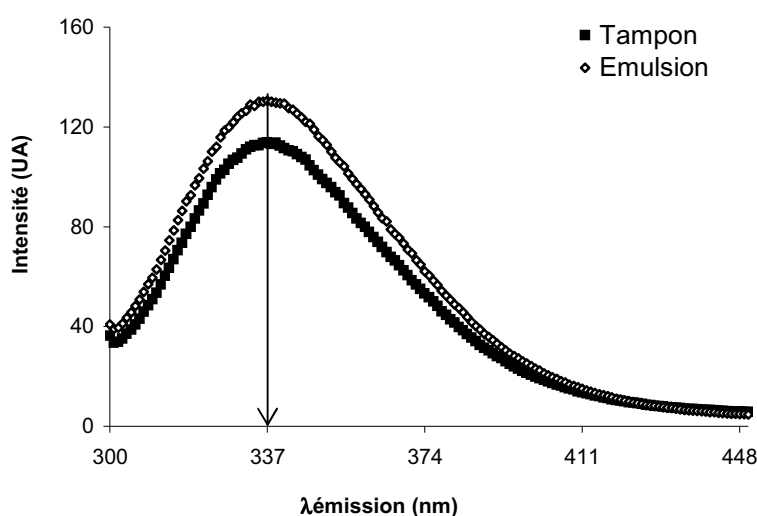


Figure-III-3. Spectres d'émission de la SAB en solution dans le tampon et en émulsion [SAB] = 198 μM (λ_{exc} = 290 nm). UA : unité arbitraire.

Les spectres d'émission de la SAB en solution ou en émulsion sont représentés sur la Figure-III-3. Aucun déplacement de la longueur d'onde maximale d'émission du résidu tryptophane (λ_{max} = 337 nm) n'est observée entre la SAB dans le tampon et la SAB dans l'émulsion.

En revanche, Rampon *et al.* ont observé un décalage de 4 nm pour une émulsion stabilisée par la SAB (14g/L) et composée de 30% d'huile de tournesol avec des gouttelettes de diamètre moyen 0,36 μm. Ce décalage est attribué à la localisation du Trp de la protéine dans un environnement plus hydrophobe quand celle-ci s'adsorbe à l'interface pour stabiliser l'émulsion [19]. Dans notre cas, la surface interfaciale (1,46 m²/cm³ d'huile) déployée par les gouttelettes d'huile implique que seulement 3,6 % de la SAB serait adsorbée à l'interface huile/eau (Chapitre 1). Plus de 96% de la SAB étant localisée en phase aqueuse, le déplacement de λ_{max} n'est pas détectable dans nos modèles. De la

même façon, dans l'étude précédente [19], quand le diamètre des gouttelettes est augmenté à 1,32 μm , la surface interfaciale passe de 17 à 5 m^2 et le déplacement de λ_{max} n'est plus observé.

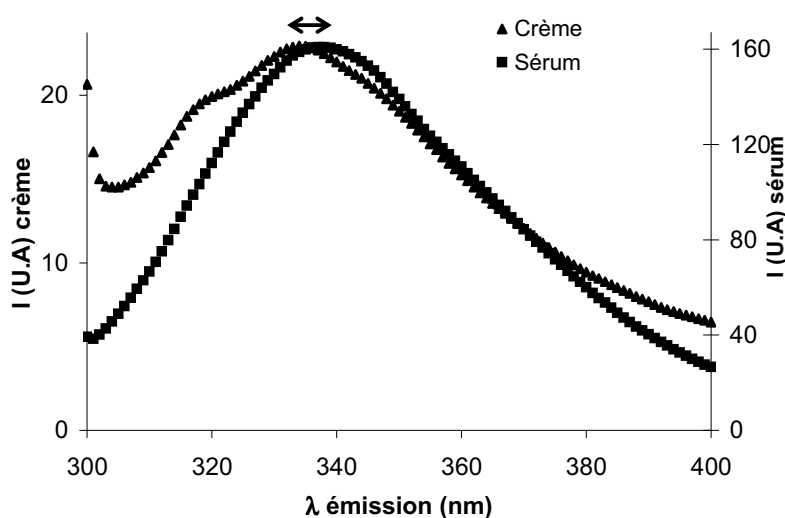


Figure-III-4. Spectres d'émission de la crème et du sérum séparés de l'émulsion du modèle-SAB ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$). UA : unité arbitraire.

Pour plus de précision sur la conformation de la SAB dans les deux phases, trois émulsions indépendantes ont été centrifugées (2 x 1h à 4000 g, 10°C) pour séparer la phase « crème » contenant la majorité des gouttelettes lipidiques de la phase « sérum » principalement aqueuse. Cela dit, le sérum est resté très trouble, ce qui suggère la présence de minuscules gouttelettes lipidiques entourées de protéine et de densité très proche de celle de la SAB en solution.

Un décalage dans la longueur d'onde d'émission maximale de 3 nm a été observé : $\lambda_{\text{max}} = 334 \text{ nm}$ pour la crème, $\lambda_{\text{max}} = 337 \text{ nm}$ pour le sérum de l'émulsion fraîche (Figure-III-4). Ces résultats indiquent que l'environnement des Trp et probablement la structure de la SAB dans le sérum sont similaires à ceux de la SAB en solution aqueuse. Ils vont à l'encontre de ceux de Rampon *et al.* [23] qui notent une diminution significative du λ_{max} pour la SAB présente dans le sérum d'une émulsion d'hexadécane dans l'eau. Il avait alors été suggéré que des modifications structurales de la SAB se produisent non seulement pour la SAB interfaciale mais aussi pour la SAB en phase aqueuse lors de l'homogénéisation des émulsions. Dans une autre étude portant sur une émulsion d'huile de tournesol dans l'eau, aucun décalage du λ_{max} entre SAB en solution et SAB dans le sérum n'est observé en accord avec nos résultats [19]. La phase dispersée d'hexadécane aurait un plus grand impact que l'huile de tournesol sur la structure des protéines en raison de sa plus grande hydrophobie.

Enfin, sur le spectre d'émission de la SAB dans la crème, on observe un épaulement à 320 nm. Ce dernier correspondrait à l'émission Raman de l'eau qui devient apparente lorsque l'intensité de fluorescence est faible.

Dans les émulsions, le spectre d'émission ne permet pas toujours de distinguer les différents environnements des résidus Trp. Afin de différencier la contribution des Trp dans chacun des environnements (hydrophobe ou hydrophile), une dérivation successive des spectres a été réalisée. Les dérivées seconde et troisième ne révèlent en général que peu d'information supplémentaire et le calcul de la dérivée quatrième est nécessaire [20]. Dans les solutions de SAB et dans les émulsions, Rampon *et al.* ont mis en évidence un pic aux alentours de 330 nm correspondant à des Trp en environnement aqueux. Un second pic détecté aux environs de 314 nm est observé uniquement dans les émulsions. Il est attribué aux Trp situés dans un environnement plus hydrophobe, confirmant l'hypothèse que la SAB subit des modifications de conformation lors de son adsorption à l'interface huile-eau [24].

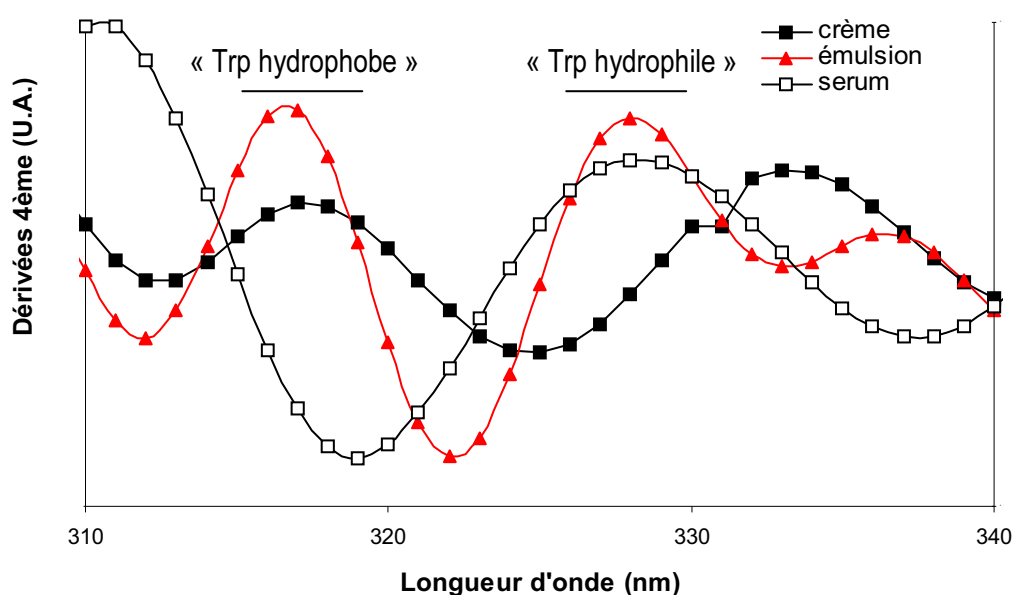


Figure-III-5. Dérivée 4^{ème} des spectres de la crème, du sérum et de l'émulsion issus du modèle-SAB.

Dans notre cas, les calculs de dérivée 4ème ont été entrepris sur les spectres obtenus pour la crème, le sérum et l'émulsion (Figure-III-5). Dans le cas du sérum, deux pics sont observés, l'un à 310 nm et l'autre à 328 nm. Pour la crème, les dérivés 4èmes mettent en évidence deux pics à 317 nm et à 336 nm. Enfin, dans le cas de l'émulsion, deux pics principaux d'intensité équivalente, l'un à 317 nm et l'autre à 328 nm sont observés. Nous pouvons donc proposer que le pic à 317 nm correspond aux Trp

localisés dans un environnement hydrophobe tandis que celui à 328 nm résulterait des Trp situés dans un environnement hydrophile. La dérivation 4^{ème} des spectres permet ainsi de vérifier que les Trp de l'émulsion sont présents dans deux environnements distincts, ce qui confirme qu'une partie de la protéine est adsorbée à l'interface et qu'une autre est présente en phase aqueuse.

III.1.2 Modifications de la SAB au cours de l'oxydation des émulsions

Les produits de la peroxydation lipidique sont responsables de modifications des protéines comme cela est souligné dans plusieurs études [25]. Diverses modifications oxydantes ont été rapportées pour la SAB : apparition de groupements carbonyles ou de produits de poids moléculaires élevés résultant de l'agrégation de fragments de protéines, disparition de résidus Lys [26, 27]. De plus, il a été remarqué que les teneurs en diènes conjugués et en malondialdéhyde formés à partir d'acides gras polyinsaturés étaient plus faibles en présence de SAB. Une partie des produits de dégradation des hydroperoxydes lipidiques pourrait donc être impliquée dans la formation de dérivés protéiques, en particulier par formation d'imines entre les résidus Lys et les carbonyles dérivés de lipides.

a) Suivi de la fluorescence des résidus Trp au cours de l'oxydation de l'émulsion

L'évolution de l'intensité de fluorescence des résidus Trp de la SAB a été suivie en fluorimétrie frontale au cours de l'oxydation de l'émulsion. Comme cela a déjà été observé [19], l'intensité d'émission à 337 nm diminue progressivement au cours du temps ($\lambda_{exc} = 290$ nm) (Figure-III-6).

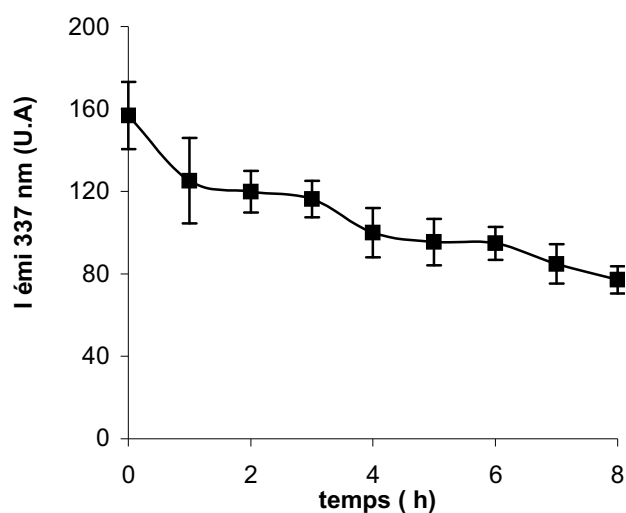


Figure-III-6. Evolution de l'intensité de fluorescence des Trp au cours de l'oxydation de l'émulsion du modèle-SAB ($\lambda_{exc} = 290$ nm), $[MbFe^{III}] = 20 \mu M$ à pH 5,8. U.A : unité arbitraire.

Le déclin de fluorescence des Trp a déjà été observé lors de la réaction de radicaux peroxydes issus du AAPH avec la SAB [28]. Il peut être attribué soit à l'oxydation directe du Trp, soit à une modification de son environnement. D'autre part, Meynier *et al.* ont observé le même phénomène en additionnant directement de l'hexanal à différentes protéines. Ainsi, le déclin observé pourrait également être attribué à des produits secondaires d'oxydation de type aldéhyde. L'analyse par électrophorèse a permis de détecter la formation de produits de couplage covalent entre protéines et lipides oxydés (composés primaires ou secondaires) [29-31]. Les résidus Trp situés à l'interface dans un environnement hydrophile seraient préférentiellement altérés durant la peroxydation lipidique [25].

b) Formation de pigments fluorescents au cours de l'oxydation de l'émulsion stabilisée par la SAB

La réaction entre les lipides oxydés et les protéines conduit à la formation de chromophores fluorescents. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales de ces pigments dépendent des chromophores [29] et de leur environnement [25]. Elles augmentent avec le degré d'insaturation des acides gras [25]. La première étape vise donc à déterminer le couple $\lambda_{exc}/\lambda_{ém}$ optimal.

➤ Détermination du couple $\lambda_{exc}/\lambda_{ém}$

Des spectres en 3-D (I en fonction de λ_{exc} et $\lambda_{ém}$) ont été enregistrés à partir d'une émulsion oxydée pendant 8 heures (Figure-III-7). L'intensité de fluorescence est maximale pour le couple ($\lambda_{exc}, \lambda_{ém}$) = (360, 423 nm).

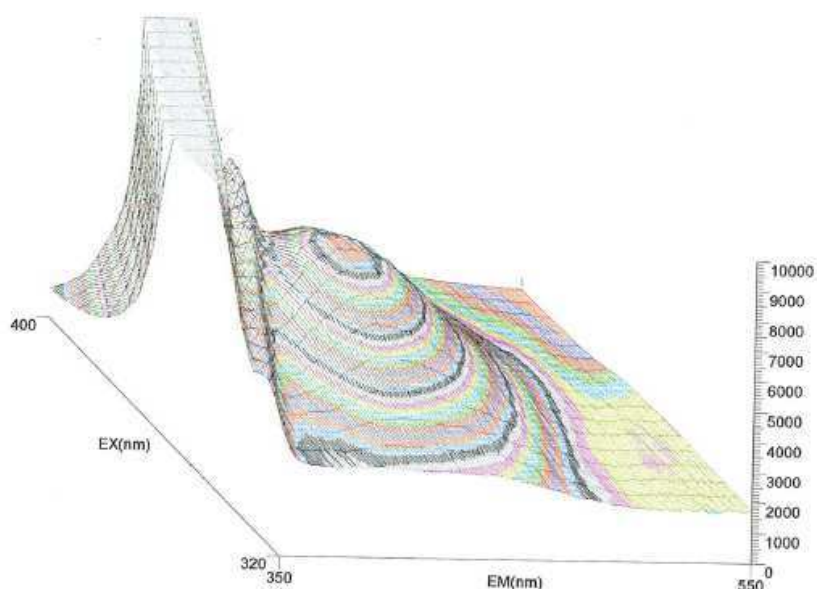


Figure-III-7. Spectre 3-D obtenu à partir d'une émulsion oxydée pendant 8 heures.

➤ **Suivi de la formation des pigments fluorescents au cours de l'oxydation**

Avec (λ_{exc} , $\lambda_{ém}$) = (360, 423 nm), l'analyse de l'oxydation de l'émulsion du modèle-SAB toutes les heures a permis de mettre en évidence la formation de chromophores fluorescents au cours du temps (Figure-III-8).

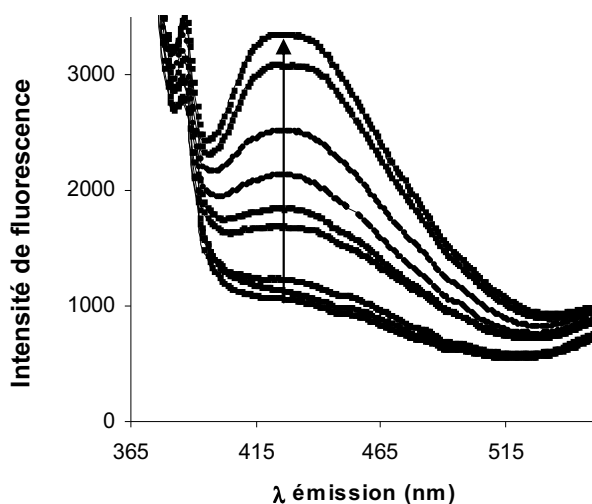


Figure-III-8. Spectres d'émission de la SAB en émulsion enregistrés au cours du temps. $\lambda_{exc} = 360$ nm.

Contrairement à la décroissance de l'intensité de fluorescence des Trp qui est immédiate, les chromophores fluorescents apparaissent après une phase de latence de 2 heures. Leur accumulation est ensuite linéaire (Figure-III-9).

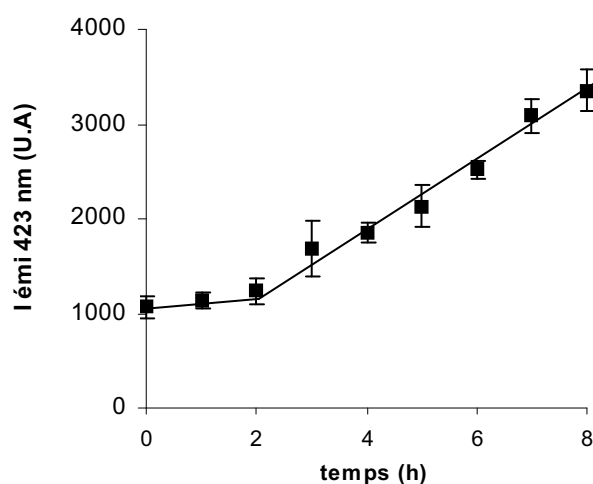


Figure-III-9. Apparition des chromophores fluorescents au cours du temps. (λ_{exc} , $\lambda_{ém}$) = (360, 423 nm).

Ce phénomène observé dans d'autres études souligne que les composés fluorescents sont produits durant les étapes ultérieures de l'oxydation et non pas durant la phase d'amorçage [25].

Dans plusieurs études, la réaction de la SAB avec des aldéhydes insaturés [31] ou lors de l'oxydation de l'acide linoléique [29, 32] conduit à la formation de produits ayant une longueur d'onde d'excitation maximale comprise entre 350 et 380 nm et une longueur d'onde d'émission maximale de 420 à 450 nm. La formation des produits fluorescents résulterait de la réaction des hydroperoxydes ou des produits secondaires de peroxydation lipidique (aldéhydes) avec les groupements amines primaires des protéines (résidus Lys) [29].

Dans une étude plus récente de la réaction de la sérum albumine avec l'hexanal et l'hex-2-énal, la formation des composés fluorescents est attribuée à une addition de Michael de résidus Lys ou His sur les aldéhydes α,β -insaturés [30].

III.2 Association de la SAB avec les composés phénoliques

Les flavonoïdes, tels que la quercétine ou la rutine, qui ne possèdent pas de propriétés de fluorescence à l'état libre, forment des complexes fluorescents avec la SAB. Leur liaison à la SAB peut ainsi être quantifiée à partir des variations de l'intensité de fluorescence dans l'intervalle 490 - 590 nm ($\lambda_{exc} = 450$ nm) en fonction de la concentration de ligand. L'intensité du plateau dépend de la substitution du flavonoïde [9].

III.2.1 Association à pH 5,8

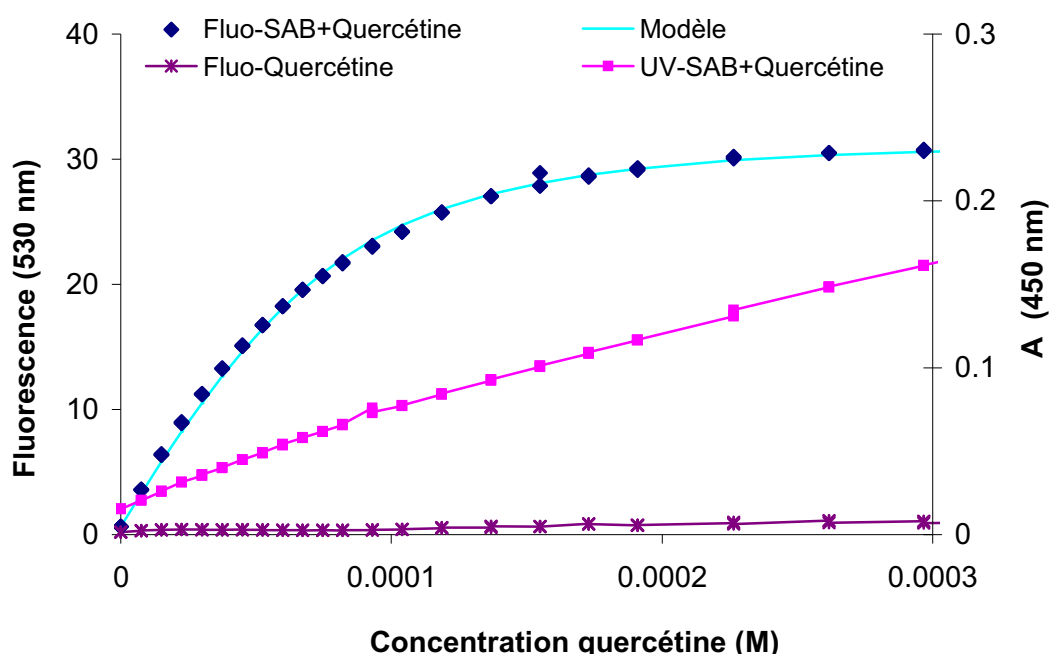


Figure-III-10. Suivi de l'intensité de fluorescence à 530 nm et de l'absorbance à 450 nm lors de la complexation quercétine-SAB. Témoin : fluorescence de la quercétine seule en fonction de sa concentration. $\lambda_{exc} = 450$ nm. [SAB] = 75 μ M. pH = 5,8.

La Figure-III-10 exprime les variations de l'intensité émise par le complexe SAB-quercétine à 530 nm ($\lambda_{exc} = 450$ nm) en fonction de la concentration de quercétine et l'ajustement à la courbe théorique selon un modèle de complexation $n = 1$ (Annexe 1). Dans ces conditions, la quercétine libre n'est pas fluorescente. Il a également été vérifié que l'effet de filtre interne est limité ($A_{450\text{ nm}} < 0,2$).

La reproductibilité a été estimée par trois expériences indépendantes conduisant à $K_1 = 56,6 (\pm 4,8) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour la quercétine et à $K_1 = 1,67 (\pm 0,14) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour la rutine. La glycosylation du groupement OH en C-3 abaisse donc l'affinité d'un facteur 45. Ces valeurs sont en bonne adéquation

avec celles de la littérature à pH 7,4: $K_1 = 110 - 134 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ et $K_1 = 1,6 - 10,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour la quercétine et la rutine, respectivement [9-11].

D'après les valeurs de K_1 , il est possible d'estimer qu'à des concentrations comprises entre 10 et 100 μM le taux de complexation de la quercétine à la SAB varie de 92 % à 87 %. Pour la rutine, ce taux est beaucoup plus faible et varie de 25 % à 23 %. La différence d'affinité pour la SAB entre quercétine et rutine met en évidence une différence de localisation dans les émulsions du modèle-SAB. La quercétine est majoritairement liée à l'albumine tandis que la majeure partie de la rutine réside en phase aqueuse.

III.2.2 Association à pH 4

Les constantes d'association pour la complexation de la SAB par la quercétine et la rutine ont également été déterminées à pH 4. A ce pH, l'affinité de la quercétine pour la SAB est estimée à $K_1 = 33 (\pm 2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ tandis que pour la rutine $K_1 = 0,3 (\pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Ainsi, en abaissant le pH de 5,8 à 4, l'affinité est réduite d'un facteur 2 pour la quercétine et d'un facteur 10 pour la rutine. En conséquence, à des concentrations comprises entre 10 et 100 μM , le taux de complexation de la quercétine à la SAB est compris entre 86 et 80 % alors que pour la rutine il est de l'ordre de 6 % seulement.

Ces résultats sont en accord avec les études de Rawel *et al.* qui mesurent une diminution de l'affinité de la quercétine pour la SAB de $K_1 = 110 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 7 à $K_1 = 41,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 5 [14]. De même, Dufour et Dangles estiment que K_1 diminue de $134 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à $86 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ quand le pH varie de 7,4 à 5 [9]. Aux alentours de pH 4, l'albumine subit une modification de sa charge globale ($\text{pH}_i = 4,7-4,9$) ainsi que des changements réversibles de configuration, mis en évidence par son comportement électrophorétique (migration plus rapide sous forme « fast » à pH 4 que sous forme « normale » à pH 5,8) [1]. L'ensemble de ces phénomènes peut expliquer sa plus faible association pour les polyphénols à pH 4.

Dans l'émulsion à pH 4, la quercétine reste donc majoritairement liée à l'albumine tandis que la rutine est essentiellement présente sous forme libre.

III.2.3 Conclusion

Beaucoup de questions se posent quant à l'activité antioxydante des polyphénols liés à l'albumine. Certains auteurs ont utilisé le test TEAC pour comparer la capacité réductrice de la

quercétine, de la SAB et des deux composés en mélange. Dans cette étude, le pouvoir antioxydant du mélange s'est révélé inférieur au pouvoir antioxydant additionné des deux espèces individuelles, mettant ainsi en évidence un phénomène de « masquage » [33]. Il faut tout de même noter que le test TEAC met en jeu le radical-cation ABTS^{•+} particulièrement volumineux et de structure très éloignée de celles des ERO d'importance biologique.

Toutefois, en système émulsionné (huile de tournesol dans l'eau), l'inhibition de l'autoxydation de l'huile par l'acide caféique, le trolox et les catéchines est renforcée par la présence de SAB (synergie). Cette observation n'est pas attribuée à l'association des composés à la SAB mais à leurs produits d'oxydation. Au cours de l'oxydation, des adduits covalents SAB-antioxydant aux propriétés antioxydantes renforcées seraient formés par couplage entre les quinones dérivées des antioxydants et certains résidus nucléophiles de la SAB. Grâce au déploiement de la partie protéique à l'interface, les adduits se concentreraient directement à la surface des gouttelettes d'huile expliquant en partie leur forte capacité protectrice [34, 35]. Les produits d'oxydation de l'acide chlorogénique réagissent aussi avec la SAB pour former des adduits covalents qui pourraient posséder de bonnes capacités antioxydantes [36].

Par ailleurs, Dufour *et al.* ont montré que la quercétine liée à la SAH était capable d'inhiber efficacement la peroxydation (induite par le dérivé azoïque AAPH) de l'acide linoléique également complexé à l'albumine. De plus, les produits d'oxydation de la quercétine étaient les mêmes que ceux identifiés dans cette étude, à savoir le composé de type benzofuranone, l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque et l'acide 2,4,6-trihydroxyphénylglyoxylique [37]. Ce qui est particulièrement étonnant, c'est que la quercétine liée à SAH est consommée aussi rapidement que la quercétine libre sous le flux de radicaux peroxydes hydrophiles issus du AAPH. Pour interpréter ces observations, on peut proposer que les radicaux initiateurs hydrophiles attaquent certains résidus oxydables à la périphérie de la protéine et que les radicaux protéiques ainsi formés propagent rapidement (*'long-range electron transfers'*) vers le site de liaison de la quercétine au sein du sous-domaine IIA pour être réduits par cette dernière. Certains de ces radicaux protéiques seraient également impliqués dans l'initiation de l'oxydation des ligands linoléates (essentiellement localisés dans le domaine III) d'où l'inhibition de ce phénomène par la quercétine [38]. Enfin et en bon accord avec les résultats précédents, des travaux de l'équipe ont également montré que la quercétine liée à la SAH était aussi rapidement oxydée que la quercétine libre par des oxydants monoélectroniques tels que le nitrosodisulfonate de potassium et biélectroniques comme le périodate de sodium [39, 40].

Ainsi dans un système émulsionné, l'association SAB-polyphénol peut permettre de localiser les composés antioxydants directement à l'interface huile-eau pour une meilleure protection. Cependant, il faut rappeler que 3,6 % seulement de la SAB est adsorbé à l'interface, ce qui restreint considérablement le taux de quercétine ou de rutine à proximité de la phase lipidique. En outre, l'étude précédente a montré que la conformation de la SAB est sensiblement modifiée quand la protéine est adsorbée à l'interface huile-phase aqueuse. L'affinité de la quercétine et de la rutine pourrait donc être modifiée en conséquence et dans un sens difficile à prévoir. La constante d'association mesurée en solution n'est sans doute pas une mesure très fiable de l'affinité des flavonols pour la SAB adsorbée.

III.3 Activation de la metmyoglobine par les hydroperoxydes en présence ou en absence de metmyoglobine

La réaction de la metmyoglobine (MbFe^{III}) avec H₂O₂ se déroule via une oxydation à deux électrons avec formation d'un centre fer-oxo (Fe^{IV}=O) et d'un radical protéique localisé sur Tyr-103 ou Trp-14. La forme activée de la metmyoglobine est appelée perferrylmyoglobine (Mb[•]Fe^{IV}=O). En absence de sources externes d'électrons, Mb[•]Fe^{IV}=O évolue rapidement vers la ferrylmyoglobine plus stable (MbFe^{IV}=O) par un processus encore mal connu d'auto-réduction. Durant l'auto-réduction, la globine est la source principale d'électrons, comme en témoigne la formation de résidus dityrosine [41]. En solution acide, un mécanisme alternatif peut se dérouler à partir de la forme protonée de Mb[•]Fe^{IV}=O (Mb[•]Fe⁺-OH) avec formation d'une liaison covalente entre le noyau porphyrine et Tyr-103. Un pigment vert est alors formé (GMbFe^{III}) [42]. En présence de sources externes d'électrons (antioxydants, lipides polyinsaturés, protéines), les formes Mb[•]Fe^{IV}=O et MbFe^{IV}=O peuvent être réduites. MbFe^{IV}=O est notamment un bon initiateur de la peroxydation lipidique [43, 44], alors que Mb[•]Fe^{IV}=O capte efficacement les électrons des protéines pour produire des radicaux protéiques relativement stables [41, 45]. Sous sa forme protonée (pKa ≈ 5), MbFe^{IV}=O est aussi efficace que Mb[•]Fe^{IV}=O pour produire des radicaux à partir de la SAB à en juger par le taux de résidus diTyr [45]. Enfin, MbFe^{IV}=O elle-même peut évoluer lentement par auto-réduction ou être réduite par des antioxydants variés, incluant de nombreux polyphénols [46-48]. La Figure-III-11 et l'annexe 2 récapitule ces mécanismes.

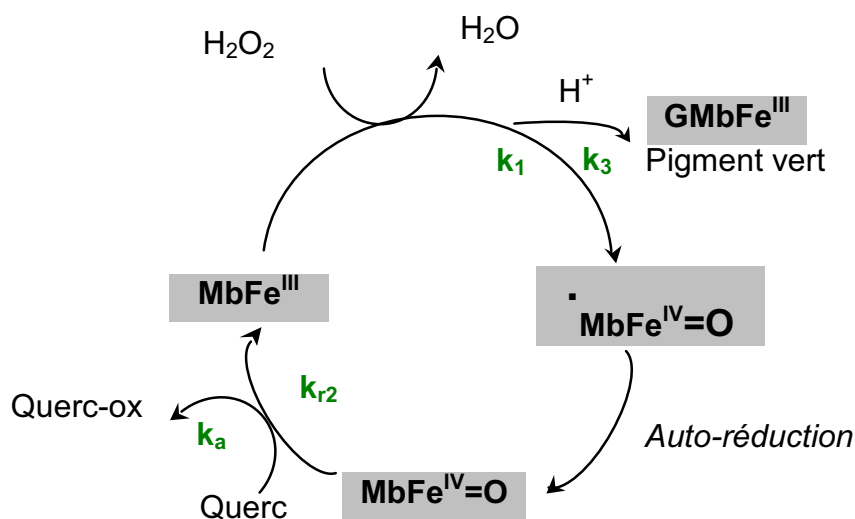


Figure-III-11. Cycle rédox des différentes espèces de la myoglobine.

III.3.1 Activation de MbFe^{III} par H₂O₂ et réduction des espèces hypervalentes de la myoglobine par la quercétine en présence ou en absence de SAB

a) Observations qualitatives

➤ Activation de MbFe^{III} par H₂O₂

Quand une solution moyennement acide de MbFe^{III} ($\lambda_{\text{max}} = 505$ nm, bande secondaire à 635 nm) est traitée par de H₂O₂ (1 équivalent), la formation de ferrylmyoglobine (MbFe^{IV}=O) peut être observée par une augmentation de l'absorbance à 590 nm et, dans une moindre mesure, à 550 nm (Figure-III-12-A).

Quand l'expérience est répétée en présence de 3 équivalents de SAB, des changements importants sont observés. Bien que la SAB n'altère pas le spectre initial de MbFe^{III}, son influence sur le procédé d'activation est claire : la bande à 550 nm devient plus intense que celle à 590 nm (Figure-III-12-B). Le spectre final est alors très proche de celui de la MbFe^{IV}=O à pH neutre [46, 47, 49], c'est-à-dire dans des conditions où la formation du pigment vert (GMbFe^{III}) est négligeable.

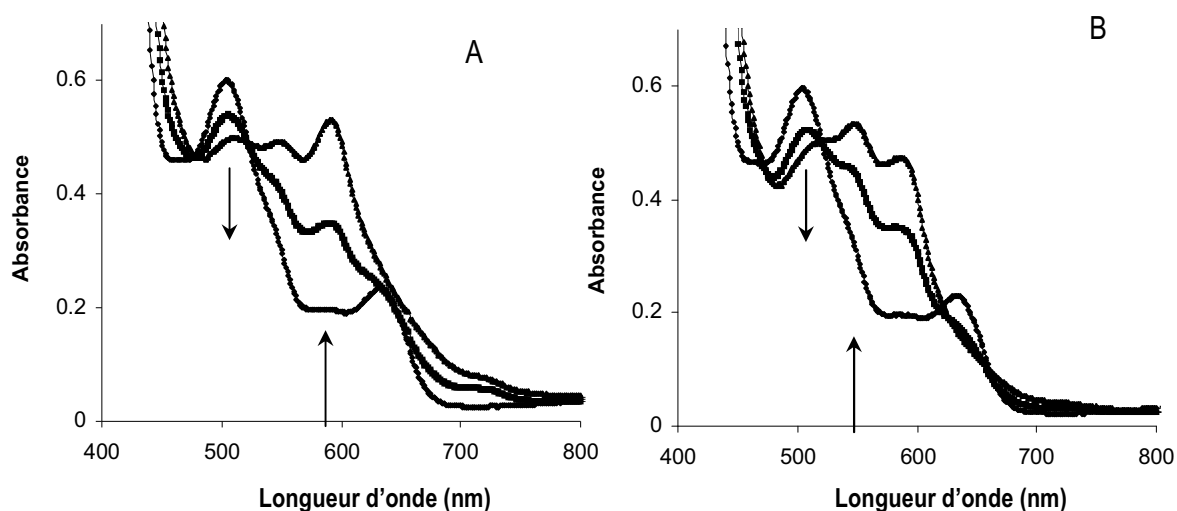


Figure-III-12. Changements spectraux durant la formation de MbFe^{IV}=O en absence (A) ou en présence de SAB (B) dans le tampon phosphate pH 5,8. [MbFe^{III}] = 60 μ M, [H₂O₂] = 60 μ M, [SAB] = 180 μ M.

On peut donc supposer que la SAB atténue la formation du pigment vert qui se manifeste par une forte absorption à 590 nm en absence de SAB [43].

➤ Réduction de la MbFe^{IV}=O

En raison de la forte contamination par le pigment vert inerte en absence de SAB, l'étape suivante d'auto-réduction de MbFe^{IV}=O ou de sa réduction par la quercétine n'entraîne que des

changements spectraux modestes. En effet, le taux de régénération de MbFe^{III} à partir de MbFe^{IV}=O est faible. Au contraire, en inhibant la formation de GMbFe^{III}, la SAB permet une conversion importante de MbFe^{IV}=O en MbFe^{III} par auto-réduction ou, bien plus rapidement, par transfert d'électrons depuis la quercétine (Figure-III-13). Parce que des radicaux SAB peuvent se former par réaction de la SAB avec Mb[•]Fe^{IV}=O [41, 45, 50], une partie de la quercétine peut aussi être consommée par transfert d'électrons aux radicaux SAB eux-mêmes. De plus, le lent déclin de MbFe^{IV}=O en présence de SAB pourrait refléter non seulement le procédé d'auto-réduction mais aussi la réduction du centre fer-oxo par la SAB.

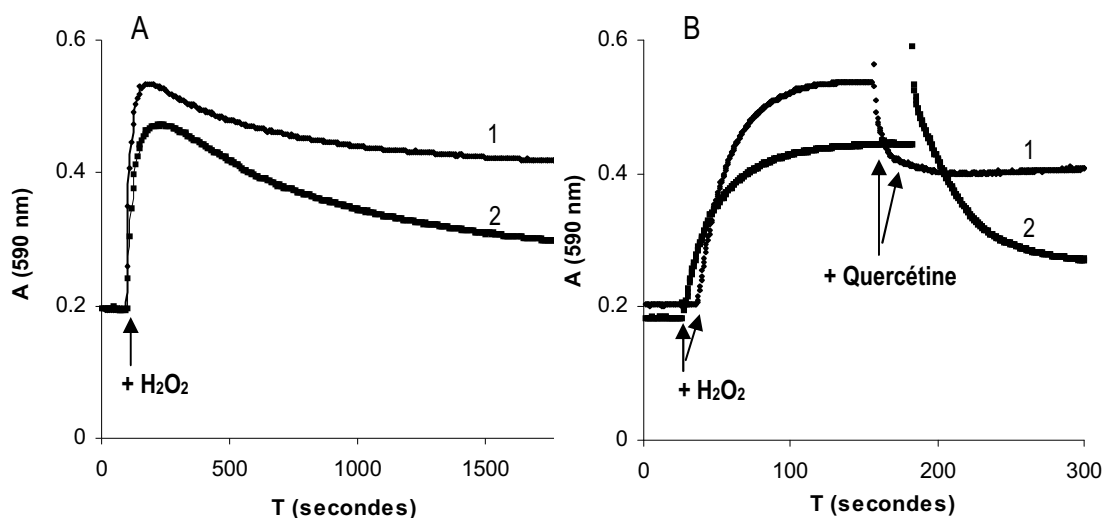


Figure-III-13. A - Changements spectraux consécutifs à l'addition de H₂O₂ (1 équivalent) à une solution de MbFe^{III} (60 μM) en absence (1) ou présence (2) de SAB (3 équivalents). B – Idem mais avec addition de quercétine (1 équivalent) au bout d'environ 3 min, T = 37 °C, pH = 5,8.

b) Analyse cinétique quantitative

➤ En présence de SAB

Pour l'analyse quantitative, l'activation de MbFe^{III} par H₂O₂ et la réduction successive des espèces hypervalentes formées sont plus simples à étudier en présence de SAB car la formation du pigment vert est négligeable. Après l'addition de H₂O₂ (1 équivalent), la courbe A_{590 nm} vs. temps (Figure-III-13-A-2) a été analysée en deux temps sur une durée de 30 minutes. La formation de MbFe^{IV}=O (étape rapide, constante de vitesse du second ordre k₁, coefficient d'absorption molaire ε₁ pour MbFe^{IV}=O) est analysée selon un simple modèle de réaction bimoléculaire. Le déclin de MbFe^{IV}=O par conversion en une forme oxydée notée oxMbFe^{III} (étape lente, constante de vitesse du premier ordre k₂ ≈ 2x10⁻³ s⁻¹, coefficient d'absorption molaire ε₂ pour oxMbFe^{III}) est analysée selon un simple modèle de réaction unimoléculaire (Tableau-III-6).

Tableau-III-6. Analyse cinétique de l'activation de la metmyoglobine par le peroxyde d'hydrogène ^a.

Rapport molaire H ₂ O ₂ /MbFe	k ₁ , k ₃ / M ⁻¹ s ⁻¹ ^b	k _{r2} (10 ⁴ / s ⁻¹) ^c	ε ₁ , ε ₃ / M ⁻¹ cm ⁻¹ ^d	ε ₂ / M ⁻¹ cm ⁻¹ ^e
1, sans BSA	630, 355 (± 33)	28.8 (± 0.7)	9500, 11410 (± 270)	4440 (± 110)
	630, 268 (± 28)	31.3 (± 0.7)	9500, 13040 (± 450)	4720 (± 80)
1, + BSA	651 (± 11)	19.3 (± 0.2)	9480 (± 30)	4790 (± 10)
	734 (± 11)	18.3 (± 0.2)	9180 (± 20)	4850 (± 10)
10, + BSA	425 (± 4) ^f	-	8610 (± 10), 9370 (± 10)	-
	455 (± 6) ^g	-	9070 (± 20), 9520 (± 10)	-

^a: détection à 590 nm, MbFe^{III} (60 μM) + H₂O₂ (60 μM) ± SAB (180 μM)

^b: k₁: constante de vitesse du second ordre de la conversion de MbFe^{III} en MbFe^{IV}=O; k₃: constante de vitesse du second ordre de la conversion de MbFe^{III} en GMbFe^{III}.

^c: k_{r2}: constante de vitesse du premier ordre pour l'auto-réduction de MbFe^{IV}=O en oxMbFe^{III}.

^d: coefficients d'absorption molaire de MbFe^{IV}=O et de GMbFe^{III} respectivement.

^e: coefficient d'absorption molaire de oxMbFe^{III}.

^f: constante de vitesse du premier ordre pour l'auto-réduction de Mb^{*}Fe^{IV}=O en MbFe^{IV}=O, k_r = 84 (± 4) x10⁻⁴ s⁻¹.

^g: k_r = 107 (± 12) x10⁻⁴ s⁻¹.

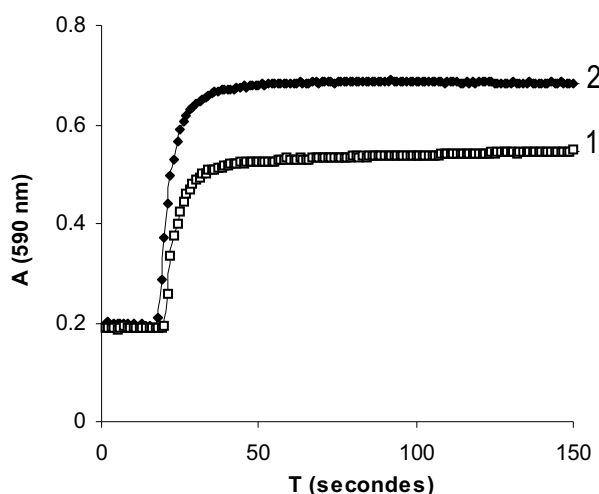


Figure-III-14. Changements spectraux suivant l'addition de H₂O₂ (10 équivalent) à une solution de MbFe^{III} (60 μM) en absence (1) ou présence (2) de SAB (3 équivalents), T = 37 °C, pH = 5,8.

Quand la réaction est répétée avec un excès de H₂O₂ (10 équivalents), le déclin de MbFe^{IV}=O n'est plus détectable mais l'intensification de sa bande d'absorption à 590 nm apparaît maintenant biphasique (Figure-III-14-2). Elle implique donc une espèce intermédiaire qui évolue vers la forme MbFe^{IV}=O selon une cinétique apparente du premier ordre (constante de vitesse k_r ≈ 10⁻² s⁻¹). Cette espèce transitoire pourrait être Mb^{*}Fe^{IV}=O même si sa demi-vie (environ 70 s) est plus longue que les données de la littérature en absence de SAB [41].

A partir des valeurs de k_2 et ϵ_2 , obtenues en excès de H₂O₂, les courbes A_{590 nm} vs. temps enregistrées durant les 2-3 minutes qui suivent l'addition de H₂O₂ (1 équivalent) et avant l'addition de quercétine (première étape) ont été ré-analysées pour extraire des valeurs plus fines de k_1 et ϵ_1 et ainsi estimer les concentrations de MbFe^{III}, MbFe^{IV=O} et oxMbFe^{III} au moment de l'addition de quercétine (point de départ de la seconde étape) (Tableau-III-7).

Tableau-III-7. Analyse cinétique de l'activation de la metmyoglobine par le peroxyde d'hydrogène et de la réduction successive de la ferrylmyoglobine par la quercétine^a.

Rapport molaire MbFe/quercétine	$k_3 / M^{-1} s^{-1} b$	$\epsilon_3 / M^{-1} cm^{-1} c$	MbFe, MbFe=O, GmbFe, oxMbFe / $\mu M d$	$k_a / M^{-1} s^{-1} e$
1, sans SAB ^f	264 (± 3)	12200	7,3; 28,5; 15,8; 9,3	3433 (± 84)
	346 (± 6)	12200	9,5; 28,2; 19,2; 6,7	
2, sans SAB ^f	150 (± 1)	12200	6,9; 31,2; 10,2; 11,6	8379 (± 52)
	324 (± 4)	12200	10,0; 29,0; 18,3; 6,6	7618 (± 63)
4, Sans SAB ^f	127 (± 3)	12200	7,5; 32,4; 8,8; 11,2	5004 (± 76) ^g
	397 (± 5)	12200	8,3; 26,8; 21,6; 7,4	8029 (± 101) ^h
Rapport molaire MbFe/quercétine	$k_1 / M^{-1} s^{-1} i$	$\epsilon_1 / M^{-1} cm^{-1} j$	MbFe, MbFe=O, oxMbFe / $\mu M d$	$k_a / M^{-1} s^{-1} e$
1, SAB ^k	650 (± 2)	8810 (± 10)	7,2; 41,6; 10,8	643 (± 4)
	638 (± 2)	10410 (± 10)	13,9; 44,0; 5,7	532 (± 6)
2, SAB ^k	587 (± 1)	8580 (± 10)	7,3; 40,9; 11,6	594 (± 9)
	588 (± 3)	10220 (± 10)	12,2; 44,1; 7,7	661 (± 8)
4, SAB ^k	507 (± 4)	9080 (± 10)	10,2; 40,9; 8,9	881 (± 18) ^l
	842 (± 2)	9890 (± 10)	10,6; 46,7; 6,8	741 (± 10) ^m

^a: détection à 590 nm, MbFe^{III} (60 μM) + H₂O₂ (60 μM) ± SAB (180 μM)

^b: k_3 : constante de vitesse du second ordre de la conversion de MbFe^{III} en GmbFe^{III}.

^c: coefficient d'absorption molaire de GmbFe^{III}.

^d concentrations au moment de l'ajout de quercétine.

^e: k_a : constante de vitesse du second ordre pour la réduction de MbFe^{IV=O} par la quercétine

^f: paramètres fixés: $k_1 = 630 M^{-1} s^{-1}$, $k_2 = 3 \times 10^{-3} s^{-1}$, $\epsilon_1 = 9500$, $\epsilon_2 = 4600 M^{-1} cm^{-1}$.

^g: nombre d'espèces MbFeO réduites par molécule de quercétine ($n = 2,16 (\pm 0,01)$). ^h: $n = 1,36 (\pm 0,01)$.

ⁱ: k_1 : constante de vitesse du second ordre pour la conversion de MbFe^{III} en MbFe^{IV=O}.

^j: coefficient d'absorption molaire de MbFe^{IV=O}.

^k: paramètres fixés: $k_2 = 19 \times 10^{-4} s^{-1}$ (sauf ^l, ^m), $\epsilon_2 = 4800 M^{-1} cm^{-1}$.

^l: $k_2 = 14.9 (\pm 0.6) \times 10^{-4} s^{-1}$ d). ^m: $k_2 = 9.9 (\pm 0.2) \times 10^{-4} s^{-1}$.

En utilisant les concentrations de MbFe^{IV=O} au moment de l'addition de quercétine, le déclin de A_{590 nm} durant la seconde étape (Figure-III-13-B-2) a été analysé en prenant en compte l'auto-réduction de

MbFe^{IV}=O (lente) et sa réduction compétitive par la quercétine (constante de vitesse du second ordre k_a). On obtient ainsi : $k_a = 5-7 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

➤ **En absence de SAB**

Pour analyser la situation plus compliquée de l'activation de MbFe^{III} par H₂O₂ et de la réduction successive de MbFe^{IV}=O en absence de SAB, la constante de vitesse k_1 de formation de MbFe^{IV}=O et son coefficient d'absorption molaire ϵ_1 ont été fixés aux valeurs moyennes estimées en présence de SAB : $k_1 = 630 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\epsilon_1 = 9500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La courbe $A_{590 \text{ nm}}$ vs. temps a été enregistrée sur plus de 10 minutes (Figure-III-13-A-1) et analysée selon un modèle cinétique supposant la formation compétitive de MbFe^{IV}=O et du pigment vert GMbFe^{III} (constante de vitesse k_3 , coefficient d'absorption molaire ϵ_3) à partir de MbFe^{III} et l'auto-réduction successive de MbFe^{IV}=O en oxMbFe^{III}.

Nous avons ainsi obtenu des estimations pour la constante de vitesse d'auto-réduction de MbFe^{IV}=O en absence de SAB ($k_{r2} \approx 3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) et les coefficients d'absorption molaires de oxMbFe^{III} et de GMbFe^{III} : $\epsilon_2 = 4600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (en accord avec les valeurs obtenues en présence de SAB), $\epsilon_3 = 12200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tableau-III-6).

Ce nouvel ensemble de données a permis d'analyser l'activation de MbFe^{III} après addition de H₂O₂ (1 équivalent) et d'extraire une constante k_3 affinée ainsi que les concentrations des différentes espèces héminiques avant l'addition de quercétine, Il est à noter que la constante de vitesse de formation de la ferrylmyoglobine est plus importante que celle de formation du pigment vert, ce qui est en accord avec la littérature [42].

Enfin, le déclin de $A_{590 \text{ nm}}$ suivant l'addition de quercétine a permis de déterminer la constante de vitesse de réduction de MbFe^{IV}=O par la quercétine : $k_a = 5-8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tableau-III-7 et Figure-III-13-B-1). Il est à remarquer que la quercétine liée à la SAB reste capable de réduire MbFe^{IV}=O bien que la constante de vitesse soit plus faible d'un facteur 10 que celle estimée en absence de SAB. Ce résultat est cohérent avec les travaux récents de l'équipe, suggérant la possibilité de transferts d'électrons à longue distance entre la périphérie de la SAB (sites primaires d'attaque oxydante) et le site de liaison de la quercétine localisé dans le sous-domaine IIA [38]. Comme le montre le paragraphe suivant, ce processus est favorisé par la formation préalable d'un complexe metmyoglobine-sérum albumine.

c) Association SAB/MbFe^{III}

Nous n'avons pas pu mettre en évidence une interaction directe entre la metmyoglobine et la quercétine (pas de quenching significatif de la fluorescence intrinsèque de la metmyoglobine dû aux résidus Trp). En revanche, un important quenching de la fluorescence du complexe SAB-quercétine a été observé par ajout de metmyoglobine ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{ém} = 535 \text{ nm}$) (Figure-III-15). Un traitement mathématique de la courbe de quenching a permis de déterminer une constante d'association $K = 42,3 (\pm 0,4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pH 5,8, 37 °C). Ainsi, il est concevable que la réduction de la ferrylmyoglobine par la quercétine liée à la SAB ait lieu via un complexe associant les deux protéines.

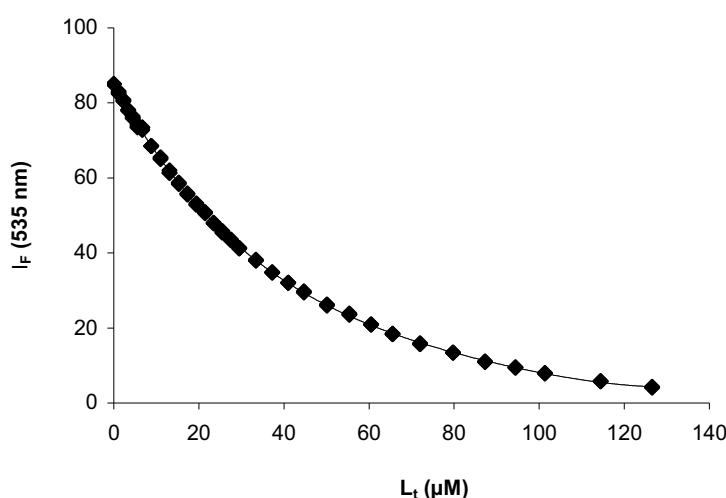


Figure-III-15. Quenching de la fluorescence du complexe SAB-quercétine en fonction de la concentration de metmyoglobine (L_t) ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$, pH = 5,8, 37°C). La courbe correspond au résultat du traitement mathématique dans l'hypothèse d'une association 1:1 entre les deux protéines : $K = 42,3 (\pm 0,4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $f = 203,4 (\pm 0,3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $r = 0,997$.

Pour résumer, la SAB n'altère pas l'activation de la metmyoglobine en ferrylmyoglobine par H_2O_2 mais prévient le couplage covalent entre le cofacteur hémique de la perferrylmyoglobine protonée et la chaîne globine, probablement en réduisant directement le radical protéique. Dès lors, on peut tout à fait concevoir que la metmyoglobine (activée par les hydroperoxydes) reste un initiateur efficace de la peroxydation lipidique en présence de SAB. De plus, la quercétine liée à la SAB est toujours capable de réduire $\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (bien que moins rapidement qu'en absence de SAB). A ce titre, la quercétine doit pouvoir inhiber efficacement la peroxydation lipidique dans les émulsions stabilisées par la SAB.

III.3.2 Activation de la metmyoglobine par les hydroperoxydes issus de l'acide linoléique en présence ou en absence de SAB

Afin de se rapprocher des conditions des milieux modèles émulsionnés, le peroxyde d'hydrogène a été remplacé par les hydroperoxydes issus de l'autoxydation de l'acide linoléique. Cette partie relate leur préparation puis leurs effets sur la metmyoglobine en présence ou en absence de SAB.

a) Préparation des LOOH

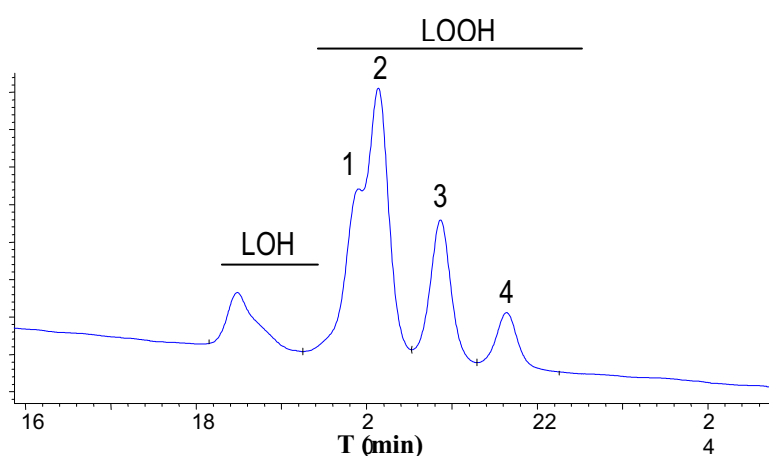


Figure-III-16. Chromatogramme des LOOH ($\lambda = 234$ nm).

Les hydroperoxydes (LOOH) préparés par autoxydation de l'acide linoléique sont un mélange de différents régio- et diastéréoisomères, soit 4 pics sur le chromatogramme CLHP (Figure-III-16). D'après les données de Dufour et Loonis [22], le pic 1 correspond à l'acide 13-hydroperoxy-(9Z,11E)-octadécadiénoïque, le pic 2 à l'acide 9-hydroperoxy-(10E,12Z)-octadécadiénoïque, le pic 3 à l'acide 13-hydroperoxy-(9E,11E)-octadécadiénoïque et le pic 4 à l'acide 9-hydroperoxy-(10E,12E)-octadécadiénoïque. De plus, les alcools correspondants (LOH) sont aussi produits en faible quantité ainsi que les cétones (détectées à 280 nm) en quantités plus faibles encore (résultats non présentés). Les fractions obtenues lors de la séparation des hydroperoxydes par chromatographie sur silice sont réparties en 3 lots : l'un contenant majoritairement les 9-LOOH, l'autre les 13-LOOH et le dernier un mélange des deux types de régioisomères.

b) Analyses spectroscopiques

➤ **Activation de la metmyoglobine par les LOOH : formation de la ferrylmyoglobine**

D'après l'augmentation de A_{590 nm}, la réaction de formation de la ferrylmyoglobine paraît très lente ($k_1 \approx 15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) quelle que soit la structure des hydroperoxydes (9-LOOH, 13-LOOH ou mélange des régioisomères), (Tableau-III-8). Elle conduit en outre à une espèce qui n'absorbe que faiblement à 590 nm ($\epsilon_1 \approx 3500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, contre $9500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour MbFe^{IV}=O). La formation de ferrylmyoglobine est donc marginale dans ces conditions. Ces résultats sont cohérents avec des travaux antérieurs dans l'équipe et qui montrent que l'activation de MbFe^{III} par les LOOH s'accompagne d'une dégradation du noyau porphyrine qui sera confirmée dans le paragraphe suivant. Il y a donc formation d'une entité difficilement caractérisable, notée oxMbFe^{IV}=O, qui n'absorbe que très faiblement à 590 nm, ce qui rend l'analyse dans le domaine visible très peu sensible.

Tableau-III-8. Analyse cinétique de l'activation de la metmyoglobine par les hydroperoxydes de l'acide linoléique liés à la SAB (rapport molaire LOOH/MbFe^{III} = 3) et désactivation successive par la quercétine. Sauf indication contraire, le mélange 9+13-LOOH est utilisé.

Conditions	$k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \text{ }^b$ $k_{r2} / \text{s}^{-1} \text{ }^c$	$k_a / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\epsilon_1 / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{ }^d$	$\epsilon_2 / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{ }^e$
a	13,3 (± 0.1)	-	3480 (± 1)	-
a (13-LOOH)	13,5 (± 0.2) 92 (± 2) x10 ⁻⁶	-	4045 (± 10)	0
a (9-LOOH)	15,4 (± 0.3) 61 (± 2) x10 ⁻⁶	-	3556 (± 9)	0
f	17,6 (± 0,1)	-	3480 (± 10)	-
f	15,6 (± 0,1)	-	3430 (± 10)	-
+ quercétine (125 µM) ^g	-	1340 (± 30)	-	3100 (± 10)
+ quercétine (63 µM) ^g	-	1600 (± 40)	-	3140 (± 10)
+ quercétine (32 µM) ^g	-	1180 (± 20)	-	2740 (± 10)

^a : analyse de la croissance de A(590 nm) après addition de LOOH à la solution de MbFe^{III} (60 µM) en présence de SAB (3 équiv.). Une première phase (10-20 s) de changements spectraux chaotiques est ignorée (solubilisation des LOOH).

^b : k_1 : constante du second ordre pour la conversion de MbFe^{III} en oxMbFe^{IV}=O

^c : k_{r2} : constante du premier ordre pour la dégradation de oxMbFe^{IV}=O en une espèce n'absorbant pas à 590 nm.

^d: coefficient d'absorption molaire de oxMbFe^{IV}=O.

^e: coefficient d'absorption molaire de oxMbFe^{III}.

^f: analyse de la croissance de A(590 nm) après addition de MbFe^{III} (concentration finale = 50-60 µM) à une solution équimolaire de LOOH et SAB (3 équiv.).

^g: analyse de la décroissance de A(590 nm) après addition de quercétine à une solution de MbFe^{III} activée par les LOOH.

➤ **Dégradation de l'hème**

La dégradation de l'hème est flagrante d'après le déclin rapide de l'absorbance à 410 nm qui correspond à la bande de Soret caractéristique du noyau porphyrine (Figure-III-17). La consommation de la metmyoglobine après ajout des hydroperoxydes de l'acide linoléique peut donc être analysée de manière beaucoup plus sensible à 410 nm qu'à 590 nm (Tableau-III-9).

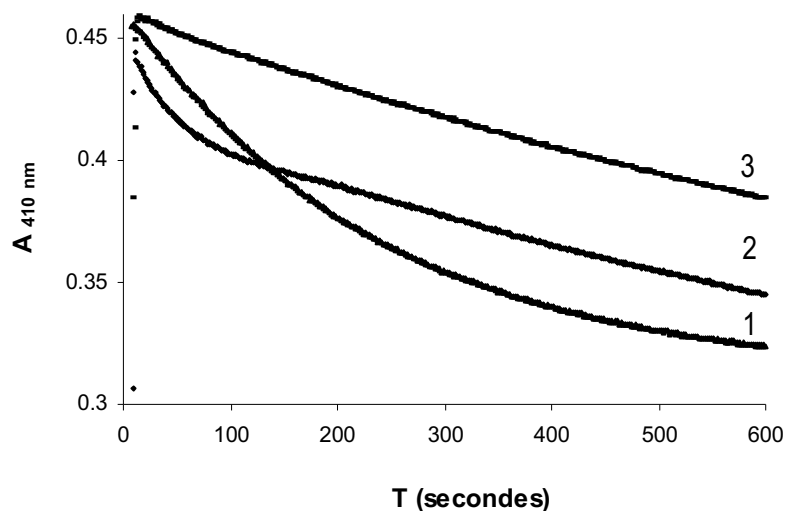


Figure-III-17. Déclin de la bande de Soret après addition de H₂O₂ (concentration finale = 3 μM) ou de LOOH (concentration finale = 12 μM) à une solution de MbFe^{III} (3 μM) en absence ou en présence de SAB (9 μM). 1 : H₂O₂ + SAB, 2 : LOOH, 3 : LOOH + SAB.

La réaction en présence de SAB ($k_1 \approx 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) est beaucoup plus lente qu'en l'absence de SAB ($k_1 \approx 2\text{-}3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dans ce dernier cas seulement, la formation rapide d'une première espèce (constante de vitesse k_1) évoluant selon un processus du 1^{er} ordre apparent (constante de vitesse $k_2 \approx 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) peut être mise en évidence. Un tel déclin à 410 nm a déjà été rapporté dans le cas d'un fort rapport molaire acide linoléique/hème (250) [51]. A pH 5,8, la dégradation de l'hème est plus lente pour la metmyoglobine (déclin monoexponentiel avec $k_{\text{obs}} = 10,5 (\pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) que pour l'hématine (déclin biexponentiel avec $k_{\text{obs}} = 27,3 (\pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et $4,6 (\pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), ce qui indique que la partie globine de la metmyoglobine inhibe de façon modérée la dégradation de l'hème.

Tableau-III-9. Analyse cinétique de l'activation de la metmyoglobine par H₂O₂ ou les hydroperoxydes de l'acide linoléique.

	$k_1 / M^{-1} s^{-1}$	$10^5(k_2 / s^{-1})$	$10^3(\epsilon_1 / M^{-1} cm^{-1})$	$10^3(\epsilon_2 / M^{-1} cm^{-1})$
H ₂ O ₂	1320 (± 10)	-	101.3 (± 0,2)	-
H ₂ O ₂	1320 (± 10)	-	105.4 (± 0,2)	-
H ₂ O ₂ , SAB	1100 (± 10)	-	82.5 (± 0,2)	-
H ₂ O ₂ , SAB	1230 (± 10)	-	99.7 (± 0,3)	-
LOOH	3000 (± 30)	45 (± 2)	134.9 (± 0,1)	39 (± 4)
LOOH	2220 (± 20)	35 (± 1)	147.5 (± 0,1)	39 ^b
LOOH, SAB	77 (± 1)	-	90.4 (± 0,5)	-
LOOH, SAB	119 (± 3)	-	115.8 (± 0,7)	-
LOOH, SAB	107 (± 1)	-	121.6 (± 0,2)	-

^a: analyse du déclin de A(410 nm) après addition de H₂O₂ (concentration finale = 3 µM) ou de LOOH (concentration finale = 12 µM) à une solution de MbFe^{III} (3 µM) en absence ou en présence de SAB (9µM).

^b: maintenu constant

Pour comparaison, les modifications de la bande de Soret après ajout de H₂O₂ ont été également étudiées et reportées sur la Figure-III-17. Dans ce cas et en accord avec d'autres études [52], le déclin de A_{410 nm} va de pair avec l'augmentation de A_{430 nm} (Figure-III-18). Il y a donc un élargissement de la bande de Soret lors de l'activation de MbFe^{III} par H₂O₂ plutôt qu'un déclin net comme observé avec les LOOH. Ainsi, la dégradation de l'hème serait marginale avec H₂O₂ en accord avec la détection beaucoup plus facile de la ferrylmyoglobine à 590 nm. La constante de vitesse d'activation de MbFe^{III} par H₂O₂ déduite de l'analyse de la bande de Soret ($k_1 \approx 1,1-1,3 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$) apparaît deux fois plus élevée environ que celle déterminée à 590 nm via l'accumulation de la ferrylmyoglobine ($k_1 \approx 0,63-0,7 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$). Cette observation suggère que l'intermédiaire perferrylmyoglobine (Mb[•]Fe=O) n'est pas exclusivement converti en MbFe=O (et pigment vert en l'absence de SAB). Enfin, comme dans l'analyse à 590 nm, l'influence de la SAB sur la réaction d'activation de MbFe^{III} par H₂O₂ est négligeable. La situation est bien différente avec les LOOH qui, fortement liés à la SAB, accèdent plus difficilement à l'hème.

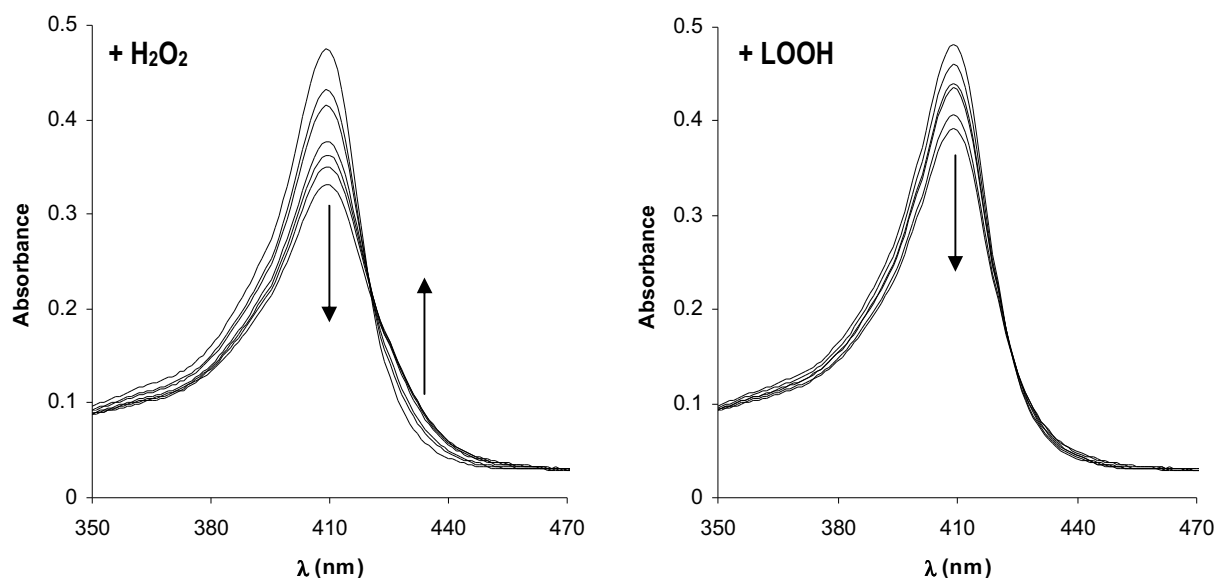


Figure-III-18. Modifications de la bande de Soret durant la réaction de MbFe^{III} (3 μM) avec LOOH (12 μM) ou H₂O₂ (3 μM) en présence de SAB (9 μM), pH = 5,8 et T = 37°C.

c) Analyses CLHP

L'analyse CLHP de la décomposition des hydroperoxydes de l'acide linoléique confirme que la réaction est rapide en l'absence de SAB (Figure-III-19). La consommation des LOOH suit une cinétique du 1^{er} ordre apparent ($k_{\text{obs}} = 155 (\pm 6) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) en bon accord avec la cinétique de formation des cétones correspondantes (L=O, $k_{\text{obs}} = 105 (\pm 19) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) qui sont les produits majoritaires de la réaction. En revanche, la concentration des alcools (9- et 13-LOH) reste quasi-constante de sorte que le rapport molaire L=O/LOH évolue de 0,7 à 3,3 au cours de la réaction. Les pertes en produits d'oxydation lipidiques (produits autres que L=O et LOH et correspondant probablement à des produits de coupure de la chaîne hydrocarbonée) sont évaluées à 28 %. La constante de vitesse k_1 de coupure des LOOH par MbFe est grossièrement évaluée à partir de la relation $k_{\text{obs}} = k_1/C_0$, C_0 désignant la concentration initiale de metmyoglobine. On obtient ainsi : $k_1 = 25 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En présence de SAB, la décomposition des LOOH est beaucoup plus lente mais conduit à des conclusions similaires : la réaction conduit majoritairement aux cétones et le rapport molaire L=O/LOH passe de 0,7 à 4,1. On estime à 22 % les autres produits d'oxydation lipidiques. Les constantes de vitesse apparentes de consommation des LOOH et formation de L=O sont estimées à $11,5 (\pm 3,0) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et $8,8 (\pm 1,8) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivement. On en déduit une estimation grossière de k_1 : $k_1 = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

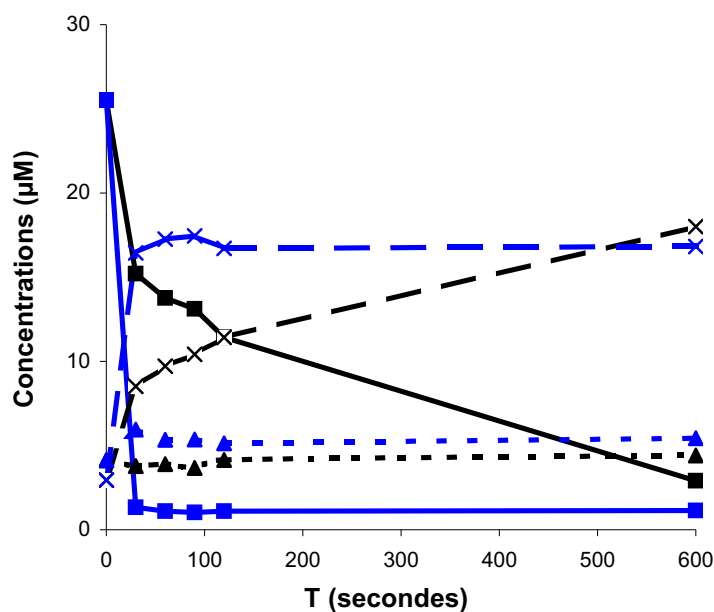


Figure-III-19. Analyse par CLHP de la conversion des hydroperoxydes de l'acide linoléique (carrés, trait continu) en cétones (croix, trait pointillé) et en alcools (triangles, trait pointillé) après addition de MbFe^{III} (6 µM) en absence (bleu) ou en présence (noir) de SAB, [SAB] = 18 µM, [LOOH] = 24 µM.

Si l'analyse CLHP confirme que la décomposition des hydroperoxydes de l'acide linoléique est au moins 10 fois plus lente en présence de SAB (0,74 équiv.), elle conduit à des constantes de vitesse dont l'ordre de grandeur est bien supérieur (un facteur 10 en l'absence de SAB, un facteur 20 en présence de SAB) à celui déduit de l'analyse du déclin de la bande de Soret (Tableau-III-9). Ce résultat suggère que seule une fraction des espèces oxydantes produites par la décomposition des LOOH par MbFe^{III} participent à la dégradation de l'hème. Dans la mesure où les cétones sont les produits majoritaires de la réaction, la coupure des LOOH procède majoritairement par un mécanisme homolytique avec formation de radicaux oxyl LO[•]. Il s'ensuit probablement une séquence de réactions très rapides conduisant au radical HOO[•], qui pourrait être principalement impliqué dans la dégradation de l'hème (Figure-III-20). En parallèle, une partie importante des radicaux HOO[•] attaquerait d'autres cibles, en particulier les résidus oxydables de la globine et le cas échéant de la SAB.

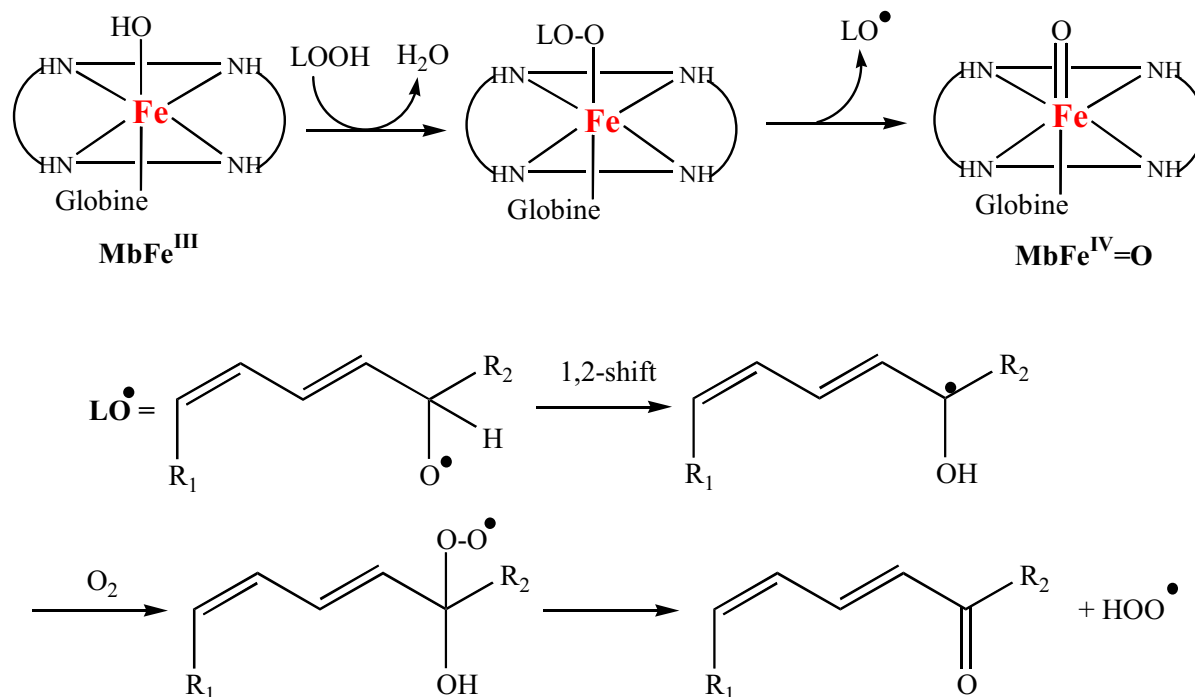


Figure-III-20. Schéma réactionnel du clivage des LOOH par MbFe^{III} conduisant aux radicaux HOO•.

Des processus similaires ont été mis en évidence avec une variété d'hydroperoxydes. Par exemple, les études par résonance paramagnétique électronique (RPE) suggèrent fortement que l'hydroperoxyde de *t*-butyle est clivé de manière homolytique par la metmyoglobine [53, 54]. En revanche, d'autres études à pH neutre concluent que le clivage des hydroperoxydes issus de l'acide linoléique serait majoritairement de type hétérolytique avec formation d'alcools et du radical-cation Mb[•]+Fe^{IV}=O, qui pourrait être un autre intermédiaire dans la dégradation de l'hème [51].

III.4 Conclusion

Les interactions entre protéines et produits d'oxydation des lipides ont fait l'objet de beaucoup de travaux ces dernières années et nous intéressent particulièrement dans le cadre du modèle-SAB. La spectrofluorimétrie frontale nous a permis de constater que la SAB de l'émulsion subit des modifications au cours de l'oxydation. L'oxydation des protéines conduit à l'apparition de groupements carbonylés et d'hydroperoxydes [55] mais aussi à des réactions de β -scission avec fragmentation du squelette protéique pour donner de nouveaux radicaux carbonés [56]. Dans des émulsions lipidiques, ces intermédiaires peuvent interagir avec les lipides et stimuler la formation d'hydroperoxydes et aldéhydes lipidiques [57].

La quercétine et la rutine possèdent une affinité respectivement modérée et faible pour la SAB via un site de liaison localisé dans le sous-domaine IIA. En drainant une partie de la quercétine à l'interface ou en stabilisant la fraction en phase aqueuse pour une mobilisation ultérieure à l'interface, l'association SAB-quercétine pourrait en partie expliquer l'efficacité supérieure de la quercétine à inhiber la peroxydation lipidique dans le modèle-SAB que dans le modèle-PL (Chapitre 2).

Enfin, l'activation de la metmyoglobine est modulée par la présence de SAB qui inhibe la formation du pigment vert résultant du couplage covalent entre l'hème et la globine. La SAB possède une affinité modérée pour MbFe^{III} qui permet la formation de complexes MbFe^{III}-SAB-quercétine. Au sein de ce complexe ternaire, la quercétine reste capable de réduire le centre fer-oxo de l'hème activé par les hydroperoxydes. Ce phénomène pourrait expliquer l'efficacité des polyphénols en général dans le modèle-SAB et leur action probable directe ou indirecte (via des transferts d'électrons à longue portée) dans la cavité de l'hème ou par réduction de radicaux protéiques susceptibles de participer à l'initiation de la peroxydation lipidique. Par ailleurs, la SAB ralentit la décomposition des hydroperoxydes d'acides gras induite par MbFe^{III}. Au cours de ces mécanismes, la formation de ferrylmyoglobine est marginale du fait de l'altération simultanée du noyau porphyrine.

IV. Conclusion générale des chapitres I - II – III

Proposition de mécanismes d'inhibition de la peroxydation lipidique par les composés phénoliques dans le modèle-SAB et dans le modèle-PL

D'après ce travail, plusieurs paramètres sont à considérer pour interpréter l'inhibition de la peroxydation lipidique dans les émulsions modèles parmi lesquels le pH et la nature de l'interface et de ses interactions avec la phase lipidique et avec les antioxydants principalement distribués en phase aqueuse.

Quels que soient le pH et la nature de l'interface, on ne peut concevoir l'initiation de la réaction que comme un phénomène interfacial impliquant l'hème (associé ou non à la partie globine, elle-même en interaction avec la SAB dans l'un des modèles) et des résidus d'acides gras peroxydés qui contaminent les triglycérides de l'huile. Ainsi, c'est la fraction d'hème (metmyoglobine à pH 5,8 ou hématine à pH 4) localisée à l'interface qui amorce la peroxydation. Les différences observées entre metmyoglobine et hématine à pH 5,8 suggèrent que la partie globine de la metmyoglobine reste associée au cofacteur à la surface de l'émulsion

Dans des micelles d'acide linoléique et de Tween 20, il a été montré que la quercétine inhibait la peroxydation induite par MbFe^{III} essentiellement dans la phase aqueuse en pénétrant rapidement dans la cavité de l'hème pour y réduire le centre fer-oxo [48]. De même, l'ion chlorogénate et l'ion ascorbate se lient à la ferrylmyoglobine et la réduisent en MbFe^{III} [49]. Plus généralement, les flavonoïdes et acides hydroxycinnamiques à noyau catéchol réduisent rapidement MbFe^{IV}=O en MbFe^{III} [46]. Ainsi, il est probable que, dans nos modèles, les composés phénoliques eux-mêmes agissent à la surface de l'émulsion en inhibant l'initiation.

Par ailleurs, les composés phénoliques interagissent de manière assez discriminée avec la SAB. A pH 5,8, l'affinité de la SAB pour la quercétine est relativement forte ($K = 56,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) tandis qu'elle est faible pour la rutine ($K = 1,67 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) et les acides chlorogénique ($K = 10 - 16 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 7,4 [13, 14]) et caféique ($K = 8- 30 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 7,4 [12]). La quercétine, associée à la SAB à 87-92 % (pour des concentrations de 100 à 10 μM), doit donc s'accumuler à l'interface de l'émulsion en proportion plus élevée que les autres polyphénols. Cela dit, le taux de SAB adsorbée à l'interface n'est que de 3-4%, ce qui limite le phénomène. Enfin, la conformation de SAB adsorbée peut être significativement modifiée et peut donc présenter une affinité pour les polyphénols différente de celle évaluée en solution par les mesures de constantes d'association. Quoi qu'il en soit, nous avons vérifié que la quercétine liée à la SAB dans le sous-domaine IIA reste capable de réduire la ferrylmyoglobine

(produite par réaction de la metmyoglobine avec H₂O₂) et que ce processus est probablement favorisé par l'association préalable des deux protéines. Ainsi, rien ne semble s'opposer à ce que les polyphénols dans leur ensemble agissent par réduction de formes hypervalentes de la metmyoglobine (présentant un noyau porphyrine dégradé si l'activation implique des hydroperoxydes lipidiques) à l'interface des émulsions. Ce processus est en compétition avec l'arrachement par ces mêmes formes hypervalentes d'un des 2 atomes H bis-allyliques de résidus d'acides gras polyinsaturés des molécules de triglycérides des émulsions.

Le rôle favorable joué par la fraction des composés phénoliques liée à la SAB pourrait expliquer la meilleure protection exercée par ces antioxydants dans le modèle-SAB plutôt que dans le modèle-PL.

Parmi les antioxydants sélectionnés dans ce travail, seul l' α -tocophérol peut éventuellement s'insérer dans la phase lipidique via sa longue chaîne phytyle apolaire pour y exercer son activité de briseur de chaîne en réduisant directement les radicaux LOO[•]. C'est peut-être le cas dans le modèle-PL. La capacité antioxydante modeste de l' α -tocophérol dans le modèle-SAB suggère qu'il est plutôt lié en un site de la SAB ne lui permettant pas d'agir efficacement.

A pH 4, MbFe^{III} est dénaturée et relargue son cofacteur hématine. La petite taille de l'hématine lui permet de pénétrer plus profondément dans l'interface et d'interagir plus efficacement avec les résidus d'acides gras peroxydés au sein des triglycérides de sorte que l'amorçage de l'oxydation est plus rapide. De même, la compétition entre polyphénols et triglycérides pour les formes hypervalentes de l'hématine semble moins favorable aux premiers que dans le cas de la metmyoglobine d'où une protection moins efficace (modèle-SAB) voire inexistante (modèle-PL). Le faible pouvoir antioxydant résiduel dans le modèle-SAB à pH 4 serait attribué à l'action des composés phénoliques en contact avec la phase lipidique grâce à leur association avec la SAB à l'interface. En revanche, dans le modèle-PL, les polyphénols, majoritairement sous forme neutre à pH 4, n'interagissent que faiblement avec l'interface chargée. Il apparaît logique qu'aucune inhibition ne soit observée. La diminution voire l'annulation du pouvoir antioxydant à pH 4 est en accord avec les résultats de la peroxydation induite à pH 5,8 par l'hématine et pour laquelle aucune inhibition par la quercétine n'a été observée. La Figure-III-21 représente la distribution des différents constituants des émulsions et schématise les mécanismes d'activité antioxydante des polyphénols.

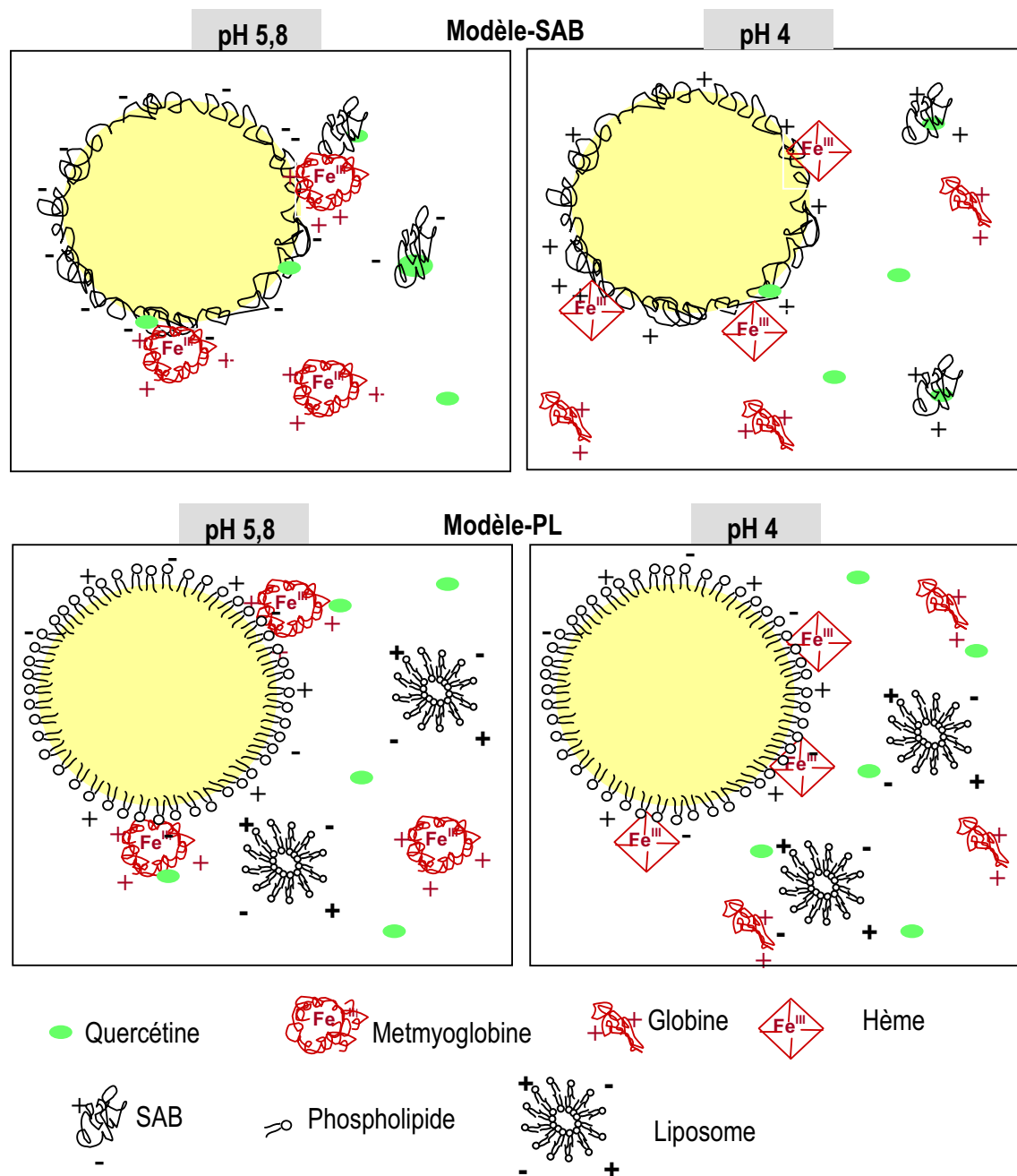


Figure-III-21. Représentation schématique des constituants des émulsions en fonction du pH et de la nature de l'émulsifiant.

Référence bibliographiques

1. Peters T. **All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications.**: Academic Press; 1995.
2. Meloun B, Moravek L, Kostka V. **Complete Amino-Acid Sequence of Human-Serum Albumin.** *Febs Letters* 1975,58:134-137.
3. He XM, Carter DC. **Atomic-Structure and Chemistry of Human Serum-Albumin.** *Nature* 1992,358:209-215.
4. Carter DC, Ho JX. **Structure of serum albumin.** *Adv. Protein Chem.* 45 (1994)153-203. 1994,45:153-203.
5. Saifer A, Goldman L. **The free fatty acids bound to human serum albumin.** *Journal of Lipid Research* 1961,2:268-270.
6. Petitpas I, Grüne T, Bhattacharya AA, Curry S. **Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids.** *Journal of Molecular Biology* 2001,314:955-960.
7. Bhattacharya AA, Grüne T, Curry S. **Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin.** *Journal of Molecular Biology* 2000,303:721-732.
8. Gryzunov YA, Arroyo A, Vigne JL, Zhao Q, Tyurin VA, Hubel CA, *et al.* **Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003,413:53-66.
9. Dufour C, Dangles O. **Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy.** *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 2005,1721:164-173.
10. Rawel HM, Frey SK, Meidtner K, Kroll J, Schweigert FJ. **Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence.** *Molecular Nutrition & Food Research* 2006,50:705-713.
11. Lu Q-h, Ba C-d, Chen D-y. **Investigating noncovalent interactions of rutin - serum albumin by capillary electrophoresis - frontal analysis.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008,47:888-891.
12. Adzet T, Camarasa J, Escubedo E, Merlos M. **In vitro study of caffeic acid - BSA interaction.** *Eur. J. Drug Metab. Pharm.* 1988,13:11-14.
13. Prigent SVE, Gruppen H, Visser A, van Koningsveld GA, de Jong GAH, Voragen AGJ. **Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003,51:5088-5095.
14. Rawel HA, Meidtner K, Kroll J. **Binding of selected phenolic compounds to proteins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:4228-4235.
15. Pastukhov AV, Levchenko LA, Sadkov AP. **Spectroscopic study on binding of rutin to human serum albumin.** *Journal of Molecular Structure* 2007,842:60-66.
16. Papadopoulou A, Green RJ, Frazier RA. **Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005,53:158-163.
17. Xiao JB, Suzuki M, Jiang XY, Chen XQ, Yamamoto K, Ren FL, Xu M. **Influence of B-ring hydroxylation on interactions of flavonols with bovine serum albumin.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008,56:2350-2356.

18. Kang J, Liu Y, Xie MX, Li S, Jiang M, Wang YD. **Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid.** *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 2004,1674:205-214.
19. Rampon V, Lethuaut L, Mouhous-Riou N, Genot C. **Interface characterization and aging of bovine serum albumin stabilized oil-in-water emulsions as revealed by front-surface fluorescence.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001,49:4046-4051.
20. Rampon V, Mouhous-Riou N, Brossard C, Genot C. **Application de la spectroscopie de fluorescence à l'étude d'émulsions.** 3ème congrès mondial de l'émulsion "Emulsions 2002". Lyon, France 2002.
21. Mikkelsen A, Skibsted LH. **Acid-catalysed reduction of ferrylmyoglobin: product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH.** *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1995,200:171-177.
22. Dufour C, Loonis M. **Regio- and stereoselective oxidation of linoleic acid bound to serum albumin: identification by ESI-mass spectrometry and NMR of the oxidation products.** *Chemistry and Physics of Lipids* 2005,138:60-68.
23. Rampon V, Riaublanc A, Anton M, Genot C, McClements DJ. **Evidence that homogenization of BSA-stabilized hexadecane-in-water emulsions induces structure modification of the nonadsorbed protein.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003,51:5900-5905.
24. Rampon V, Brossard C, Mouhous-Riou N, Bousseau B, Llamas G, Genot C. **The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin.: A front-surface fluorescence study.** *Advances in Colloid and Interface Science* 2004,108-109:87-94.
25. Genot C, Meynier A, Riaublanc A, Chobert JM. **Protein alteration due to lipid oxidation in multiphase systems.** In: *Lipid oxidation pathways.* Edited by Kalmal-Eldin A. Champaign, IL, USA: AOCS Press; 2003:265-292.
26. Liu W, Wang JY. **Modifications of protein by polyunsaturated fatty acid ester peroxidation products.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 2005,1752:93-98.
27. Refsgaard HHF, Tsai L, Stadtman ER. **Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000,97:611-616.
28. Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E. **Free-Radical Damage to Proteins - the Influence of the Relative Localization of Radical Generation, Antioxidants, and Target Proteins.** *Free Radical Biology and Medicine* 1991,11:161-168.
29. Shimasaki H, Ueta N, Privett OS. **Covalent binding of peroxidized linoleic acid to protein and amino acids as models for lipofuscin formation.** *Lipids* 1982,17:878-883.
30. Meynier A, Rampon V, Dalgalarondo M, Genot C. **Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution.** *International Dairy Journal* 2004,14:681-690.
31. Yamaki S, Kato T, Kikugawa K. **Characteristics of Fluorescence Formed by the Reaction of Proteins with Unsaturated Aldehydes, Possible Degradation Products of Lipid Radicals.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1992,40:2138-2142.
32. Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. **Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues.** *Analytical biochemistry* 1973,52:1-9.
33. Arts MJTJ, Haenen GRMM, Voss HP, Bast A. **Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein.** *Food and Chemical Toxicology* 2001,39:787-791.
34. Almajano MP, Gordon MH. **Synergistic effect of BSA on antioxidant activities in model food emulsions.** *Journal of the American Oil Chemists Society* 2004,81:275-280.
35. Almajano MP, Delgado ME, Gordon MH. **Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions.** *Food Chemistry* 2007,102:1375-1382.

36. Prigent SVE, Voragen AGJ, Visser A, van Koningsveld GA, Gruppen H. **Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid).** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2007,87:2502-2510.
37. Dufour C, Loonis M. **Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2007,1770:958-965.
38. Dufour C, Loonis M, Dangles O. **Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin.** *Free Radical Biology and Medicine* 2007,43:241-252.
39. Dangles D, Dufour C. **Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health.** In: *Recent Advances in Polyphenol Research*. Edited by Lattanzio V, Daayf F. London: Blackwell; 2008:67-87.
40. Dangles O, Dufour C, Bret S. **Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin.** *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 1999:737-744.
41. Ostdal H, Skibsted LH, Andersen HJ. **Formation of long-lived protein radicals in the reaction between H₂O₂-activated metmyoglobin and other proteins.** *Free Radical Biology and Medicine* 1997,23:754-761.
42. Reeder BJ, Svistunenko DA, Sharpe MA, Wilson MT. **Characteristics and mechanism of formation of peroxide-induced heme to protein cross-linking in myoglobin.** *Biochemistry* 2002,41:367-375.
43. Baron CP, Skibsted LH, Andersen HJ. **Prooxidative activity of myoglobin species in linoleic acid emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997,45:1704-1710.
44. Rao SI, Wilks A, Hamberg M, Demontellano PRO. **The lipoxygenase activity of myoglobin - Oxidation of linoleic-acid by the ferryl oxygen rather than protein radical.** *Journal of Biological Chemistry* 1994,269:7210-7216.
45. Kroger-Ohlsen MV, Ostdal H, Andersen ML. **The effect of pH on the oxidation of bovine serum albumin by hypervalent myoglobin species.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003,416:202-208.
46. Jorgensen LV, Skibsted LH. **Flavonoid deactivation of ferrylmyoglobin in relation to ease of oxidation as determined by cyclic voltammetry.** *Free Radical Research* 1998,28:335-351.
47. Hu M, Skibsted LH. **Kinetics of reduction of ferrylmyoglobin by (-)-epigallocatechin gallate and green tea extract.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002,50:2998-3003.
48. Vulcain E, Goupy P, Caris-Veyrat C, Dangles O. **Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: action in the aqueous vs. lipid phase.** *Free Radical Research* 2005,39:547-563.
49. Carlsen CU, Kroger-Ohlsen MV, Bellio R, Skibsted LH. **Protein binding in deactivation of ferrylmyoglobin by chlorogenate and ascorbate.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000,48:204-212.
50. Irwin JA, Ostdal H, Davies MJ. **Myoglobin-induced oxidative damage: Evidence for radical transfer from oxidized myoglobin to other proteins and antioxidants.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999,362:94-104.
51. Goupy P, Vulcain E, Caris-Veyrat C, Dangles O. **Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism.** *Free Radical Biology and Medicine* 2007,43:933-946.
52. Reeder BJ, Wilson MT. **The effects of pH on the mechanism of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxidie consumption by myoglobin: A role for the protonated ferryl species.** *Free Radical Biology and Medicine* 2001,30:1311-1318.

53. Van der Zee J. **Formation of peroxide- and globin-derived radicals from the reaction of methaemoglobin and metmyoglobin with t-butyl hydroperoxide: an ESR spin-trapping investigation.** *Biochemical Journal* 1997,322:633-639.
54. Van der Zee J, Barr DP, Mason RP. **ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide.** *Free Radic Biol Med* 1996,20:199-206.
55. Baron CP, Refsgaard HHF, Skibsted LH, Andersen ML. **Oxidation of bovine serum albumin initiated by the Fenton reaction - effect of EDTA, tert-butylhydroperoxide and tetrahydrofuran.** *Free Radical Research* 2006,40:409-417.
56. Headlam HA, Davies MJ. **Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products.** *Free Radical Biology and Medicine* 2004,36:1175-1184.
57. Ostdal H, Davies MJ, Andersen HJ. **Reaction between protein radicals and other biomolecules.** *Free Radical Biology and Medicine* 2002,33:201-209.
58. Laranjinha J, Almeida L, Madeira V. **Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic acid derivatives of cinnamic acid.** *Free Radical Biology and Medicine* 1995,19:329-337.

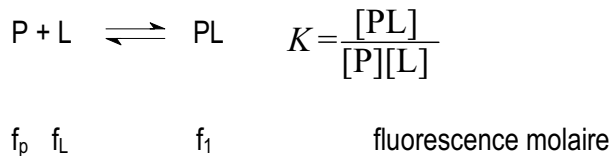
ANNEXES

ANNEXE 1 :

Modèle mathématique et programme Scientist associé, utilisé pour l'étude de la liaison à l'albumine du serum

Modèle mathématique :

On ne considère que la formation d'un complexe 1 :1. L'équilibre chimique à prendre en compte est la formation d'un complexe, caractérisé par une constante d'association K (P étant la protéine, L, le ligand et PL, le complexe protéine-ligand). Les fluorescence molaires sont notes f_p , f_L , f_1 respectivement.



Les intensités de fluorescence sont proportionnelles aux concentrations des solutés dans la mesure où l'absorbance du ligand reste inférieure à 0,2. La fluorescence totale est alors :

$$F = F_p + F_L + F_1$$

$$F = f_p[P] + f_L[L] + f_1[PL]$$

La loi de conservation de la matière permet d'écrire (les concentrations totales de protéine et de ligand étant note c et L_T, respectivement) :

$$\left. \begin{array}{l} c = [P] + [PL] \rightarrow c = [P] (1 + K[L]) \\ L_T = [L] + [PL] \rightarrow L_T = [L] (1 + K[P]) \end{array} \right\} \boxed{L_T = [L] \left(1 + \frac{Kc}{1 + K[L]} \right)}$$

$$\text{Et, } \boxed{F = \frac{f_p c}{1 + K[L]} + [L] \left(\frac{f_1 K c}{1 + K[L]} + f_L \right)}$$

Le produit $f_p c$ correspond à la fluorescence initiale de la protéine F_0 (en l'absence de ligand), très faible.

Programme scientist (n sites de fixation):

// MicroMath Scientist Model File

IndVars:V

DepVars: F,L,i,LT

Params:n,k,F1

$$LT=7.5E-3*V/(V+2000)$$

$$c=7.5E-5*2000/(2000+V)$$

$$L=LT-c*n*k*L/(1+k*L)$$

$$i=n*k*L/(1+k*L)$$

$$F=F1*(LT-L)+9.7$$

$$k>0$$

$$0<L<LT$$

$$0<i<n$$

$$k=1E5$$

$$n=1$$

$$F1=1E6$$

Programme scientist (Complexation 1 : 1) :

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: V

DepVars: F,LT,c,L

Params:k,F1

$$LT=7.5E-3*V/(V+2000)$$

$$c=7.5E-5*2000/(V+2000)$$

$$F=F1*c*k*L/(1+k*L)+9.7$$

$$L=LT-c*k*L/(1+k*L)$$

$$F1>0$$

$$k>0$$

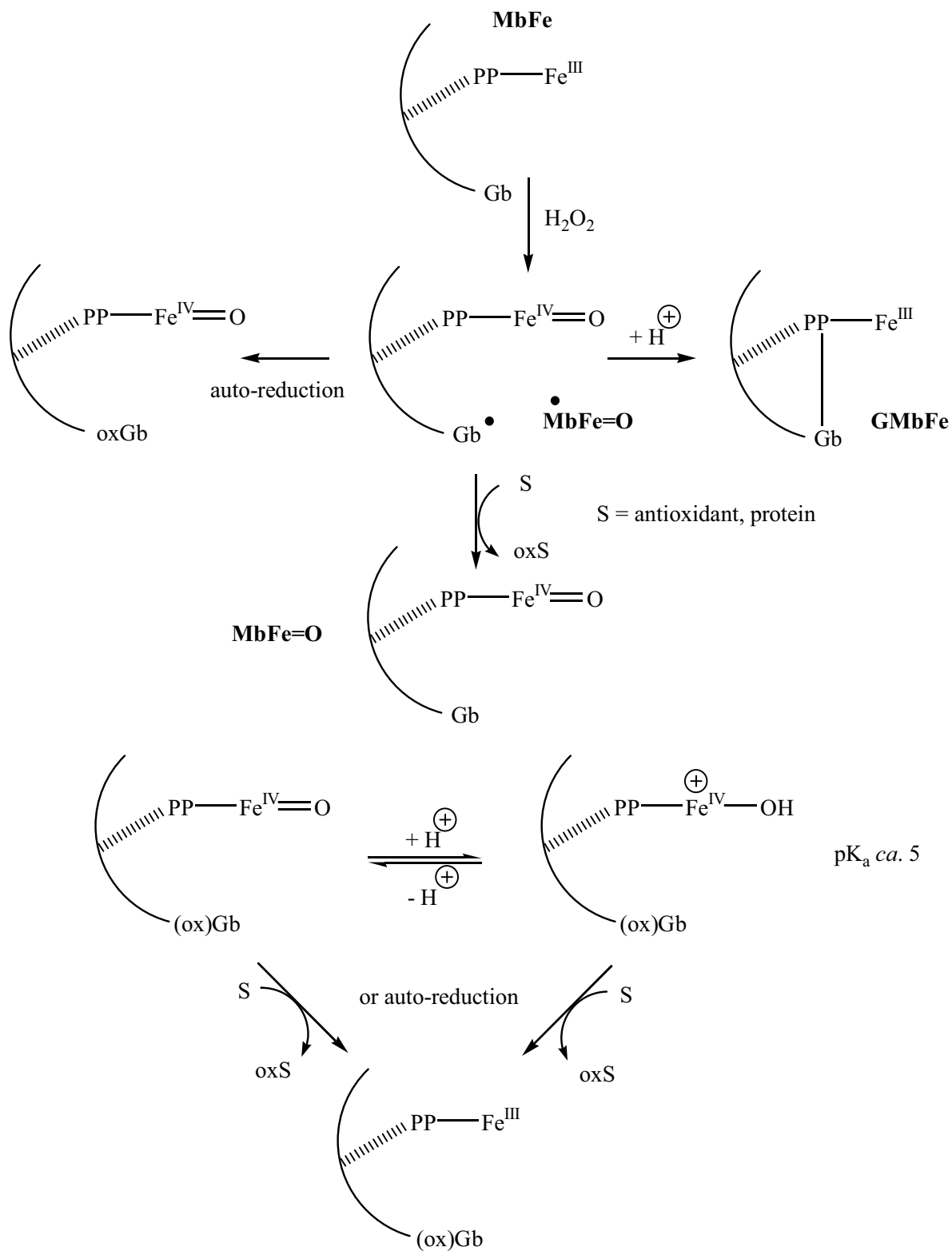
$$0<L<LT$$

$$k=1E5$$

$$F1=1E5$$

ANNEXE 2. : Schéma récapitulatif des réactions d'oxydation de la metmyoglobine par H₂O₂

(PP: noyau porphyrine, Gb: chaîne globine)



CHAPITRE 4.

*Applications des modèles gastriques à des
aliments réels*

*Inhibition de la peroxydation lipidique par
la quercétine en présence de suc gastrique*

« La recherche doit avant tout être un jeu et un plaisir. »

Pierre Joliot, La Recherche passionnément

<i>I. La lipase gastrique</i>	259
I.1 Caractéristiques générales de la lipase gastrique	259
I.2 Activité de la lipase gastrique	259
I.3 Rôle de la lipase gastrique dans la digestion des lipides	260
I.4 Facteurs modulant l'activité de la lipase gastrique	260
I.4.1 Le type d'acides gras	260
I.4.2 Les propriétés de l'interface	260
<i>II. Matériels et Méthodes</i>	261
II.1 Matériels	261
II.1.1 Produits chimiques	261
II.1.2 Equipements	261
II.2 Méthodes	262
II.2.1 Inhibition de la peroxydation lipidique par des purées et des extraits hydroacétoniques de fruits et légumes dans le modèle gastrique SAB à pH 5,8	262
II.2.2 Ajout de suc gastrique dans le modèle-SAB : inhibition de la peroxydation lipidique par la quercétine	265
<i>III. Résultats et discussion</i>	266
III. 1 Inhibition de la peroxydation lipidique par des fruits et légumes frais et appertisés dans le modèle-SAB à pH 5,8	266
III.1.1 La tomate	266
III.1.2 La pomme	267
III.1.3 La poire	268
III.1.4. Le haricot vert	269
III.1.5. Conclusions	270
III.2 Inhibition de la peroxydation lipidique par la quercétine en présence de suc gastrique dans le modèle-SAB	273
III.2.1 Pourcentage de lipolyse	273
III.2.2 Granulométrie du modèle-SAB en présence de lipase gastrique	274
III.2.2 Oxydation lipidique et inhibition par la quercétine	275
III.3 Conclusions	280
<i>Références bibliographiques</i>	281
<i>ANNEXES</i>	283

Une grande partie de mon travail de thèse a été consacrée à l'étude des propriétés antioxydantes de composés phénoliques représentatifs de nombreux fruits, légumes ou boissons. Ces composés ont démontré une capacité importante à inhiber l'oxydation des lipides initiée par la metmyoglobine dans des émulsions modélisant le contenu gastrique, et en particulier dans une émulsion stabilisée par la SAB à pH 5,8.

Ce dernier chapitre a pour but de présenter des applications ayant un impact dans les domaines de la nutrition et de la physiologie humaine. Pour ce faire, différentes collaborations ont été mises en place.

Tout d'abord une application sur aliments réels a été menée en collaboration avec le CTCPA (Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles) d'Avignon. Des fruits et légumes frais et leurs homologues appertisés ont été fournis par différents industriels. Le pouvoir antioxydant de leurs purées et de leurs extraits hydroacétonique a été évalué dans le modèle-SAB à pH 5,8 et comparé aux résultats obtenus pour ces mêmes échantillons dans un test ORAC.

Afin de rendre le modèle-SAB plus biomimétique, du suc gastrique humain contenant notamment de la lipase gastrique a été ajouté. L'impact de la lipolyse gastrique sur l'oxydation des lipides ainsi que sur le pouvoir antioxydant de la quercétine a été étudié. Cette partie a pu être réalisée grâce à une collaboration l'Unité Mixte de Recherche « Nutriments, lipides et prévention des maladies métaboliques » (INRA-INSERM) de Marseille et plus particulièrement grâce à Madame Martine Armand.

I. La lipase gastrique

La plupart des acides gras ingérés se trouvent sous forme de triglycérides et leur biodisponibilité dépend de l'hydrolyse des liaisons ester sur le squelette glycérol. Au cours de la digestion, l'hydrolyse est catalysée par plusieurs lipases digestives telles que la lipase gastrique et les lipases pancréatiques [1].

I.1 Caractéristiques générales de la lipase gastrique

La lipase gastrique est synthétisée par les cellules principales de l'estomac. Sa sécrétion est stimulée par la gastrine et son équivalent synthétique, la pentagastrine [2].

La lipase gastrique est une protéine globulaire d'environ 50 kDa, constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 379 acides aminés. Elle possède une importante partie polysaccharide, représentant 12 à 15 % de la masse totale de la protéine. Les résidus sérine 153, histidine 353 et aspartate 324 constituent son site actif catalytique, caractéristique des hydrolases à sérine [2, 3]. Le tetrapeptide N-terminal (Leu-Phe-Gly-Lys) joue un rôle clé dans sa liaison aux triglycérides à longues chaînes émulsionnés [1].

I.2 Activité de la lipase gastrique

La lipase gastrique est sécrétée sous forme directement active, à la concentration moyenne d'environ 80 à 100 µg par millilitre de suc gastrique dans des conditions physiologiques normales. Lors de la digestion d'un repas, la quantité totale de lipase gastrique sécrétée varie de 20 à 25 mg.

La lipase gastrique est dite « acide » car elle possède une bonne stabilité sur une gamme de pH comprise entre 2 et 8. Son activité est observée dans une large gamme de pH (3-6) mais elle est optimale à un pH compris entre 4,5 et 6.

Elle hydrolyse préférentiellement la liaison ester en position sn-3 des triglycérides. Son activité spécifique, mesurée sur tributyrine (substrat non physiologique) est d'environ 70 unités par mL (une unité représentant une µmole d'acide gras libérée par minute), mais celle-ci varie largement entre 6 et 239 U/mL [2].

I.3 Rôle de la lipase gastrique dans la digestion des lipides

Les contributions relatives des lipases gastriques et pancréatiques durant la digestion des triglycérides alimentaires ont été estimées à 5-40 % et 40-73 % respectivement. Ces données quantitatives ne sont pas le reflet de l'importance qualitative de la lipase gastrique dans le processus de digestion des lipides. Celle-ci permet en effet de générer des produits tensioactifs (acides gras, monoglycérides) qui favorisent le processus gastrique d'émulsification des lipides [4]. Elle joue donc un rôle dans la mise en place de l'interface lipide/eau, essentielle pour l'hydrolyse des triglycérides. En outre, en libérant des acides gras hydrophiles capables d'être absorbés par la muqueuse gastrique, elle constitue une source d'énergie rapide. Elle conditionne aussi l'activité suivante de la lipase pancréatique. En effet, les acides gras libérés sont capables d'activer la sécrétion d'enzymes pancréatiques ou de favoriser l'adsorption de la colipase et de la lipase à l'interface des globules, diminuant ainsi la période de latence qui précède l'activation du complexe lipase/colipase. Les diglycérides formés sont ainsi plus facilement et plus rapidement hydrolysés par la lipase pancréatique [2].

I.4 Facteurs modulant l'activité de la lipase gastrique

I.4.1 Le type d'acides gras

Il est considéré que l'action de la lipase gastrique est plus efficace sur les acides gras à courtes et moyennes chaînes que sur les acides gras à longues chaînes.

La lipase serait inhibée par les acides gras à longue chaîne qu'elle génère. Ces derniers se trouvant sous forme protonée à pH acide, ils forment des protubérances à la surface des globules qui piègent l'enzyme et l'empêchent d'agir [5]. Ce phénomène d'inhibition se produit dès une concentration d'acides gras libres de l'ordre de 120 à 170 $\mu\text{moles/m}^2$ d'interface lipidique.

I.4.2 Les propriétés de l'interface

Les taux d'hydrolyse des triglycérides sont très variables (5-40 %) et dépendent des propriétés physico-chimiques de l'interface telles que sa composition et son aire. Par exemple, les globules lipidiques de petite taille offrent une interface lipidique plus étendue que des globules de plus grande taille favorisant ainsi l'activité de la lipase gastrique [5, 6].

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Produits chimiques

b) Les fruits et légumes

Les pommes fraîches (Variété Gala majoritairement, 100% bicolores) et les compotes de pommes sans sucre correspondantes, proviennent de chez Héro.

Les tomates fraîches et les concentrés de tomates issus de la transformation de ces tomates ont été fournis par Conserve de France.

Les poires fraîches et leurs homologues en conserves proviennent de chez Saint-Mamet.

Les haricots verts frais (Variété Selecta) et leurs homologues en boîte proviennent de chez Bonduelle.

c) Le suc gastrique

Le suc gastrique humain nous a été fourni par Madame Martine Armand (INSERM, Marseille). Il provient du service d'hépatogastroentérologie du laboratoire d'exploration fonctionnelle (Dr J Peyrot) de l'hôpital Nord de Marseille. Il a été prélevé sous stimulation gastrique à la pentagastrine (peptavlon, 6µg / kg) à l'aide d'une sonde intragastrique.

D'un volume total de 94,5 mL, il provient d'un seul sujet. Son pH initial était de 1,12 et a ensuite été ajusté à 5,41 pour la conservation. Son activité lipasique a été évaluée à 70 U/mL sur tributyrine à pH 5,4. Son activité protéolytique (provenant de la pepsine) est de 533 ± 39 U Anson (dosage de Anson sur hémoglobine : une unité Anson correspond à la production de 0,1 µmoles de peptides contenant de la tyrosine, en 10 minutes à pH = 1,8 à partir d'une solution d'hémoglobine de 2 %). L'acidité libre de l'échantillon est estimée à 168 mEq/L par titration avec de la soude N/100. La concentration en protéines totales est de $0,998 \pm 0,002$ g/L (méthode BCA, acide bicinchonique).

Le suc gastrique est conservé à -20°C .

II.1.2 Equipements

La mesure des diènes conjugués est effectuée par spectrophotométrie comme cela est décrit au chapitre 2.

Les analyses de la dégradation de quercétine ont été effectuées en CLHP-UV à l'aide du chromatographe HP 1100 de Hewlett Packard comme cela est décrit au chapitre 2.

II.2 Méthodes

II.2.1 Inhibition de la peroxydation lipidique par des purées et des extraits hydroacétoniques de fruits et légumes dans le modèle gastrique SAB à pH 5,8

Les pouvoirs antioxydants des fruits et légumes frais et de leurs homologues appertisés sont évalués dans le modèle-SAB à partir de deux formes d'échantillons, d'une part une purée du produit brut et d'autre part un extrait hydroacétonique filtré qui permet de s'affranchir de l'effet de la matrice.

a) Préparation des échantillons

Préparation des purées

Les poires, les tomates et les pommes ne sont pas épluchées. L'échantillonnage est réalisé en récupérant les quartiers opposés. Les haricots verts, frais et en boîte, les tomates fraîches, les poires fraîches et au sirop et les pommes sont broyées dans un mixeur. La purée obtenue est affinée à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra-Turrax) et utilisée telle quelle pour l'analyse.

Le concentré de tomate et la compote de pomme sont utilisés sans broyage.

Préparation de l'extrait filtré

L'extraction est réalisée en pesant environ précisément 5 g de purée auxquels sont ajoutés 10 mL de solvant d'extraction : acétone 70 %/HCl 1,2 N. Après agitation au vortex pendant 15 minutes, l'extrait est filtré dans un entonnoir sur du coton de verre.

b) Tests de mesure de pouvoir antioxydant et analyses complémentaires

Le test ORAC est effectué en parallèle du test d'inhibition de l'oxydation lipidique dans le modèle-SAB à pH 5,8, et ce sur les mêmes échantillons

Test ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) effectué par le CTCPA

Ce modèle est constitué de fluorescéine et d'un générateur de radicaux peroxydes hydrosolubles, le AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride). Le principe du test est détaillé dans l'étude bibliographique.

La réaction est standardisée par rapport à des concentrations connues de trolox (équivalent hydrosoluble de la vitamine E). Les résultats sont donc exprimés en TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, ou en μmol trolox équivalent. Les modes opératoires du test ORAC et de l'étalonnage sont décrits dans l'annexe 1.

Les antioxydants, sous forme d'extrait ou de purée, sont préalablement dilués au 1/100^{ème} ou au 1/200^{ème} avant d'être injectés dans la cuve du fluorimètre afin de se situer dans l'ordre de grandeur de réponse de la gamme étalon (trolox).

Inhibition de la peroxydation lipidique

Le modèle-SAB est réalisé à pH 5,8 selon le protocole du chapitre 1. Le volume de la phase aqueuse est adapté en fonction du volume prévu de purée de fruits ou de légumes à ajouter afin de conserver un volume final d'émulsion de 10 mL.

Quatre grammes de purées de produits frais sont ajoutés à l'émulsion. Dans le cas des produits appertisés, la pesée est corrigée par le « facteur de concentration ». En effet suite aux procédés thermiques et à l'évaporation d'eau, les produits appertisés sont plus concentrés en matière sèche. Le « facteur de concentration » correspond au ratio des pourcentages des matières sèches du produit appertisé et du produit frais.

Huit mL d'extrait (correspondant à 4 g de produit de départ) sont concentrés par évaporation rotative jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,5 mL introduit dans l'émulsion.

La peroxydation lipidique est initiée par 20 μM de metmyoglobine (Chapitre 1). Toutes les heures un prélèvement de 0,2 mL est effectué, suivi d'une centrifugation, avant de mesurer par spectroscopie les diènes conjugués à 234 nm. La cinétique totale est de 6 heures. Les aires sous la courbe sont calculées selon la méthode du chapitre 2.

Les expériences (test ORAC et inhibition de l'oxydation lipidique dans le modèle gastrique) sont effectuées indépendamment en triplicata. Une analyse de variance (ANOVA) à un facteur est réalisée pour chacun des deux tests afin de déterminer l'effet des échantillons (extraits, purées, frais ou appertisés) sur la formation des diènes conjugués. Si un effet significatif est obtenu (intervalle de

confiance de 95%), l'ANOVA est suivie du test de Tukey-Kramer HSD afin de discriminer les différents échantillons. Les analyses ont été effectuées avec XLStat, version 2008.3.02 (Addinsoft SARL).

Analyses complémentaires (effectuées par le CTCPA)

La détermination de la matière sèche et les analyses de vitamine C et de polyphénols totaux (dosage de Folin) dans les extraits hydroacétoniques ont été effectuées au CTCPA. Leurs protocoles sont présentés en Annexes 2-4. Les valeurs obtenues sont corrigées par le facteur de concentration (ratio des pourcentages des matières sèches du produit appertisé et du produit frais).

II.2.2 Ajout de suc gastrique dans le modèle-SAB : inhibition de la peroxydation lipidique par la quercétine

L'activité de la lipase gastrique a été évaluée à 70 U/mL de suc gastrique. Il est estimé que 0,5 à 2,5 unités de lipase gastrique sont nécessaires par mg de triglycérides soit une moyenne de 1,5 U/mg (données Martine Armand). Ainsi pour une émulsion de 10 mL contenant 1 g d'huile de tournesol, 21 mL de suc gastrique sont nécessaires. Ce volume va considérablement diluer l'émulsion; de ce fait le protocole de réalisation des émulsions de cette série d'expériences a été modifié.

Dans un ballon en verre de 50 mL, 1 g d'huile de tournesol (purifiée des tocophérols) est pesé. Un volume de 7,9 mL de SAB préalablement dissous dans le tampon ([SAB] = 250 μ M) est ajouté et l'émulsion est réalisée en deux étapes comme décrit dans le chapitre 1.

La lipase gastrique (21 mL) est ensuite ajoutée dans le ballon. Le pH est ajusté à 5,8 par ajout de NaOH. Le mélange est alors placé à l'étuve à 37 °C sous agitation magnétique pour une durée de une heure (temps d'incubation de la lipase gastrique).

Le volume total est divisé en 4 fois 7,4 mL dans des petits flacons identiques, contenant un barreau aimanté. Le volume résiduel de 0,4 mL est conservé à -80°C pour une analyse du pourcentage de lipolyse avant l'ajout de metmyoglobine (dosage des acides gras libres effectuée par Martine Armand ; le principe est détaillé en Annexe 5). Les deux premiers flacons constituent les témoins (2 répétitions) et 0,5 mL d'une solution de metmyoglobine à 190 μ M ([MbFe^{III}] finale = 12 μ M) sont ajoutés à t_0 pour initier l'oxydation. Dans les deux autres flacons, le même processus est effectué après addition de 20 μ L d'une solution concentrée de quercétine à 11,8 mM dans l'acétonitrile/DMSO (4 :1) ([Quercétine] finale = 30 μ M).

Toutes les heures, un prélèvement de 0,2 mL d'émulsion est dilué dans 3,8 mL d'isopropanol, centrifugé et analysé en spectroscopie ($A_{234\text{ nm}}$) comme cela est décrit dans le chapitre 2. En parallèle, des prélèvements de 0,2 mL sont dilués dans 0,4 mL d'isopropanol pour analyser le déclin de la quercétine en CLHP (Chapitre 2). De plus à t_0 , t_{3h} et t_{6h} , la granulométrie des milieux est analysée (matériels et méthodes décrits dans le chapitre 1). La même série d'expériences est effectuée à pH 4.

Pour pouvoir conclure sur l'impact de la lipase gastrique, l'ensemble de ces expériences a été scrupuleusement reproduit en remplaçant le volume de lipase gastrique par le même volume de tampon aqueux.

III. Résultats et discussion

III. 1 Inhibition de la peroxydation lipidique par des fruits et légumes frais et appertisés dans le modèle-SAB à pH 5,8

Les différents essais de cette partie ont porté sur la capacité antioxydante de purées et d'extraits hydroacétoniques de fruits et légumes frais et appertisé. Ainsi ces analyses nous permettront :

i) de visualiser pour chaque produit l'effet de la matrice alimentaire (comparaison purée vs. extrait hydroacétonique du produit)

ii) de visualiser pour chaque produit l'effet de l'impact de l'appertisation (produit frais vs. produit appertisé)

iii) de comparer un test homologué sur produits alimentaires avec celui que nous avons mis en place (test ORAC vs. modèle émulsionné). Il est à noter que pour le modèle émulsionné, les résultats sont exprimés en aire sous la courbe et le meilleur résultat correspond à la plus faible valeur. Pour le test ORAC, les résultats sont exprimés en équivalent-trolox et le meilleur résultat correspond à la valeur la plus forte.

III.1.1 La tomate

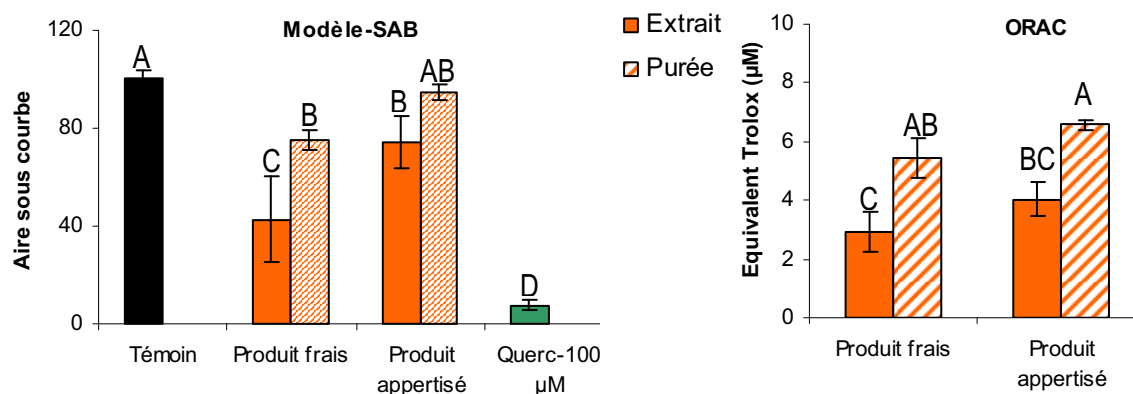


Figure-IV-1. Partie de gauche : Capacités antioxydantes d'échantillons de tomate (4 g) et de concentré (4g/6) dans le modèle-SAB à pH 5,8. Partie de droite : test ORAC. Les lettres indiquent des groupes de produits significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer), $p < 0,0001$ pour le modèle-SAB et $p = 0,0001$ pour le test ORAC.

Dans le modèle-SAB, l'extrait hydroacétonique du produit frais présente la meilleure capacité à inhiber l'oxydation des lipides (Figure-IV-1) tandis que le concentré de tomate (produit appertisé) n'a aucun effet.

La matière sèche de la tomate est évaluée à 5% alors que celle du concentré est de 30%. Le facteur de concentration est donc de 6. Dans le test ORAC ainsi que pour les dosages de vitamine C et de polyphénols totaux, les valeurs obtenues pour le concentré de tomate ont donc été divisées par 6 pour pouvoir les comparer à celles de la tomate fraîche. Le concentré de tomate possède le meilleur pouvoir antioxydant dans le test ORAC. L'impact de l'appertisation serait négatif pour ce produit dans le milieu émulsionné alors qu'il est sans effet dans le test ORAC.

Les résultats des dosages effectués dans la tomate fraîche et dans le concentré sont rapportés dans le Tableau-IV-1. Lors de l'appertisation, la quantité de vitamine C diminue de moitié alors que les polyphénols apparaissent plus résistants à la température puisque leur concentration dans le produit appertisé n'est pas modifiée. Cette baisse de la teneur en vitamine C peut être à l'origine de l'effet antioxydant supérieur du produit frais dans le modèle émulsionné.

Tableau-IV-1. Dosage de la vitamine C et des polyphénols totaux dans les échantillons de tomate. Statistiques : les lettres indiquent des groupes de produits significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer), MF : matière fraîche.

	Vit C (mg/100g MF)	Statistiques	Polyphénols (mg/100 g MF)	Statistiques
Produit frais	9,3 (\pm 1,4)	A	20,8 (\pm 3,4)	A
Produit appertisé	31,6 (\pm 5,5)		130,3 (\pm 13,3)	
Produit appertisé/6	5,3 (\pm 1,8)	B	21,7 (\pm 2,2)	A
		p = 0,027	p = 0,768	p = 0,768

III.1.2 La pomme

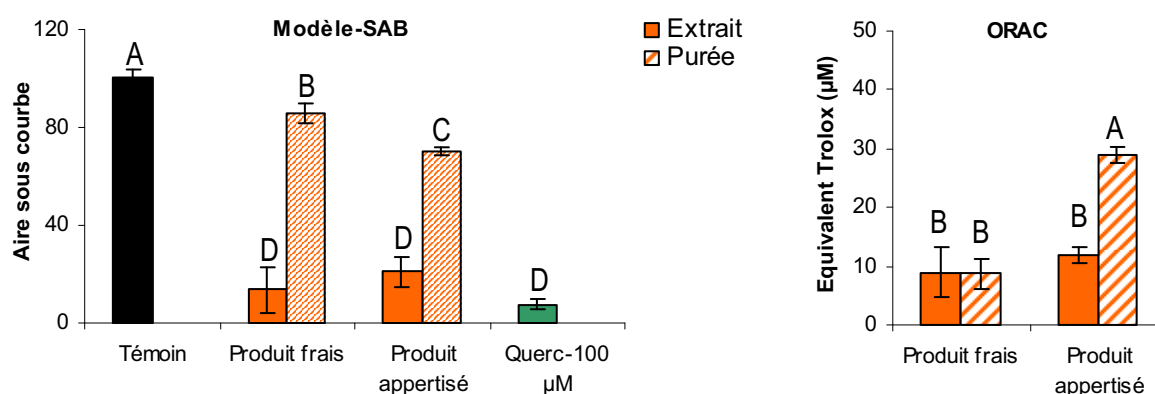


Figure-IV-2. Partie de gauche : Capacités antioxydantes d'échantillons de pommes (4 g) ou de compote (4g/1,5) dans le modèle-SAB à pH 5,8. Partie de droite : test ORAC. Les lettres indiquent des groupes de produits significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer), p<0,0001 pour le modèle-SAB et p < 0,0001 pour le test ORAC.

En ce qui concerne la pomme (matière sèche de 15%), les résultats obtenus avec le modèle-SAB sont comparables à ceux de la tomate (Figure-IV-2). Les échantillons donnant la meilleure réponse sont les extraits hydroacétoniques de pomme fraîche et de compote. Ils auraient un pouvoir antioxydant équivalent à celui de la quercétine à la concentration de 100 μ M. La compote (produit appertisé de matière sèche 22%) aurait un effet antioxydant plus prononcé que celui de la purée de pommes fraîches, ce qui peut être expliqué par l'ajout de vitamine C lors de sa préparation industrielle.

Dans le test ORAC, les résultats du produit appertisé sont corrigés par le facteur de concentration estimé à 1,5 (= 22 %/15 %). La compote de pommes présente le meilleur pouvoir antioxydant. Dans les 2 tests, si l'on s'intéresse au produit purée, un impact de l'appertisation est observé entraînant une augmentation du pouvoir antioxydant. La vitamine C ajoutée lors du procédé industriel a été mise en évidence lors du dosage (Tableau-IV-2). Elle semble donc jouer un rôle dans la capacité antioxydante des purées. Le dosage des polyphénols révèle une nouvelle fois que les polyphénols sont résistants aux procédés utilisés.

Tableau-IV-2. Dosage de la vitamine C et des polyphénols totaux dans les échantillons de pomme. Statistiques : les lettres indiquent des groupes de produits significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer). Pour la vitamine C, les statistiques n'ont pas pu être calculées (nombre de répétitions insuffisant), MF : matière fraîche.

	Vit C (mg/100g MF)	Polyphénols (mg/100 g MF)	Statistiques
Produit frais	0,74	54 (\pm 17)	A
Produit appertisé	16 (\pm 3)	88 (\pm 15)	
Produit appertisé/1,5	10,7 (\pm 2)	58,7 (\pm 10)	A
			p = 0,5

III.1.3 La poire

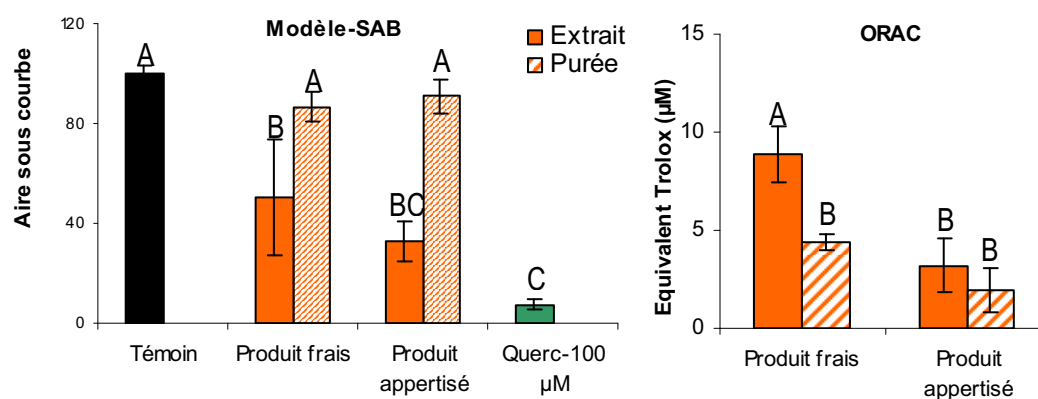


Figure-IV-3. Partie de gauche : Capacités antioxydantes d'échantillons de poires (4 g) ou de poires en boîte (4 g) dans le modèle-SAB à pH 5,8. Partie de droite : test ORAC. Les lettres indiquent des groupes de produits significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer), p<0,0001 pour le modèle-SAB et p = 0,0005 pour le test ORAC.

Dans le cas de la poire, il est estimé que les matières sèches des produits frais et appertisés sont équivalentes.

Dans le modèle-SAB, l'extrait de poire en boîte possède le meilleur potentiel d'inhibition. Les purées de poires fraîches ou appertisées s'avèrent inefficaces en comparaison de leurs extraits hydroacétoniques (Figure-IV-3).

Dans le test ORAC, l'extrait de poire fraîche répond le mieux tandis que les purées de poires fraîches ou de poires en boîte ont un pouvoir antioxydant équivalent et faible. Dans ces essais, on constate que l'impact de l'appertisation n'a aucun effet quelque soit le test utilisé.

La teneur en vitamine C est faible dans le produit frais. Le manque de répétitions ne permet pas de conclure sur son évolution. Contrairement à la pomme et à la tomate, les polyphénols diminuent quasiment pour moitié au cours de l'appertisation. Cet effet résulte probablement de la migration des composés phénoliques dans le sirop (composé d'eau et de sucre) lors de l'appertisation (Tableau-IV-3).

Tableau-IV-3. Dosage de la vitamine C et des polyphénols totaux dans les échantillons de poire. Statistiques : les lettres indiquent des groupes de produits significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer). Pour la vitamine C, les statistiques n'ont pas pu être calculées (nombre de répétitions insuffisant), MF : matière fraîche.

	Vit C (mg/100g MF)	Polyphénols (mg/100 g MF)	Statistiques
Produit frais	1,22	43,1 (± 5,8)	A
Produit appertisé	0,71	25,4 (± 7,5)	B
			p = 0,048

III.1.4. Le haricot vert

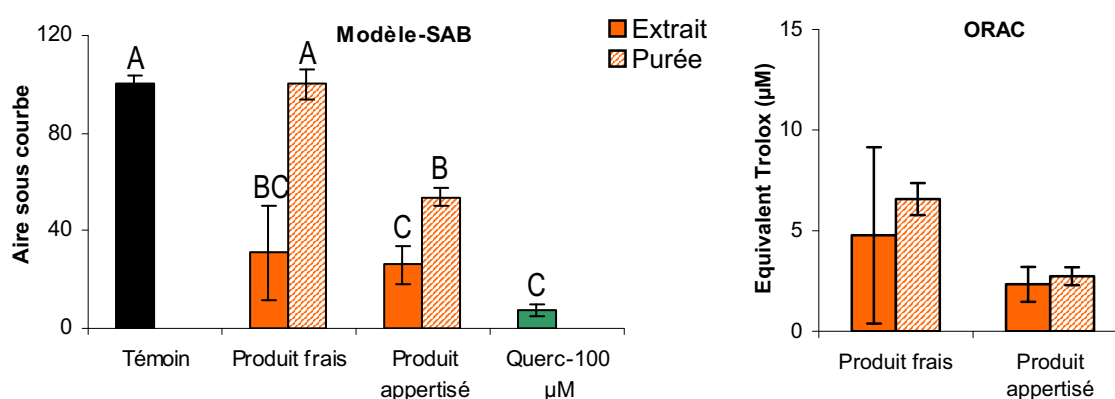


Figure-IV-4. Partie de gauche : Capacités antioxydantes d'échantillons de haricots verts frais (4 g) ou de haricots verts en boîte (4g) dans le modèle-SAB à pH 5,8. Partie de droite : test ORAC. Les lettres indiquent des groupes de produits significativement différents (test post-hoc de Tukey-Kramer), p<0,0001 pour le modèle-SAB et p = 0,3 pour le test ORAC.

Dans le modèle-SAB, on constate que la capacité antioxydante de la purée de haricot vert en boîte est meilleure que celle du haricot vert frais; l'impact de l'appertisation serait donc positif. Lors de la préparation des échantillons, la structure du haricot vert en boîte était plus facilement broyable que le haricot vert frais ce qui pourrait entraîner une libération plus importante de composés antioxydants dans le milieu, entraînant ainsi une inhibition de la peroxydation lipidique. Comme pour les extraits de tomate, de pomme et de poire, les extraits de haricot vert sont plus antioxydants que les purées correspondantes. En revanche, les deux types d'extraits n'ont pas montré de différences significatives.

Pour le test ORAC, aucun effet significatif n'est observé ($p = 0,3$) et il n'est pas possible de discriminer les échantillons les uns des autres.

Tableau-IV-4. Dosage de la vitamine C et des polyphénols totaux dans les échantillons de haricots vert, MF : matière fraîche.

	Vit C (mg/100g MF)	Polyphénols (mg/100 g MF)
Produit frais	2,9	50,5
Produit appertisé	1,7	25,4 ($\pm 1,7$)

Dans ce produit, le phénomène d'appertisation est délétère pour les polyphénols (Tableau-IV-4). Comme pour les poires au sirop, un mécanisme de diffusion dans l'eau de la boîte est à suspecter.

III.1.5. Conclusions

D'après l'ensemble des résultats nous pouvons conclure que les résultats obtenus par les deux tests ne sont pas comparables.

En effet, dans le test ORAC nous mesurons le caractère antiradicalaire intrinsèque de molécules (antioxydants libres et matrices) dans un milieu aqueux, c'est-à-dire leur capacité à piéger le radical peroxyde issu de la dégradation du AAPH. Dans ce milieu homogène, cette capacité dépend uniquement de la structure des micro- et macroconstituant mis en jeu.

D'autre part, dans le modèle-SAB émulsionné, la mesure du caractère antioxydant des différents micro- et macroconstituants prend en compte divers paramètres : la localisation de ces composés entre les différentes phases (gouttelettes lipidiques, phase aqueuse ou interface), les différentes modes d'action par lesquels vont s'exprimer le caractère antioxydant dans ce modèle (piégeage de radicaux libres, chélation de métaux, inhibition de l'initiateur metmyoglobine, etc...) et

l'acidité du milieu. La durée de l'expérimentation (cinétique de peroxydation de 6 heures) différencie aussi ce nouveau test du test ORAC qui se veut plus ponctuel. Le schéma est donc plus complexe et ne tient plus uniquement compte de la structure des micro- et macroconstituants mais également de leur environnement et de leur mode d'action.

De façon globale, ces deux tests n'ont pas permis de mettre en évidence une différence entre les produits appertisés et les produits frais (Tableau-IV-5).

Tableau-IV-5. Tableau synthétique de l'impact de l'appertisation sur le pouvoir antioxydant des échantillons. (O) : aucun effet. (-) : effet négatif (diminution du pouvoir antioxydant). (+) : effet positif (augmentation du pouvoir antioxydant).

Impact de l'appertisation	Modèle-SAB		Test ORAC	
	Extrait	Purée	Extrait	Purée
Tomate	-	0	0	0
Pomme	0	+	0	+
Poire	0	0	-	0
Haricot vert	0	+	0	0

Quand un effet positif est observé, il peut être expliqué. Par exemple, dans le cas du couple pomme/compote de pomme, l'ajout de vitamine C en forte concentration lors du procédé industriel serait une explication. Dans le cas du haricot vert c'est la finesse de la purée qui serait en compte. Concernant les effets négatifs de l'appertisation, l'extrait de tomate semble perdre de sa capacité antioxydante après process. De nouveau, une perte importante de vitamine C peut être responsable de cet effet. En effet d'autres travaux dans l'équipe (Thèse Céline Chanforan) ont montré que la vitamine C disparaissait rapidement au cours de la transformation de la tomate alors que les caroténoïdes s'isomèrisent et que les polyphénols sont plutôt stables.

Dans le modèle-SAB, les extraits hydroacétoniques des produits frais et appertisés contenant les antioxydants hydrophiles se sont montrés de bien meilleurs inhibiteurs de la peroxydation lipidique que leurs homologues introduits sous forme de purées. Ce résultat n'est pas étonnant. Les composés extraits, libérés de leur matrice, seraient plus aptes à interagir avec la metmyoglobine ou les radicaux peroxydes présents en phase aqueuse. Dans le cas des purées de fruits, les polyphénols sont en interaction avec les composantes de la matrice (protéines, sucres) et ne sont pas forcément libres. Dans le cas où ils le seraient, il faut aussi attendre que ceux ci diffusent de la matrice à l'émulsion avant de pouvoir discerner leur effet inhibiteur.

Dans le test ORAC, les résultats divergent et aucune conclusion ne ressort nettement

Le modèle-SAB émulsionné a donc permis de mettre en évidence l'impact de la matrice alimentaire sur le pouvoir antioxydant des composés phénoliques. Il souligne ainsi les possibilités d'amélioration de notre modèle « simple » par l'ajout d'enzymes digestives permettant de dégrader la matrice.

La suite de cette partie présente une série d'essais incluant au modèle-SAB du suc gastrique humain contenant notamment de la lipase gastrique.

III.2 Inhibition de la peroxydation lipidique par la quercétine en présence de suc gastrique dans le modèle-SAB

III.2.1 Pourcentage de lipolyse

a) A pH 5,8

L'activité lipolytique de la lipase gastrique atteint très rapidement son maximum, 30 à 40 minutes après l'incubation (pH = 5,4) [5]. Pour cette raison, le pourcentage de lipolyse est calculé une heure après incubation avec le suc gastrique en divisant le nombre d'acides gras libérés (μ mole) par le nombre total d'acides gras libérables (μ mole) de l'échantillon. La définition du pourcentage de lipolyse considère que dans le tractus digestif (lipolyse gastrique et intestinale) un triglycéride est hydrolysé en 2 AG libres et un monoglycéride même si chimiquement l'hydrolyse permet d'aller jusqu'à la molécule de glycérol.

Ainsi à partir d'un prélèvement d'émulsion contenant initialement 40,7 mM de triglycérides (TG), 16,9 mM d'acides gras ont été libérés une heure après l'incubation du suc gastrique à pH 5,8. Le pourcentage de lipolyse est donc évalué à 20,8 % ($= 16,9/(40,7 \times 2) \times 100$). Cette analyse permet de mettre en évidence l'importance de la lipolyse dans l'émulsion puisque les acides gras libres représentent alors 13,8 % des chaînes initialement liées au glycérol ($= 16,9/(40,7 \times 3) \times 100$) (Tableau-IV-6).

Tableau-IV-6. Dosages des acides gras (AG) libres après incubation de suc gastrique (contenant de la lipase gastrique) pendant une heure et pourcentages de lipolyse à pH 4 et pH 5,8.

	TG _{initiaux} (mM)	AG libérés (mM)	% lipolyse	% AG libres/(AG totaux x 3)
pH 5,8	40,7	16,9	20,8 %	13,8 %
pH 4	39,8	9,1	11,4 %	7,6 %

b) A pH 4

A pH 4, la lipolyse est diminuée : elle est évaluée à 11,4 % une heure après l'incubation avec le suc gastrique (Tableau-IV-6). Ces résultats concordent avec les données de la littérature qui indiquent que la lipolyse gastrique entraîne une hydrolyse de 10 à 30 % des TG [6], conduisant principalement à la formation de diglycérides et d'acides gras libres [1]. Le pH optimal de la lipase gastrique est connu pour être situé dans une gamme allant de 4,5 à 6 ce qui pourrait expliquer la légère baisse de l'activité lipolytique lors de la diminution du pH de 5,8 à 4 [2].

III.2.2 Granulométrie du modèle-SAB en présence de lipase gastrique

La lipase gastrique du suc gastrique libère donc une quantité non négligeable d'acides gras libres, molécules connues entre autre pour leurs propriétés tensioactives. Nous avons donc cherché à vérifier si les acides gras libres modifiaient la granulométrie des émulsions.

La taille des gouttelettes d'huile des émulsions a été observée par microscopie optique au grossissement x1000 et à l'aide du granulomètre laser (Figure-IV-5).

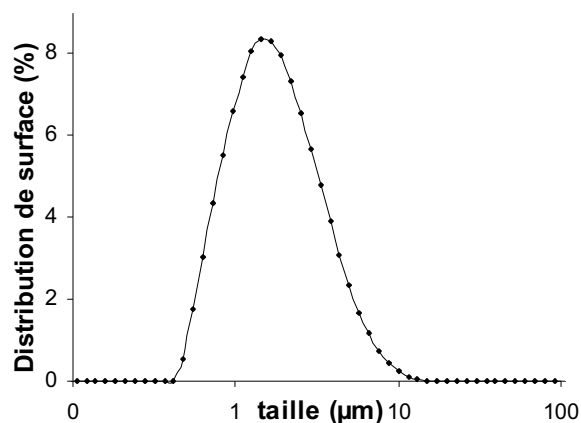
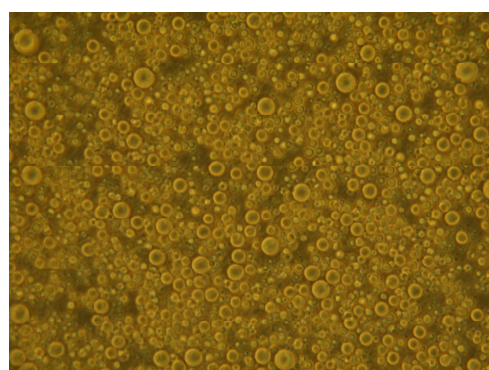


Figure-IV-5. Partie de gauche : Observations microscopiques du modèle-SAB en présence de suc gastrique (grossissement x 1000). Partie de droite : Analyse granulométrique : Distribution de surface de l'émulsion stabilisée par la SAB en présence de sucs gastriques à pH 5,8.

D'après les observations microscopiques, les gouttelettes d'huile sont très homogènes. Elles ont un diamètre compris entre 2 et 5 µm. Quelques particules de taille plus importante (10-20 µm) sont également observées mais celles-ci sont peu abondantes. L'étude par granulométrie laser confirme ces résultats. Elle met en évidence un léger impact de la lipolyse sur la distribution de tailles des particules du modèle-SAB. Cette dernière semble affiner la distribution qui tend alors vers une distribution monodale de $d_{[3,2]} = 2,32 \pm 0,03 \mu\text{m}$ (vs. $d_{[3,2]} = 2,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ avant lipolyse). Au cours du temps, l'émulsion reste très stable.

Les résultats à pH 4 sont comparables à ceux obtenus à pH 5,8.

III.2.2 Oxydation lipidique et inhibition par la quercétine

a) A pH 5,8

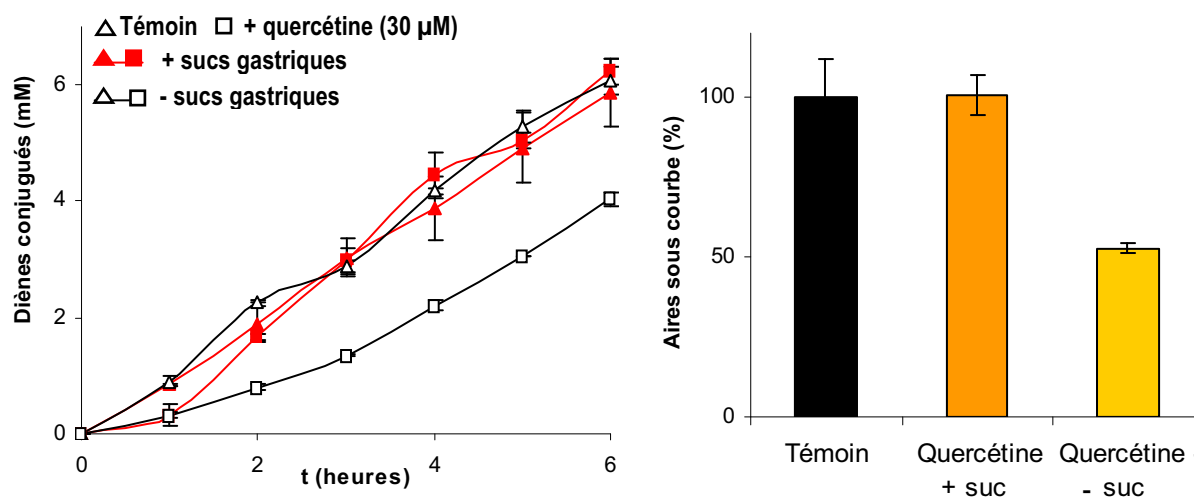


Figure-IV-6. Partie de gauche : Apparition des diènes conjugués dans le modèle-SAB contenant ou non des suc gastriques en présence ou absence de 30 μM de quercétine. Partie de droite : Influence de la lipase gastrique sur le pouvoir antioxydant de la quercétine. $[\text{MbFe}^{\text{III}}] = 12 \mu\text{M}$. pH = 5,8. T = 37°C.

L'oxydation par la MbFe^{III} du modèle-SAB a été réalisée en duplicata en présence ou en absence de suc gastrique, pour un témoin (oxydation non inhibée) et avec ajout de quercétine. D'après la Figure-IV-6, il est clair qu'en absence d'antioxydants, le suc gastrique n'a pas d'influence sur l'oxydation lipidique. Cette observation est en bonne adéquation avec le peu de différences observées entre les distributions granulométriques du modèle en présence ou en absence de suc (III.2.2). Les deux témoins sont donc considérés équivalents.

En revanche, en présence de quercétine, les phénomènes observés sont différents. En présence de suc gastrique, il semblerait que la quercétine ne freine l'oxydation des lipides que durant une heure. En absence de suc gastrique, l'inhibition est très efficace, permettant une baisse de l'oxydation d'environ 50% sur la durée totale de l'expérience (Figure-IV-6- Partie de droite).

La concentration des protéines totales du suc gastrique a été évaluée à $\approx 1 \text{ g/L}$. Dans des conditions physiologiques normales, la lipase est sécrétée à des concentrations variant de 80 à 100 mg/L de suc (Carriere *et al.*, 1993, dans [2]). Ainsi elle représente à peine un dixième des protéines totales que constituent la pepsine, les mucines, la leptine et les protéines de desquamation cellulaire.

La quercétine est capable de lier de nombreuses protéines. Dans ce modèle, elle pourrait être « piégée » via la formation de complexes avec les différentes protéines l'empêchant d'exercer son pouvoir réducteur.

De plus, la lipase contenue dans le suc gastrique a libéré 13,8 % des acides gras initialement liés au glycérol à pH 5,8. Le Tableau-IV-7 représente le bilan des espèces présentes dans le modèle après incubation du suc gastrique pendant une heure et ajout de metmyoglobine. Les acides gras libres possèdent une forte affinité pour la SAB ($K_{\text{assoc}} = 1-69.10^7 \text{ M}^{-1}$ [7]) à travers 7 sites distincts dont un dans le sous domaine-IIA.

Tableau-IV-7. Bilan des espèces présentes dans le modèle SAB après lipolyse

MbFeIII	SAB	Quercétine	TG initiaux	AG libres
12 μM	62 μM	32 μM	38,1 mM	15,8 mM

Des travaux récents de l'équipe ont montré que l'acide linoléique n'avait pas d'influence sur la complexation de la quercétine à la SAH tant que le ratio AG/SAH était inférieur à 4 [8]. Au delà, la fluorescence caractéristique du complexe quercétine-SAH chute drastiquement reflétant soit un déplacement de la quercétine par l'acide linoléique soit un changement conformationnel majeur de la protéine. Dans notre cas, le ratio AG libres/SAB est extrêmement important, perturbant ainsi de façon quasi certaine le complexe quercétine-SAB et la conformation de la SAB présente majoritairement dans la phase aqueuse. L'association de la quercétine à la SAB est un pré-requis à son activité antioxydante. En présence de suc gastrique, la perturbation liée à la complexation quercétine-protéines du suc et à la perte de la complexation quercétine-SAB justifierait en partie la perte de son pouvoir antioxydant.

Enfin, les protéases contenues dans les sucs gastriques pourraient entraîner une dégradation de la SAB, rendant impossible l'association avec la quercétine. Toutefois le pH optimal de la pepsine étant dans la gamme 2-3, cette hypothèse peut être écartée.

La dégradation de la quercétine a été suivie par CLHP toutes les heures. Elle est extrêmement rapide dans les deux systèmes puisqu'après une heure d'oxydation, seules quelques traces de quercétine sont encore détectables (Figure-IV-7-partie de gauche). Dans le cas du modèle ne contenant pas de suc gastrique, l'apparition des deux principaux composés d'oxydation de la quercétine (composé de type benzofuranone et dimère) est très rapide (Figure-IV-7-partie de droite).

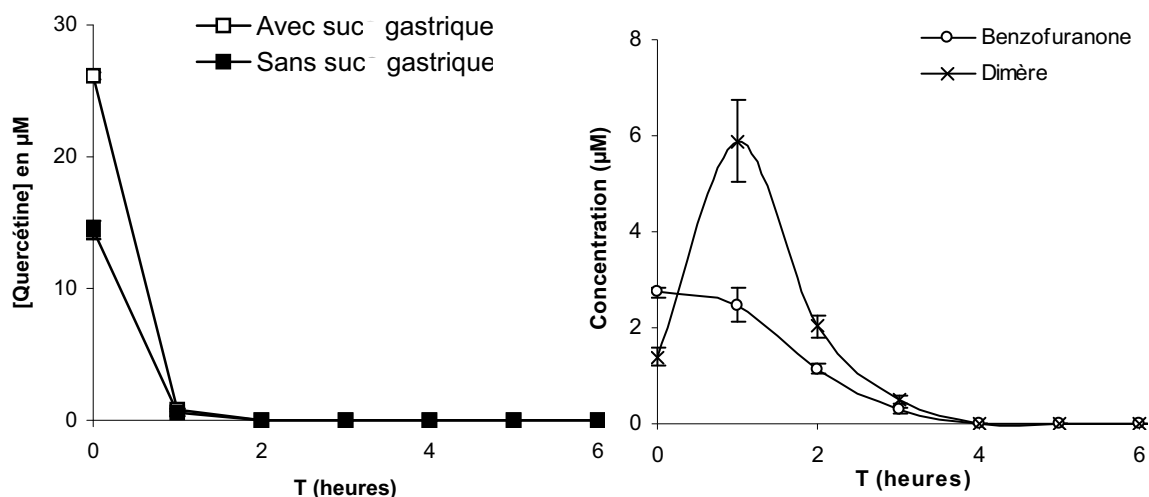


Figure-IV-7. Partie de gauche : Déclin de la quercétine dans le modèle-SAB contenant ou non du suc gastrique, $[Quercétine]_i = 30 \mu M$. Partie de droite : Apparition de deux des composés d'oxydation de la quercétine dans le modèle-SAB sans suc gastrique à $pH = 5,8$. $[MbFe^{III}] = 12 \mu M$. $T = 37^{\circ}C$.

Dans le système contenant du suc gastrique, leur suivi n'a pas été possible. En revanche, les chromatogrammes ont permis de mettre en évidence une série de pics, élués à de fortes concentrations d'acétonitrile et présentant une forte absorbance à 234 et 280 nm (Figure-IV-8). La majorité de ces pics ne sont pas détectés dans le système sans suc gastrique ce qui permet de supposer qu'ils correspondent à des AG libres oxydés.

Dans la Figure-IV-7, il est notable que le rendement d'extraction de la quercétine est plus important dans l'extrait provenant du modèle contenant du suc gastrique. Cette remarque conforte l'hypothèse d'une plus faible association de la quercétine avec la SAB dans ce modèle, association qui entraîne son élimination lors de la centrifugation. En effet, nous avons déjà observé, dans le chapitre 2, que le taux d'extraction de la quercétine liée à la SAB était plus faible que celui de la quercétine libre.

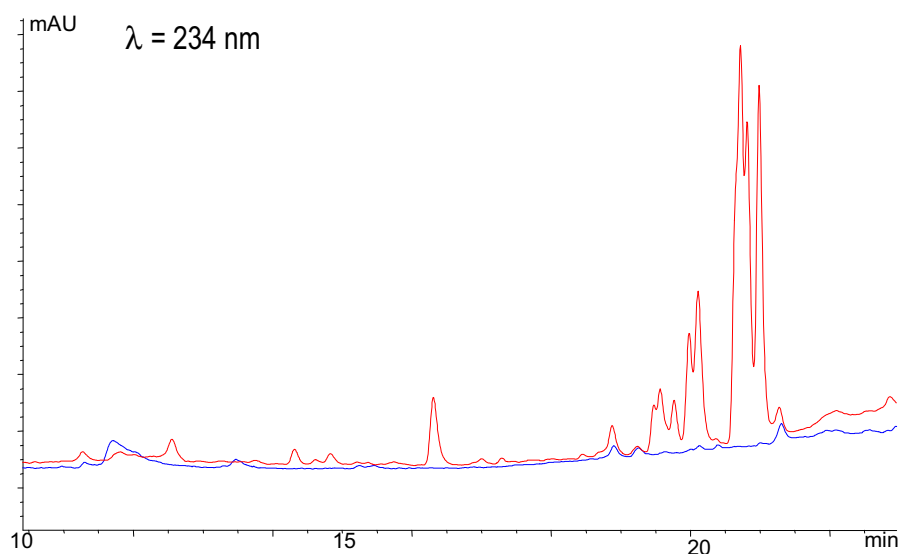


Figure-IV-8. Chromatogramme CLHP des extraits d'émulsion en présence (tracé rouge) ou en absence (tracé bleu) de suc gastrique après 4 heures d'oxydation lipidique initiée par la MbFe^{III} ($12 \mu\text{m}$) et inhibée par la quercétine ($32 \mu\text{M}$) ($\text{pH} = 5,8$ et $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$).

b) A pH 4

La même série d'expériences a été effectuée à pH 4. Comme à pH 5,8, la peroxydation non inhibée est semblable pour les deux systèmes (avec ou sans suc gastrique) (Figure-IV-9). De façon similaire aux résultats du chapitre 2, l'allure de la cinétique est modifiée par la diminution de pH; elle démarre rapidement dans un premier temps, pour atteindre un plateau à partir de 5 heures d'oxydation (Figure-IV-9). Que ce soit avec ou sans suc gastrique, la quercétine perd son pouvoir antioxydant à ce pH. Il aurait fallu travailler avec une concentration supérieure de quercétine pour confirmer le léger effet antioxydant suggéré à $30 \mu\text{M}$.

La quercétine est éliminée des émulsions en une heure et la formation des composés d'oxydation dans le système sans suc digestif n'est pas détectable.

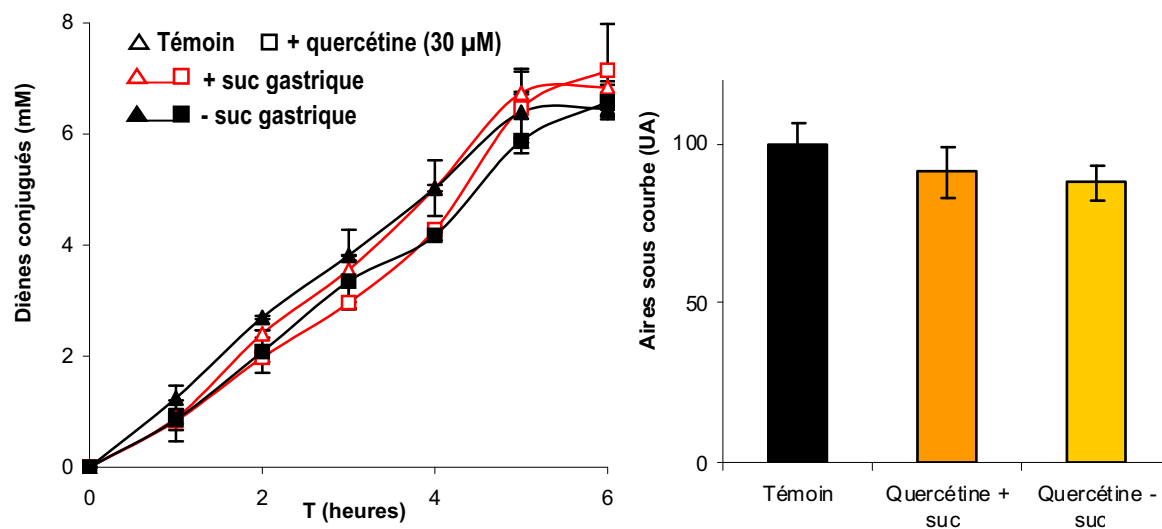


Figure-IV-9. Partie de gauche : Apparition des diènes conjugués dans le modèle-SAB, contenant ou non du suc gastrique, en présence ou absence de 30 µM de quercétine. Partie de droite : Influence de la lipase gastrique sur le pouvoir antioxydant de la quercétine à pH 4. [MbFe^{III}] = 12 µM. T = 37°C.

III.3 Conclusions

Dans ce chapitre, l'introduction de purées de fruits et légumes dans le modèle-SAB a été entreprise. Les extraits hydroacétoniques issus de tomates, de pommes, de poires ou de haricots verts se sont montrés des inhibiteurs efficaces de la peroxydation lipidique alors que les purées ont montré des effets moindres. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence l'impact de la matrice alimentaire sur la libération des composés antioxydants issus d'un aliment. Il est évident que l'ajout d'enzymes digestives impliquant des activités amylases et protéases ne peut qu'améliorer l'extraction des antioxydants de la matrice. Les résultats de cette étude en seraient très probablement améliorés.

La collaboration avec Madame Martine Armand de l'Unité Mixte de Recherche « Nutriments, lipides et prévention des maladies métaboliques » (INRA-INSERM) de Marseille nous a permis d'obtenir du suc gastrique humain contenant notamment de la lipase gastrique. Son introduction dans le modèle-SAB a entraîné une hydrolyse des acides gras de ca. 14 % à pH 5,8 et de ca. 8 % à pH 4. Dans ces conditions l'inhibition de la peroxydation lipidique par la quercétine a été fortement diminuée, voire annulée. Cependant du fait de la dilution et de l'ajout de protéines exogènes engendrés par l'ajout du suc gastrique, la concentration testée de quercétine est faible (30 μM). Nous aurions du tester une plus forte concentration. En effet, l'absence d'effets inhibiteurs en présence de sucs gastriques pourrait être attribué à son association avec les protéines apportées par le suc.

Références bibliographiques

1. Armand M. **Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand?** *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2007,10:156-164.
2. Fave G, Peyrot J, Hamosh M, Armand M. **Dietary fat digestion: interest of human gastric lipase.** *Cahiers de Nutrition et de Dietetique* 2007,42:183-190.
3. Aloulou A, Rodriguez JA, Fernandez S, van Oosterhout D, Puccinelli D, Carriere F. **Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2006,1761:995-1013.
4. Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, et al. **Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach.** *American Journal of Physiology* 1994,266:G372-G381.
5. Pafumi Y, Lairon D, de la Porte PL, Juhel C, Storch J, Hamosh M, Armand M. **Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase.** *Journal of Biological Chemistry* 2002,277:28070-28079.
6. Armand M, Pasquier B, Andre M, Borel P, Senft M, Peyrot J, et al. **Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract.** *American Journal of Clinical Nutrition* 1999,70:1096-1106.
7. Peters T. **All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications.**: Academic Press; 1995.
8. Dufour C, Loonis M. **Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2007,1770:958-965.
9. Naguib YMA. **A Fluorometric Method for Measurement of Oxygen Radical-Scavenging Activity of Water-Soluble Antioxidants.** *Analytical Biochemistry* 2000,284:93-98.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Mode opératoire du test ORAC et de son étalonnage

Principales étapes

1. Préparation de l'échantillon (purée ou extrait)
2. Dilution au 1/100 ou 1/200 avec une solution tampon pH 7,4
3. Cinétique de décroissance de la fluorescence émise par une solution contenant la fluorescéine, le AAPH et l'échantillon (30 minutes environ)
4. Etalonnage avec une gamme de Trolox

Préparation des solutions

Solution tampon phosphate de sodium : 19 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (sodium dihydrogen phosphate dihydrate) à 0,2 M et à pH 7,4 et 81 mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (disodium hydrogen phosphate dodecahydrate)

Solution de fluorescéine (3',6'-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanthen]-3-one) à 69 nM dans le tampon phosphate à pH 7,4

Solution d'AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride) à 0,5 M dans le tampon phosphate à pH 7,4

Solution de Trolox à 100 μM , 50 μM , 25 μM et 12,5 μM dans le tampon phosphate à pH 7,4

Mesure des cinétiques de décroissance de fluorescence

L'analyse est réalisée dans le fluorimètre Xenius (Safas) thermostaté à 37 °C.

Dans une cuve en quartz, sont introduits 1825 μL de fluorescéine, puis 100 μL de solution à analyser (qui peut être soit la solution tampon pour réaliser le blanc, les solutions de trolox pour réaliser l'étalonnage, ou les échantillons). Après avoir placé la cuve dans le fluorimètre sous agitation et démarré l'acquisition, 150 μL de solution d'AAPH sont ajoutés. La longueur d'onde d'excitation utilisée est 493 nm pour une émission enregistrée à 514 nm (cycle : 1 s).

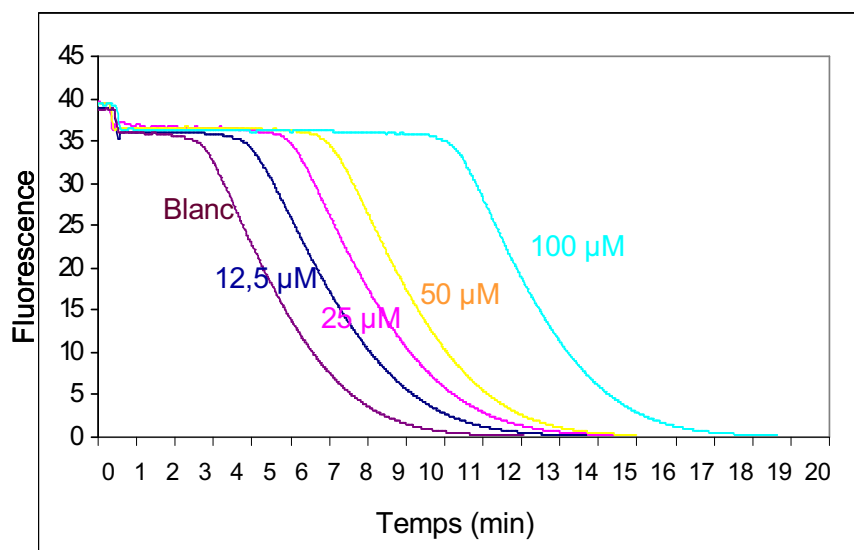
Exploitation des résultats

Le principe consiste à mesurer l'aire sous la courbe selon la formule :

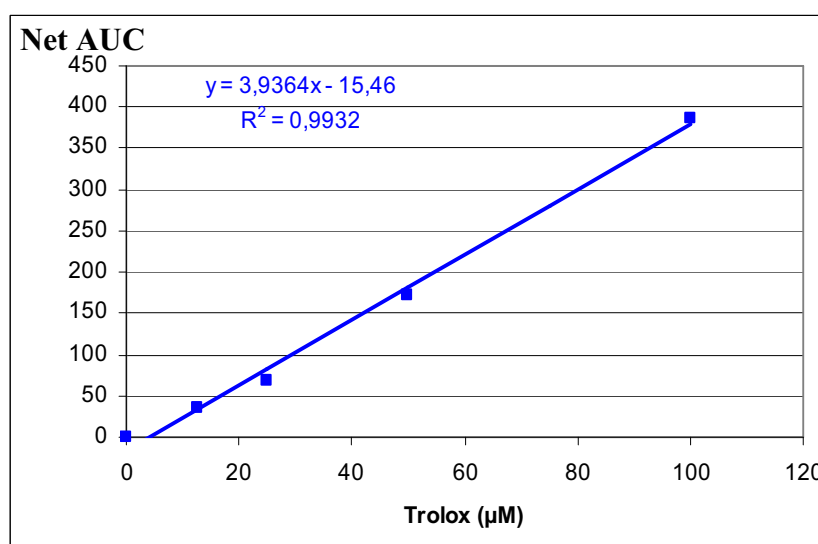
AUC (area under curve) = $1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_n/f_0$ où f_0 est la valeur de fluorescence initiale et f_i sont les valeurs de fluorescence à chaque seconde de la cinétique [9].

Net AUC = AUC (échantillon ou trolox) – AUC (blanc)

La courbe d'étalonnage Net AUC en fonction de la concentration en trolox sert d'étalonnage pour quantifier les échantillons. Le résultat final est exprimé en μmolTE (Trolox Equivalent)/g.



Cinétiques de décroissance observées pour les étalons trolox à 0µM (blanc), 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM.



Droite d'étalonnage obtenue après traitement des cinétiques de décroissance.

L'étalonnage avec le trolox est réalisé en parallèle de chaque journée.

ANNEXE 2 : Dosage de l'acide ascorbique (AA) et déhydroascorbique (DHA) (CTCPA)

Principe :

Oxydation de AA en DHA par l'ascorbate oxydase. Réaction de dérivation du DHA par l'o-phénylène diamine (OPDA) et formation d'un composé fluorescent : 3-(1,2-déhydroxyethyl) furo[3,4-b]-quinoxaline (DFQ). Séparation et dosage du DFQ par chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Réactifs et produits :

- **Ascorbate oxydase sur spatule N° 736 619**

- **Acide ascorbique Merck N° 127.0100. Solution étalon à 0,4 g/l :**

Dissoudre **20 mg** d'acide ascorbique dans 50 mL d'eau. A préparer extemporanément.

- **Acide trichloracétique 0,3 M :**

Dissoudre **49.017 g** d'acide trichloracétique dans de l'eau, compléter à 1000 mL.

- **Acétate de sodium 4,5 M, pH=6,2 :**

Dissoudre **61.236 g** dans 80 mL d'eau, ajuster le pH à 6,2 avec de l'acide acétique concentré, compléter à 100 mL avec de l'eau.

- **Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) 18 bis, 0,8 M :**

Dissoudre **10,8872 g** de KH₂PO₄ dans l'eau, compléter à 1000 mL.

- **Hydrogénophosphate de potassium (K₂HPO₄) 0,1 M :**

Dissoudre **17,418 g** de K₂HPO₄ dans l'eau, compléter à 1000 mL.

- **Phase mobile :**

Ajouter 500 mL de solution de KH₂PO₄ à 250 mL de solution de K₂HPO₄. La phase mobile est constituée du mélange précédemment préparé et de méthanol dans la proportion 80+20 respectivement (soit 190 mL).

- **o-phénylènediamine (OPDA) 0,1 % (m/v) :**

Dissoudre 20 mg d'OPDA dans 20 mL d'eau. A préparer extemporanément.

Appareillage

Matériel courant de laboratoire et notamment :

- Chromatographe liquide à haute performance, équipé d'un détecteur fluorimètre permettant les mesures dans les conditions suivantes :

- longueur d'onde d'excitation fixée à 350 nm
- longueur d'onde d'émission maximale fixée à 430 nm,

- Colonne de chromatographie pour HPLC Waters, de 250 mm de long et de 4,6 mm de diamètre intérieur remplie de silice greffée octadécyle de 5 µm.

Mode opératoire

1. Préparation de la gamme et des échantillons

- Gamme étalon :

Dilution de la solution mère :

Dans des fioles de 25 mL : prélever 1 mL; 3 mL, 6 mL et 12 mL, compléter avec de l'**eau distillée**.

- Echantillon

Dans une fiole de 50 mL peser environ 2 g de produit (voir selon le produit analysé)

Compléter avec l'**acide trichloroacétique**. Agitation 30 min puis filtration sur papier filtre.

2. Oxydation de AA en DHA :

Dans des petits flacons bruns mettre :

	Etalons	Echantillons
Acide trichloroacétique	4 mL	/
Acétate de sodium	1,2 mL	0,4 mL
Solution (étalon ou échantillon)	1 mL	3 mL

Ajouter une spatule d'enzyme, incuber 8 min à 37 °C

3. Dérivatisation :

Enlever l'enzyme

Ajouter ensuite 0,5 mL d'OPDA.

Incuber 30 min à 37 °C

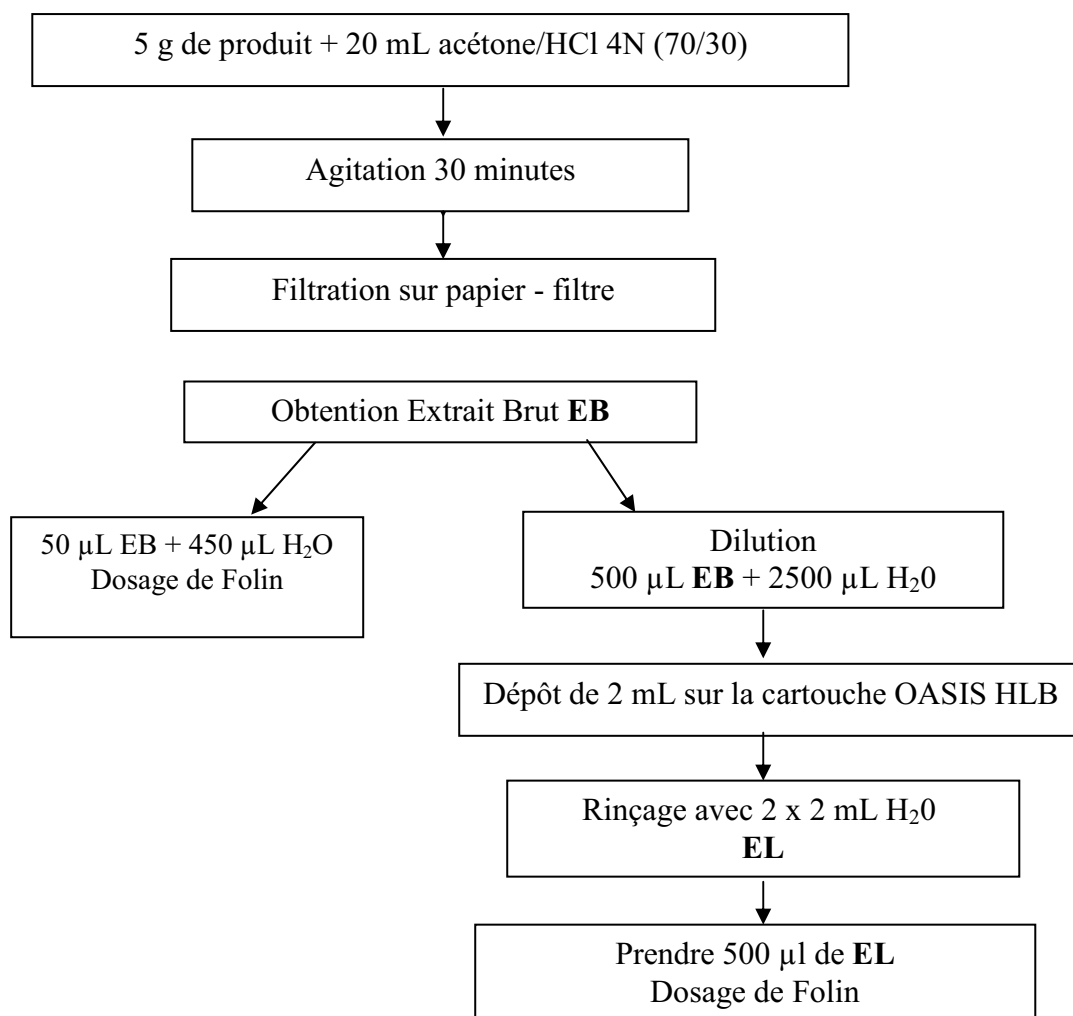
L'échantillon est stable 12 h à 4°C.

4. Chromatographie :

Utiliser la méthode VITAC (CTCPA) :

- volume d'injection : 20 µL
- débit de la phase mobile : 1 mL/min

ANNEXE 3 : Dosage des polyphénols totaux (CTCPA)



Dosage de Folin

- 500 µL d'échantillon (ou 50 µL + 450 µL)
- 2,5 mL de réactif de FOLIN **dilué au 1/10**.
- Vortexer.
- Incuber 2 min à température ambiante.
- Ajouter 2 mL de carbonate de sodium à **75 g/L**.
- Vortexer.
- Incuber à 50°C pendant 15 minutes exactement.
- Refroidir immédiatement les tubes dans un bac d'eau froide.
- Lire la densité optique contre de l'eau à 760 nm.

Reconditionnement des colonnes OASIS HLB

Cette cartouche sera, après chaque analyse, reconditionnée de la façon suivante :

- passage de 4 x 3 mL de méthanol pur
- rinçage avec 2 x 2 mL d'eau distillée

ANNEXE 4 : Détermination de la masse sèche d'un produit (CTCPA)

D'après le Journal Officiel de la République Française, 1977

1. Principe de la méthode

Détermination de la perte de masse de l'échantillon par dessiccation à l'étuve à 70°C, sous pression réduite.

2. Réactifs

Sable de Fontainebleau lavé aux acides et calciné, papier filtre découpé en bandes d'environ 20 mm de large, anhydride phosphorique

3. Appareillage

Capsule plate en métal, étuve électrique à pression réduite, réglée à 70 °C ± 1°C, bain d'eau à 100°C, pompe à vide

4. Mode opératoire

Prélèvement : Tarer la capsule avec un petit agitateur en verre à extrémité aplatie et 10 grammes environ de sable. Peser 2 à 5 grammes d'échantillon au milligramme près. Triturer la prise d'essai avec le sable en s'aidant de l'agitateur. Disposer la capsule sur le bain d'eau en triturant de temps à autre le mélange de l'échantillon et du sable, jusqu'à dessiccation apparente et obtention d'un produit grossièrement pulvérulent.

Dessiccation : placer la capsule dans l'étuve munie de nacelles contenant l'anhydride phosphorique. Etablir le vide à l'aide de la pompe pour obtenir une pression inférieure à 50 mm de mercure. L'air admis dans l'étuve doit être préalablement déshydraté dans un dispositif

Pesée : Dès l'ouverture de l'étuve porter la capsule au dessiccateur jusqu'à refroidissement complet. Peser. Renouveler le passage de la capsule à l'étuve dans les mêmes conditions de température et de pression jusqu'à ce que deux pesées faites à une heure d'intervalle ne donnent pas de différence significative.

5. Expression des résultats

Soit p, la masse de la prise d'essai, Δp la variation de masse à la dessiccation.

La perte de masse, H, exprimée en pour cent du produit est égale à $\Delta p/p \times 100$

Le résidu sec R est égal à : 100 – H.

ANNEXE 5 : Détermination du pourcentage de lipolyse

Dosage des acides gras libres

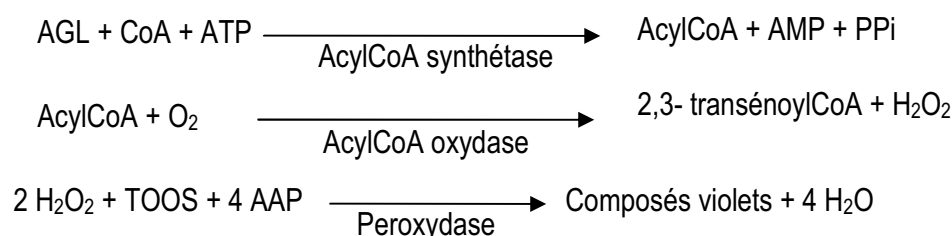
Extraction des lipides :

Les lipides sont extraits par la méthode de Folch modifiée par Hernell; brièvement, 20 volumes de chloroforme/méthanol (2 : 1 vol/vol) sont rajoutés à un volume d'échantillon. Le tout est vortexé, puis 20% d'une solution de NaCl 150mM, acide acétique 2% pH 3 sont rajoutés et le mélange est vortexé à nouveau. La phase sousnagante contenant le chloroforme et les lipides est récupérée après centrifugation à 2000 rpm pendant 15 minutes à 20°C, et mise à évaporer sous azote.

Dosage des acides gras libres :

Le culot lipidique obtenu est resuspendu dans de l'isopropanol et les acides gras libres sont quantifiés par une méthode colorimétrique en utilisant le kit enzymatique NEFA (FA 115, Randox Laboratories, UK). La lecture de la densité optique s'effectue à 550nm, 37°C après une incubation de 10 minutes exactement.

Principe du dosage:



Avec, AGL : acide gras libre, TOOS : N-éthyl-N-(2hydroxy-3-sulphopropyl) m-toluidine, 4-AAP : 4 aminoantypirine

Références bibliographiques :

Folch J, Lees M, Stanley JHG. A **simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues**. J Biol Chem 1957, 226:498-509.

Hernell O, Stagers JE, Carey MC. **Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings**. Biochemistry 1990, 29:2041-2056

CHAPITRE 5.

ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE 4-METHYLCOUMARINES

« Le progrès naît de la diversité des cultures et de l'affirmation des personnalités. »

Pierre Joliot, La Recherche Passionnément

Introduction	291
I. Etat des connaissances	292
I.1 Présentation générale des coumarines	292
I.1.2 Biodisponibilité des coumarines	292
I.1.3 Activités biologiques et pharmaceutiques des coumarines	293
I.2 Les 4-méthylcoumarines	294
I.2.1 Activités biologiques des 4-méthylcoumarines	294
I.2.2 Relation structure-activité	294
Conclusion	296
II. Matériels et Méthodes	297
II.1 Matériels	297
II.1.1 Produits chimiques	297
II.1.2 Equipements	298
II.2 Méthodes	298
II.2.1 Test de décoloration de la crocine	298
II.2.2 Test de résistance des LDL à l'oxydation	300
III. Résultats et discussion	302
III. 1 Test de décoloration de la crocine	302
III.1.1 Pouvoir antioxydant du Trolox et des composés phénoliques	302
III.1.2 Pouvoir antioxydant des 4-méthylcoumarines	304
III.2 Test d'oxydation des LDL	305
III.2.1 Protection contre l'oxydation des LDL par les 5 composés phénoliques	305
III.2.2 Protection de l'oxydation des LDL par les 4-méthylcoumarines	307
III.3 Conclusion	310
Références bibliographiques	311
ANNEXES	313

Introduction

Ce chapitre relate des travaux effectués dans un institut de recherche italien, l'INRAN (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione) à Rome, lors d'un stage d'octobre à décembre 2007. Bien qu'il soit consacré à l'étude du pouvoir antioxydant de coumarines, composés phénoliques d'origine alimentaire, il n'est pas en relation directe avec la problématique de l'étude. Toutefois, il m'a permis de découvrir un nouveau laboratoire, de m'intéresser aux coumarines et de pratiquer de nouveaux tests antioxydants

Ce stage a été dirigé par Cristina Scaccini et co-encadré par Fausta Natella.

L'objectif de ce stage a été d'étudier les mécanismes antioxydants d'une série de 4-méthylcoumarines, composés phénoliques présents dans de nombreux végétaux et herbes médicinales. Cette série comprenait 9 composés de synthèse, distincts par la nature des substitutions présentes sur les noyaux aromatiques ou l'hétérocycle pyrone, la finalité de l'étude étant de mettre en évidence une relation structure-activité antioxydante. Pour cela, différents tests de mesure de pouvoir antioxydant ont été utilisés. Tout d'abord, le test de décoloration de la crocine a permis de comparer les activités de capture de radicaux peroxydes exercées par les différentes coumarines. La résistance des LDL à l'oxydation initiée soit par le AAPH soit par Cu^{2+} a constitué un second test de mesure de pouvoir antioxydant. En parallèle, le pouvoir antioxydant de cinq composés phénoliques de ma thèse (quercétine, rutine, (+)-catéchine, acide caféique et acide chlorogénique) a été évalué par ces deux tests.

I. Etat des connaissances

I.1 Présentation générale des coumarines

Les coumarines, caractérisées par une structure chimique de type 1,2-benzopyrone, regroupent un grand nombre de composés phénoliques, constitués d'un cycle benzène fusionné à un cycle α -pyrone (Figure-V-1).

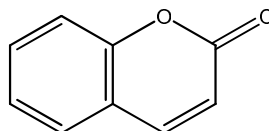


Figure-V-1. Structure chimique des coumarines.

Ces composés sont présents dans le règne végétal mais aussi dans les bactéries et les champignons. Elles possèdent une odeur plaisante caractéristique de foin.

En raison du nombre de substitutions possibles en divers sites, plus de 1300 coumarines différentes ont été identifiées à partir de sources naturelles, particulièrement de plantes vertes [1]. Certaines, comme la bergaptène (5-méthoxy-6,7-furanocoumarine), l'isopimpinelline (5,8-diméthoxy-6,7-furanocoumarine) ou la xanthotoxine (8-méthoxy-6,7-furanocoumarine), sont présentes dans les légumes et épices des Ombellifères comme le céleri, la coriandre, les carottes, le fenouil et le persil [2]. En Inde, la troupine ou 6-hydroxy-7,8-diméthoxy-4-méthylcoumarine a été isolée des feuilles de Tamarix, une plante ornementale utilisée en médecine et dans le tannage [3]. Les coumarines sont également présentes dans des herbes médicinales du Brésil, d'Espagne, du Mexique, du Chili, des régions méditerranéennes et de Chine. Elles ont été beaucoup utilisées dans les médecines traditionnelles et les remèdes populaires dans le traitement contre l'inflammation, l'œdème la fièvre ou les traitements des blessures de peau [4, 5].

I.1.2 Biodisponibilité des coumarines

Des études ont montré que l'absorption des coumarines depuis le tractus digestif est rapide et totale. Il est suggéré, du fait du caractère relativement peu polaire des molécules, que l'absorption se fasse principalement par diffusion passive. Chez l'homme, les coumarines sont fortement métabolisées dans le foie, via les cytochromes P-450. Ainsi 60 à 90% de la dose initiale se retrouvent sous forme de 7-hydroxycoumarines. Chez certains individus, d'autres voies, telles que la 3,4-époxydation, peuvent se

manifester. Ainsi, seulement 5% des coumarines natives sont retrouvées intactes en raison de l'importante conversion hépatique en 7-hydroxycoumarine, suivie de la glucuronidation du groupement phénolique ainsi introduit.

Ainsi, la concentration sanguine de coumarines natives n'excède que rarement 0,1 µg/mL après l'administration orale de 30 mg de coumarines, tandis que celle des 7-O-β-D-glucuronyloxy coumarines correspondantes est à peu près dix fois plus élevée [1, 6]. Ces métabolites pourraient eux-mêmes être thérapeutiquement actifs en exerçant des propriétés antioxydantes (après déconjugaison) et des effets vasodilatateurs [5].

I.1.3 Activités biologiques et pharmaceutiques des coumarines

a) Les différentes activités des coumarines

Les coumarines ont été très étudiées *in vivo* et *in vitro* pour leurs diverses activités. Un nombre considérable de dérivés synthétiques ou naturels ont déjà trouvé des applications pharmaceutiques.

Par exemple, des études *in vivo* et *in vitro* ont associé aux coumarines la réduction de l'œdème chez l'homme et l'inhibition de l'agrégation des plaquettes [1]. Les propriétés biologiques et biochimiques des coumarines et de leurs métabolites incluent aussi des activités antivirales, antithrombiques, antiallergiques [5], des activités d'inhibition d'enzymes (lipoxygénase et cyclooxygénase) [4], des activités antioxydantes de capture des espèces réactives de l'oxygène [7] et surtout des activités antitumorales [6].

b) Les activités anti-cancers

Lacy and O'Kennedy soulignent l'activité des coumarines à divers niveaux dans différents types de cancers [6]. L'administration de coumarines et de leurs dérivés pourrait améliorer le traitement de mélanomes malins, du cancer de la prostate et de la leucémie.

D'autres études, se penchant sur les mécanismes d'action, révèlent que la 6-nitro-7-hydroxycoumarine et la 7,8-dihydroxycoumarine induisent une cytotoxicité spécifique vis-à-vis des cellules rénales cancéreuses. Ces composés pourraient donc jouer un rôle dans le traitement du cancer du rein en limitant la prolifération des cellules cancéreuses via une inhibition de la synthèse d'ADN [8].

Des travaux *in vitro* et *in vivo* à partir d'hépatocytes de rat, concluent que le rôle chimiopréventif de l'esculétine (6,7-dihydroxycoumarine) est principalement attribué à ses capacités antioxydantes [9].

Enfin, les activités anti-cancer des coumarines peuvent s'expliquer par leur activité immuno-modulatrice qui entraîne une augmentation des fonctions des macrophages et des lymphocytes [2, 5].

I.2 Les 4-méthylcoumarines

Selon Pedersen *et al.* [10], le problème des coumarines est leur métabolisation possible en 3,4-époxycoumarines via les 3-hydroxycoumarines [6]. Ces intermédiaires fortement électrophiles sont connus pour leurs effets mutagéniques et leur toxicité en général. Pour prévenir ce problème, des composés de structure 4-méthylcoumarine ont été synthétisés. La formation des 3,4-époxycoumarines n'est alors plus possible car les 4-méthylcoumarines ne sont pas des substrats pour les monooxygénases à cytochrome P-450 du foie (dont l'action est limitée à des coumarines possédant un C4 non substitué).

I.2.1 Activités biologiques des 4-méthylcoumarines

De façon générale, la méthylation ne semble pas affecter les propriétés bénéfiques attribuées aux coumarines. En effet, les 4-méthylcoumarines sont reconnues pour leurs effets biologiques, détaillés dans de nombreuses revues.

Ainsi, la 4-méthylesculétine (6,7-dihydroxy-4méthylcoumarine) et la 4-méthylidaphnatine (7,8-dihydroxy-4méthylcoumarine) inhibent de façon sélective les enzymes pro-inflammatoires telles que les lipoxygénases. La 5,7-dihydroxy-4méthylcoumarine, quant à elle, est un bon inhibiteur des cyclooxygénases [4]. La 7,8-dihydroxy-4méthylcoumarine protège efficacement les cellules mononucléaires du sang contre l'attaque oxydante et l'ADN des lymphocytes périphériques du sang contre le peroxyde d'hydrogène [5].

I.2.2 Relation structure-activité

Raj *et al.* ont examiné *in vitro* les effets de différentes 4-méthylcoumarines sur la peroxydation lipidique de microsomes de foie de rats, initiée par le NADPH et mesurée par le dosage de TBARs (thiobarbituric acid reactive substances) [11]. Ils ont observé que les composés à substitution dihydroxy et diacétoxy entraînaient une forte inhibition de la peroxydation lipidique. En revanche, les diméthoxycoumarines et les monohydroxycoumarines se sont révélées inefficaces. De plus, les

positions relatives des groupes hydroxy et acétoxy influencent l'inhibition selon l'ordre : 7,8-dihydroxy > 6,7-dihydroxy > 5,7-dihydroxy. Ainsi, l'excellente capacité antioxydante des dérivés dihydroxy de 4-méthylcoumarines est principalement attribuée à la présence du noyau catéchol. Pour expliquer le pouvoir antioxydant des diacétoxy-4-méthylcoumarines, il est supposé que les enzymes microsomaux possèdent une activité désacétylase leur permettant de convertir les diacétoxy-4-méthylcoumarines en dihydroxy-4-méthylcoumarines. En l'absence d'activité désacétylase, les auteurs supposent que les diacétoxy-4-méthylcoumarines peuvent malgré tout être converties en dihydroxy-4-méthylcoumarines par un mécanisme radicalaire via la formation de cétènes réactifs (Figure-V-2).

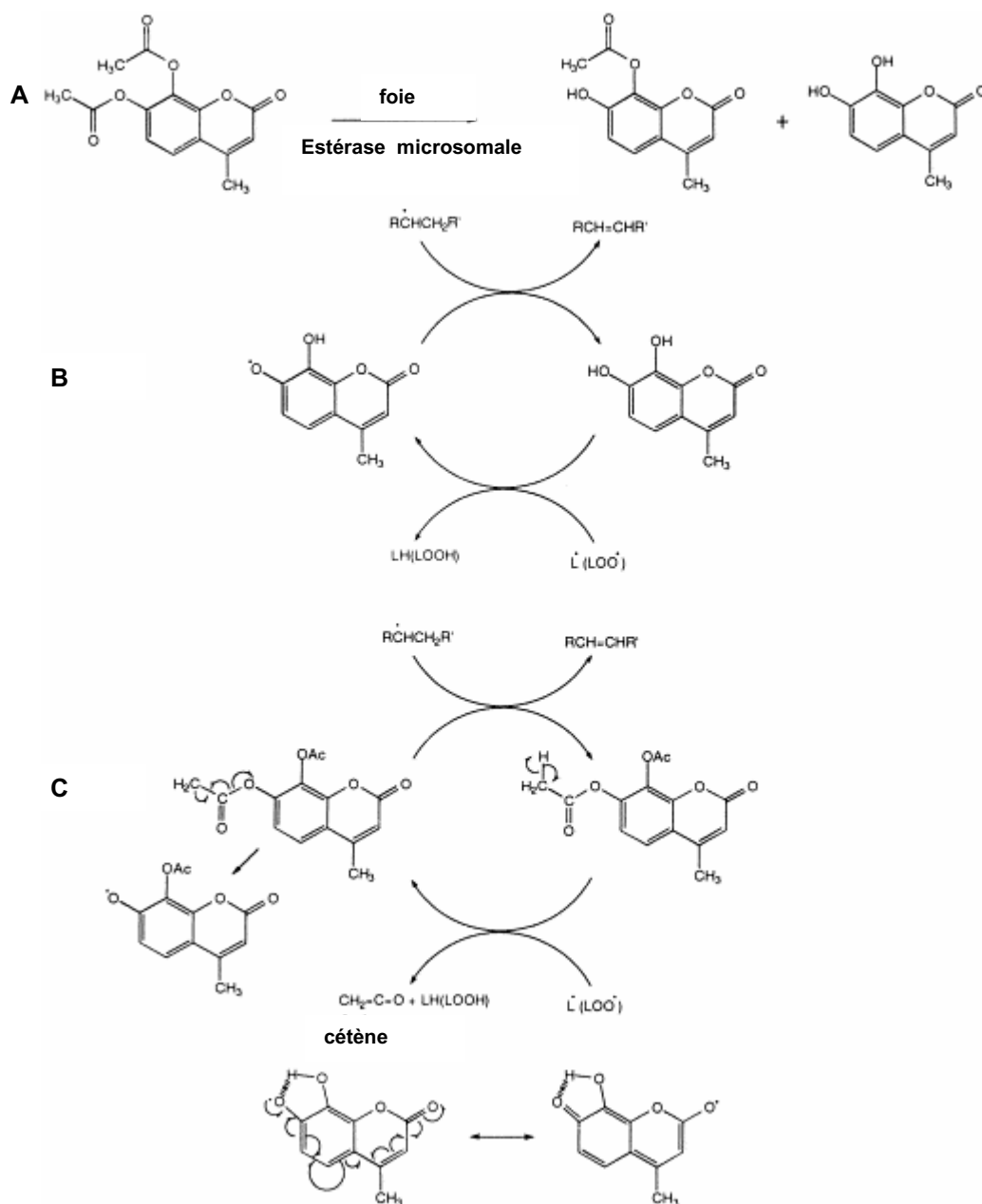


Figure-V-2. Mécanismes antioxydants des diacétoxy-4-méthylcoumarines en présence ou en l'absence d'estérases. Par Raj et al. 1998 [11].

Par différents tests (inhibition de la peroxydation lipidique microsomale, inhibition de la génération du radical HO[•]..), il a été confirmé que les coumarines possédant des substitutions *o*-dihydroxy étaient des inhibiteurs efficaces de la peroxydation lipidique, tout particulièrement si elles sont substituées par un groupement méthyl en position C4 [7]. Cette dernière observation est attribuée à l'augmentation de la solubilité des coumarines en phase lipidique.

Dans une autre étude portant sur la résistance des LDL à l'oxydation, les 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines se sont montrées de très bons antioxydants en terme d'inhibition de la consommation de dioxygène et de protection ou régénération de l' α -tocophérol [12].

Plus récemment, Pedersen *et al.* ont étudié la capacité de 4-méthylcoumarines de synthèse à réduire les radicaux galvinoxyle et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) avec suivi de la réaction par résonance paramagnétique électronique. Ils ont aussi utilisé la sonde fluorescente DCF pour mettre en évidence le stress oxydant intracellulaire causé par les espèces réactives de l'oxygène et son inhibition par les 4-méthylcoumarines. Leurs résultats confirment que la structure *ortho*-dihydroxy-4-méthylcoumarine est très efficace pour la capture des radicaux. En revanche, aucune différence entre les 7,8- et 6,7-dihydroxy-4-méthylcoumarines n'a été observée. Dans ces tests, les *ortho*-diacétoxy-4-méthylcoumarines étaient également moins efficaces que les *ortho*-dihydroxy-4-méthylcoumarines mais plus efficaces que les *méta*-dihydroxy-4-méthylcoumarines.

Conclusion

Les coumarines et 4-méthylcoumarines possèdent de nombreux effets bénéfiques *in vivo* ou *in vitro*, principalement mis en évidence dans des modèles cellulaires. Deux mécanismes principaux sont responsables des effets chimiopréventifs de ces composés : leurs propriétés antioxydantes et leurs fonctions immunomodulatrices.

Malgré les études évaluant les relations structure-activité antioxydante des coumarines, les mécanismes d'action restent à préciser. L'objectif de ce chapitre est de compléter les travaux de Pedersen *et al.*, par des tests physico-chimiques plus faciles à interpréter. Le test de décoloration de la crocine sera d'abord utilisé pour mesurer la capacité des 4-méthylcoumarines à capturer des radicaux peroxydes. L'inhibition par les 4-méthylcoumarines de l'oxydation des LDL initiée par le AAPH ou par Cu^{II} sera aussi étudiée. L'influence des substitutions dihydroxy ou diacétoxy, de leur localisation et du type de chaîne en position C3 sera plus particulièrement analysée.

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Produits chimiques

Les 4-méthylcoumarines ont été synthétisées d'après le protocole de Parmar *et al.* par Luciano Saso (département de pharmacologie des substances naturelles de l'université de Rome) [13]. Elles sont présentées en Figure-V-3.

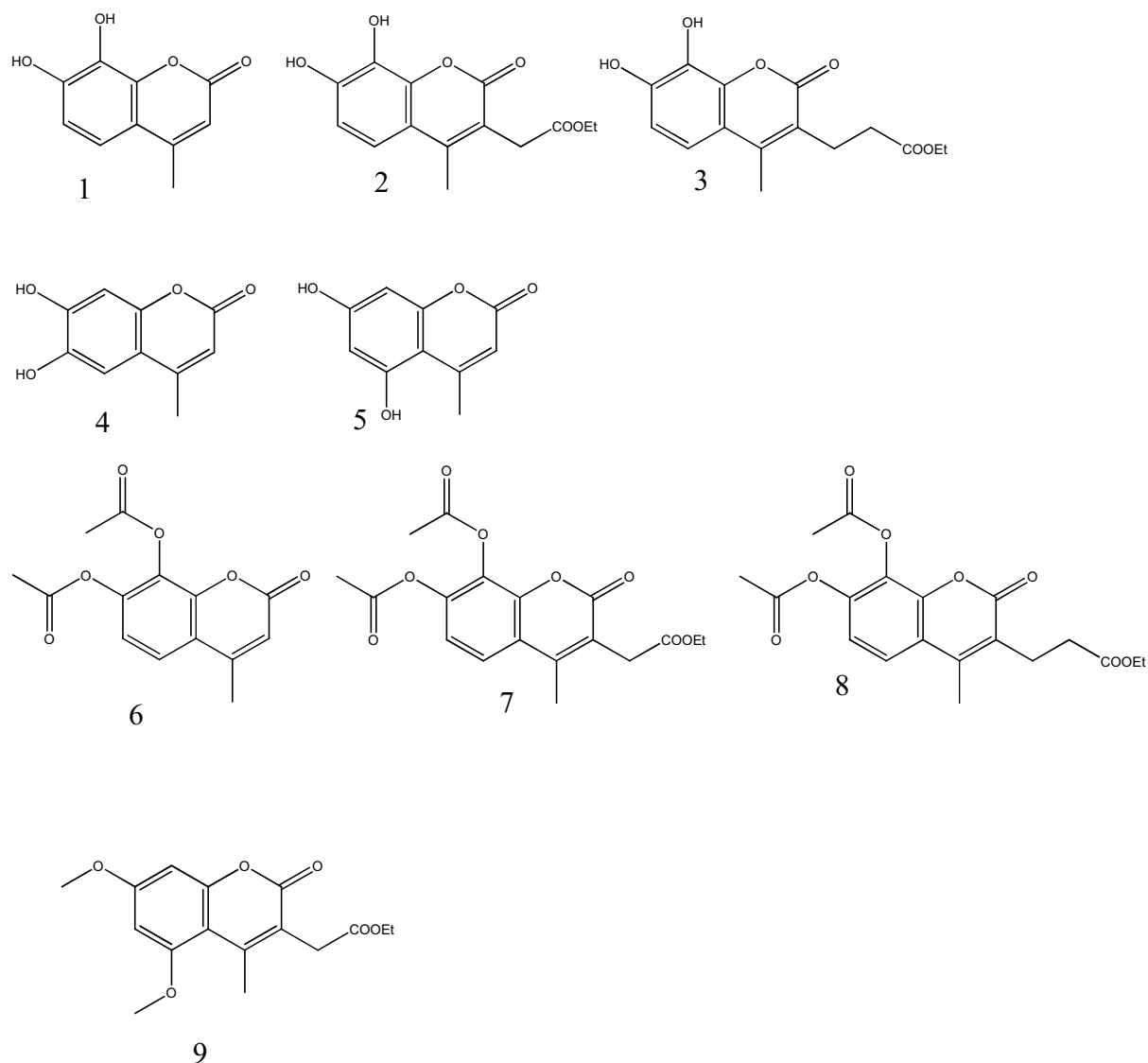


Figure-V-3. Structure chimique des 4-méthylcoumarines.

La crocine a été extraite du safran [14]. Sa concentration est standardisée par la mesure de l'absorbance à 443 nm d'une solution dans le méthanol ($\epsilon = 1,33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Le AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride), le chlorure de cuivre (PM = 134,45 g.mol⁻¹, 98%), la quercétine (dihydrate, 98%), la rutine (hydrate, PM = 610,52 g.mol⁻¹, 95%), l'acide caféique (PM = 180,16 g.mol⁻¹, 98%), l'acide chlorogénique (PM = 354,31 g.mol⁻¹, 95%), la (+)-catéchine (hydrate, PM = 290,27 g.mol⁻¹, 98%) et le trolox ou acide (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylique (PM = 250,29 g.mol⁻¹, 97%) proviennent de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Le méthanol et l'éthanol, de qualité analytique, proviennent de Carlo Erba (Milan, Italie). L'eau utilisée est obtenue à l'aide d'un système Millipore® QPak 2 (Millipore Corporation, Bedford, USA).

L'EDTA, KBr, NaN₃, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl et NaOH proviennent de Fluka (Buchs, Suisse).

II.1.2 Equipements

Les analyses sont effectuées sur un spectrophotomètre UV-vis Beckman Coulter DU 800 possédant un bloc de mesure à 6 cuves thermostatées.

L'ultracentrifugeuse Beckman TL-100, équipée d'un rotor T-100.3 pouvant contenir 8 tubes d'une capacité de 13 mL, est utilisée pour séparer les différentes classes de lipoprotéines.

II.2 Méthodes

II.2.1 Test de décoloration de la crocine

Le principe du test est détaillé dans l'étude bibliographique (IV.3.2.b). En résumé, il s'agit de mesurer la décoloration à 443 nm de la crocine sous l'effet des radicaux peroxydes produits par la décomposition thermique du dérivé azoïque AAPH. L'introduction d'un antioxydant entraîne une capture des radicaux peroxydes et ralentit donc la décoloration de la crocine.

Le milieu réactionnel est constitué d'un tampon phosphate 10 mM, pH 7,4. Il contient 12 µM de crocine et l'antioxydant (introduit à partir d'une solution-mère dans le méthanol ou l'éthanol). La concentration d'antioxydant dans la cuve est de 0; 6; 12; 24 ou 48 µM. Le mélange est pré-équilibré à 40°C quelques minutes. La réaction est initiée en ajoutant le AAPH (à partir d'une solution-mère dans le tampon) pour obtenir une concentration finale de 10 mM.

La vitesse de décoloration de la crocine en l'absence d'antioxydant (V_0) est calculée en mesurant la pente du déclin quasi-linéaire de A(443 nm) durant les dix premières minutes de réaction (1 point par minute). En présence de différentes concentrations d'antioxydants, les vitesses de décoloration, notées V , sont évaluées de la même façon. La compétition entre la crocine et l'antioxydant pour les radicaux peroxydes s'exprime par la relation suivante :

$$V_0/V = 1 + (k_a/k_c) \times [\text{Antioxydant}]/[\text{Crocine}].$$

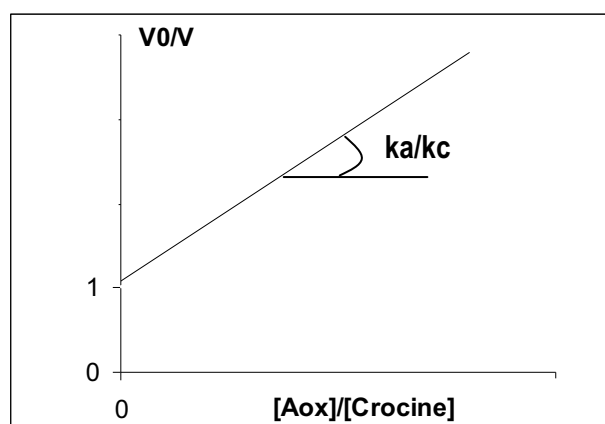


Figure-V-4. Représentation graphique de la relation V_0/V vs. $[Aox]/[Crocine]$.

Ainsi, la courbe V_0/V vs. $[Antioxydant]/[Crocine]$ est linéaire et sa pente donne accès au rapport des constantes de vitesse de capture des radicaux peroxydes par l'antioxydant et la crocine respectivement. La capacité antioxydante des composés exprimée par le rapport k_a/k_c est finalement rapportée à celle du Trolox en divisant ce rapport par celui du Trolox pour obtenir k_a/k_{Trolox} .

Ce test a été réalisé en triplicata avec les coumarines de synthèse mais aussi avec les 5 composés phénoliques sélectionnés dans mon travail de thèse (quercétine, rutine, acide caféique, acide chlorogénique, (+)-catéchine).

Une analyse de variance (ANOVA) à un facteur est réalisée sur les résultats obtenus. Si un effet significatif est obtenu (intervalle de confiance de 95%), l'ANOVA est suivie du test de Tukey-Kramer HSD afin de discriminer les différents antioxydants. Les analyses ont été effectuées avec XLStat, version 2008.3.02 (Addinsoft SARL).

II.2.2 Test de résistance des LDL à l'oxydation

a) Isolement des LDL à partir du plasma sanguin

Le sang de volontaires à jeun, collecté dans une solution d'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA, 1 mg/mL), est centrifugé pendant 20 minutes à 2000 tr.min⁻¹.

Les LDL humains ($d = 1,019-1,063$ g/mL) sont isolés du plasma par une ultracentrifugation séquentielle en solution saline. Pour cela, la densité du plasma est ajustée à 1,24 g/mL par ajout de 381,6 mg de KBr à chaque mL de plasma. Le mélange est agité très délicatement. A 1360 μ L de plasma équilibré, 2640 μ L d'une solution saline de densité 1,0063 est déposée en surface dans les tubes de la centrifugeuse en prenant garde de ne pas mélanger les deux solutions. L'ultracentrifugation est alors lancée à 100000 tr. min⁻¹ pendant 2 heures à 15°C. La solution saline de densité 1,0063 est composée de 11,42 g.L⁻¹ de NaCl, 100 mg.L⁻¹ d'EDTA, 10 mg.L⁻¹ de NaN₃ et ajustée à pH 7,4 à l'aide de NaOH.

A la fin de la centrifugation, 3 bandes sont obtenues, du haut vers le bas : la bande des VLDL de densité 0,94-1,006 (+ chylomicrons si le sujet n'était pas à jeun, de densité < 0,94), les LDL de densité 1,006-1,063 et les HDL de densité 1,063-1,21. La bande de LDL est reconnaissable à sa couleur jaune à cause de son fort contenu lipidique (Figure-V-5).

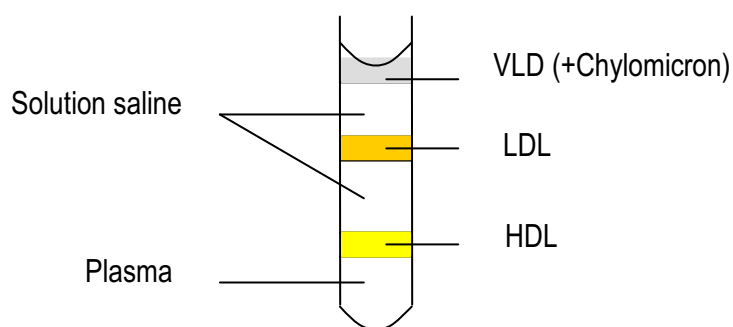


Figure-V-5. Séparation des différentes classes de lipoprotéines après ultracentrifugation séquentielle du plasma.

Les VLDL et la solution saline supérieure sont retirés délicatement. Puis les LDL sont prélevés en essayant de les diluer les moins possibles avec la solution saline.

La solution de LDL est conservée sous diazote à 4°C (pas plus d'une semaine) jusqu'à l'utilisation. La concentration de lipoprotéines est exprimée en termes de contenu protéique en utilisant la méthode de Lowry *et al.* [15] avec la SAB comme standard (Annexe 1).

b) Oxydation des LDL

Avant d'être utilisées, les LDL sont dialysées dans le noir pendant 18 heures à 4°C, contre deux fois deux litres de tampon phosphate 10 mM à pH 7,4.

Les LDL (50 µg.mL⁻¹) sont incubées dans le tampon phosphate directement dans les cuves en quartz. CuCl₂ préalablement dissous dans de l'eau purifié est ajouté à t₀ à la concentration finale de 5 µM. La cinétique d'apparition des diènes conjugués est suivie pendant 4 heures en mesurant A_{234 nm} à 37°C (intervalle entre 2 spectres consécutifs : 2 minutes). Le spectrophotomètre utilisé permet de disposer pour chaque série de mesure de 6 cuves. Deux d'entre elles sont consacrées au « test » (autoxydation des LDL sans ajout d'initiateurs d'oxydation) et au « contrôle » (oxydation des LDL sans antioxydant) Les quatre dernières sont dédiées aux expériences avec antioxydants. Différentes concentrations sont ajoutées au milieu d'incubation avant l'ajout de Cu²⁺. La même procédure est suivie quand l'oxydation des LDL est initiée par le AAPH à une concentration finale de 4 mM.

Chaque coumarine a été testée une fois à quatre concentrations différentes définies en fonction de son pouvoir antioxydant déterminé dans le test de décoloration de la crocine (Tableau-V-1).

Tableau-V-1. Concentrations des 4-méthylcoumarines dans les expériences d'inhibition de l'oxydation des LDL initiée soit par Cu²⁺ soit par le AAPH.

Composé	Concentrations testées (µM)
1	0,01 – 0,1 – 1 – 10
2	0,01 – 0,1 – 1 – 10
3	0,01 – 0,1 – 1 – 10
4	0,1 – 1 – 5 – 10
5	1 – 10 – 50 – 100
6	0,1 – 1 – 5 – 10
7	0,1 – 1 – 5 – 10
8	0,1 – 1 – 5 – 10
9	1 – 10 – 50 – 100

Le pouvoir antioxydant de la quercétine, la rutine, la (+)-catéchine, l'acide caféique et l'acide chlorogénique en concentration 0,1 et 1 µM a également été testé pour comparaison.

La durée de la phase de latence est déterminée graphiquement à partir de la courbe A_{234 nm} = f (t) par le point d'intersection des tangentes de la phase initiale et de la phase de démarrage de l'oxydation.

III. Résultats et discussion

III. 1 Test de décoloration de la crocine

III.1.1 Pouvoir antioxydant du Trolox et des composés phénoliques

La Figure-V-6 représente la cinétique de décoloration de la crocine en présence de différentes concentrations de Trolox.

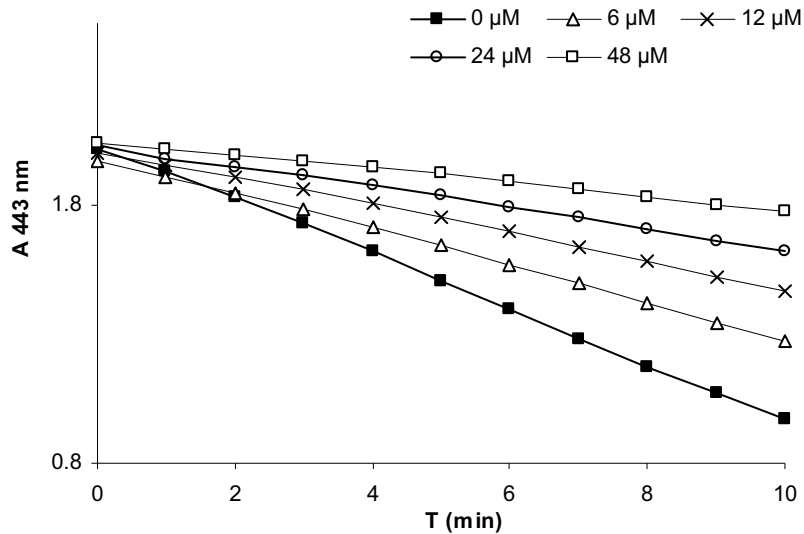


Figure-V-6. Consommation de la crocine en absence et en présence de différentes concentrations de Trolox. [Crocine] = 12 µM; [AAPH] = 10 mM; [Trolox] = 0; 6 ; 12; 24; 48 µM. T = 40°C à pH 7,4.

Les pentes des courbes (V) sont déterminées pour chaque concentration de Trolox. Après 3 répétitions indépendantes, la moyenne $V_0/V = f([Trolox]/[Crocine])$ est tracée (Figure-V-7).

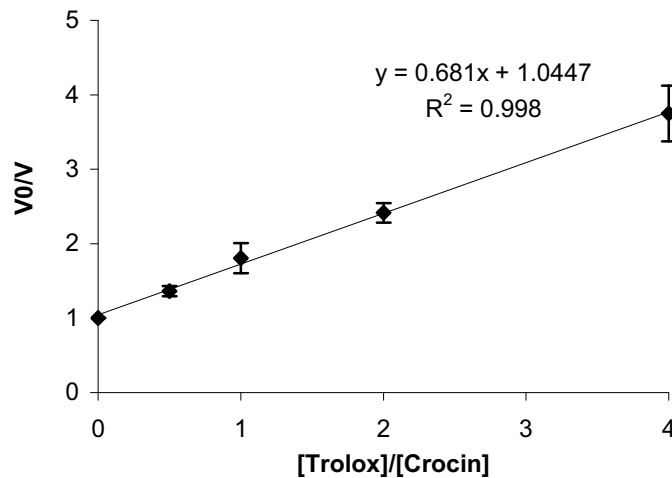


Figure-V-7. Régression linéaire pour la détermination d'un indice antioxydant pour le Trolox.

La pente de la régression linéaire permet de déterminer l'indice antioxydant du composé testé. Cette procédure a été répétée pour les cinq composés phénoliques de ma thèse. La Figure-V-8 représente leurs résultats. Il est à noter que les courbes des deux acides hydroxycinnamiques sont quasiment superposées.

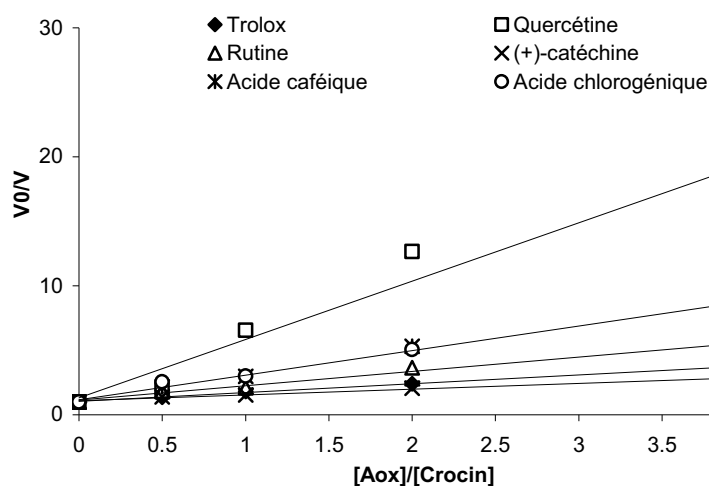


Figure-V-8. Régression linéaire permettant de déterminer l'indice antioxydant des 5 composés testés.

En divisant la pente des courbes de chaque composé par celle du Trolox, on obtient une activité antioxydante relative à celle du trolox (Tableau-V-2).

Tableau-V-2. Activité antioxydante des composés testés. Statistiques : les lettres indiquent des groupes de composés significativement différents $p < 0,0001$ (test post-hoc de Tukey-Kramer).

Composé	Activité antioxydante relative à celle du Trolox	Statistiques
Trolox	1	
Quercétine	6,65 (\pm 0,20)	A
Acide caféique	2,80 (\pm 0,32)	B
Acide chlorogénique	2,72 (\pm 0,13)	B
Rutine	1,63 (\pm 0,22)	C
(+)-Catéchine	0,65 (\pm 0,07)	D

Les composés polaires sont de meilleurs pièges à radicaux peroxydes que le Trolox (sauf la (+)-catéchine). En accord avec les résultats de la thèse, ce test révèle à nouveau que la quercétine possède le meilleur pouvoir antioxydant. Les deux acides hydroxycinnamiques ont un pouvoir antioxydant équivalent. Dans ce test, l'influence de la glycosylation de la quercétine en C3 est importante puisque l'activité antioxydante de la rutine est trois fois moins marquée que celle de la quercétine. La (+)-catéchine n'a montré qu'un faible pouvoir antioxydant.

III.1.2 Pouvoir antioxydant des 4-méthylcoumarines

Le test de décoloration de la crocine a été effectué de la même façon avec les 4-méthylcoumarines. Celles-ci peuvent être réparties en trois groupes. Cinq d'entre elles sont des dihydroxy-4-méthylcoumarines (dihydroxylation en position 5,7 ou 6,7 ou 7,8), trois d'entre elles sont des 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines et la dernière est une 5,7-diméthoxy-4-méthylcoumarine. Au sein de ces groupes, les composés se distinguent par la présence d'une chaîne en C3 de type éthoxycarbonylméthyle ou éthoxycarbonyléthyle. Les résultats du test sont rapportés dans le Tableau-V-3.

Tableau-V-3. Activité antioxydante des coumarines testées. Statistiques : les lettres indiquent des groupes de composés significativement différents $p < 0,0001$ (test post-hoc de Tukey-Kramer).

Composé	Position des OH	Substitution en C-3	Capacité antioxydante/Trolox	Statistiques
1	7 et 8	H	5,78 ($\pm 0,28$)	B
2	7 et 8	CH ₂ COOEt	5,22 ($\pm 0,26$)	B
3	7 et 8	CH ₂ CH ₂ COOEt	7,80 ($\pm 0,60$)	A
4	6 et 7	H	3,47 ($\pm 0,21$)	C
5	5 et 7	H	0,15 ($\pm 0,02$)	D
Composé	Position des OAc	Substitution en C-3	Capacité antioxydante/Trolox	
6	7 et 8	H	0,97 ($\pm 0,05$)	D
7	7 et 8	CH ₂ COOEt	0,69 ($\pm 0,07$)	D
8	7 et 8	CH ₂ CH ₂ COOEt	3,56 ($\pm 0,54$)	C
Composé	Position des OCH ₃	Substitution en C-3	Capacité antioxydante/Trolox	
9	5 et 7	CH ₂ COOEt	0,013 (+/- 0,01)	D

Avec une activité antioxydante de 5,78, 5,22 et 7,80, les composés de structure 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines égalent l'activité antiradicalaire de la quercétine, ce qui confirme les résultats de plusieurs études [10, 11]. De plus, comme Raj et al. [11], mais contrairement à Pedersen et al. [10], nous observons que la localisation de la substitution dihydroxy influence la capacité antioxydante des composés dans l'ordre 7,8 > 7,6 >> 7,5. L'excellente activité antioxydante des dérivés ortho-dihydroxy (noyau catéchol) peut s'expliquer par leur capacité à former un radical stabilisé de type semiquinone après transfert d'un atome H vers le radical peroxy. Les 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines présentent un pouvoir antioxydant beaucoup plus faible que celui de leurs homologues dihydroxy. Si une désacétylation radicalaire (avec formation de cétènes réactifs) peut intervenir [16], elle est trop lente pour faire des 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines des précurseurs efficaces des 7,8-dihydroxy-4-

méthylcoumarines dans ce système. Enfin, la 5,7-diméthoxy-4-méthylcoumarine est quasiment dépourvue d'effet antioxydant.

L'introduction en position C3 d'une chaîne éthoxycarbonyléthyle a augmenté de façon significative la capacité antioxydante des 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines. En revanche l'introduction d'une chaîne plus courte de type éthoxycarbonylméthyle est sans effet. Les mêmes tendances sont observées pour les 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines. Ce phénomène est assez inattendu. Il se pourrait que les atomes H des groupements méthylènes aient une labilité suffisante pour être transférés aux radicaux peroxy.

III.2 Test d'oxydation des LDL

III.2.1 Protection contre l'oxydation des LDL par les 5 composés phénoliques

L'inhibition de l'oxydation des LDL induite par le AAPH ou par Cu^{2+} a été étudiée avec la quercétine, la rutine, la (+)-catéchine, l'acide caféique et l'acide chlorogénique. La Figure-V-9 illustre l'exemple de l'inhibition de l'oxydation des LDL par la quercétine.

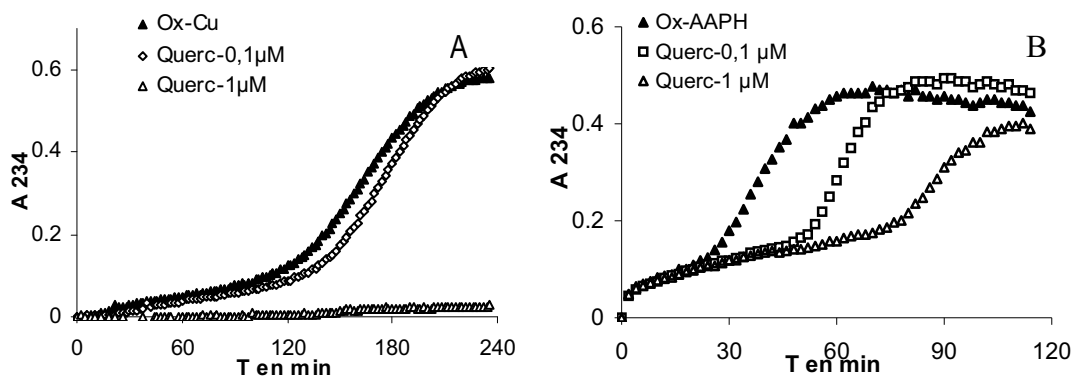


Figure-V-9. Oxydation des LDL initiée par Cu^{2+} (A) [Cu^{2+}] = 5 μM ou par le AAPH (B) [AAPH] = 4 mM et inhibée par la quercétine [Quercétine] = 0,1 ou 1 μM à T = 37°C.

Si le AAPH produit des radicaux peroxyes à vitesse constante, via sa décomposition thermique spontanée, Cu^{2+} est probablement réduit in situ en Cu^+ , lequel décompose les hydroperoxydes lipidiques préexistants au sein des particules de LDL pour former des radicaux alkoxyes (réaction de Fenton) capables d'amorcer la peroxydation des résidus d'acides polyinsaturés des phospholipides, triglycérides et esters du cholestérol. Ainsi, l'inhibition par les phénols de l'oxydation des LDL induite par le AAPH peut opérer par simple piégeage des radicaux peroxyes initiateurs dans la phase aqueuse

tandis que l'inhibition de l'oxydation initiée par Cu^{2+} peut opérer par chélation des ions métalliques sous forme de complexes inertes. Notons cependant que Cu^{2+} est typiquement en fort excès par rapport aux phénols de sorte que ce mécanisme de protection est probablement marginal. Enfin, mêmes si les phénols ont sans doute un potentiel limité de réaction directe avec les radicaux oxyles et peroxydes lipidiques, ils peuvent protéger les LDL par régénération des antioxydants endogènes (en particulier, l' α -tocophérol), et par là même prolonger la phase de latence qui correspond justement à la consommation de ces derniers [17].

Quand l'oxydation est initiée par $5 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} , une phase de latence de 125 minutes est enregistrée en absence d'antioxydants (témoin). La phase de latence observée coïncide avec la consommation de l' α -tocophérol. A une concentration de $1 \mu\text{M}$, la quercétine permet d'inhiber complètement la formation des diènes conjugués sur au moins 4 heures. A $0,1 \mu\text{M}$, une légère extension de la phase de latence de 125 à 140 minutes est observée. Dans le cas de l'oxydation initiée par le AAPH, la présence de quercétine permet de rallonger la phase de latence de 26 (contrôle) à 52 minutes ($0,1 \mu\text{M}$) et à 76 minutes ($1 \mu\text{M}$) (Figure-V-9).

Tableau-V-4. Inhibition par les composés phénoliques de l'oxydation des LDL initiée par Cu^{2+} ou par le AAPH. $[\text{Cu}^{2+}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{AAPH}] = 4 \text{ mM}$ (B) $T = 37^\circ\text{C}$. a) : inhibition totale de l'oxydation des LDL sur au moins 4 heures.

Composé	Concentration (μM)	Prolongation de la phase de latence par rapport à celle du témoin (%)	
		Initiation par Cu^{2+}	Initiation par AAPH
Quercétine	0,1	14	100
	1	a)	192
Rutine	0,1	12	88
	1	a)	165
(+)-Catéchine	0,1	0	81
	1	84	181
Acide caféique	0,1	0	123
	1	a)	142
Acide chlorogénique	0,1	0	65
	1	a)	130

La protection contre l'oxydation des LDL a été testée pour l'ensemble des composés phénoliques. Elle est exprimée en pourcentage de prolongation de la phase de latence dans le Tableau-V-4. Ainsi, plus la valeur est importante, plus l'inhibition est forte.

Concernant l'oxydation initiée par Cu^{2+} , les concentrations testées ne permettent pas de discriminer clairement les antioxydants. Une simple tendance se dégage : flavonols > acides hydroxycinnamiques > catéchine.

Concernant l'oxydation initiée par le AAPH, la discrimination des composés est meilleure. A la concentration de 0,1 μM , curieusement l'acide caféique est le composé le plus efficace dans l'allongement de la phase de latence. Certains auteurs mentionnent que l'acide caféique est capable de régénérer efficacement l' α -tocophérol à partir du radical α -tocophéroxy, ce qui pourrait expliquer ce résultat [23, 25]. Cependant, ces expériences n'ont été effectuées qu'une seule fois et mériteraient confirmation. De plus, à la concentration de 1 μM , l'acide caféique n'est plus le meilleur antioxydant. La hiérarchie est alors la suivante : quercétine > (+)-catéchine > rutine > acides hydroxycinnamiques.

III.2.2 Protection de l'oxydation des LDL par les 4-méthylcoumarines

Les 4-méthylcoumarines ont été testés de la même façon pour leur capacité de protection contre l'oxydation des LDL. Pour chaque composé, quatre concentrations ont été choisies en fonction du pouvoir antioxydant mesuré au préalable par le test de décoloration de la crocine. Parmi les quatre concentrations, deux sont fixées à 1 et 10 μM pour l'ensemble des composés, de manière à pouvoir comparer les composés entre eux (Tableau-V-5).

Dans le cas de l'initiation de l'oxydation des LDL par Cu^{2+} , les composés ont montré des propriétés inhibitrices en bonne adéquation avec leur capacité antioxydante mesurée dans le test de décoloration de la crocine. Ainsi, à une concentration de 1 μM , les 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines produisent les plus forts allongements de la phase de latence : 119%, 127% et de plus de 158% pour les composés 1, 2 et 3 respectivement. A 10 μM , l'inhibition est tellement marquée que la peroxydation n'a pas démarré durant les 4 heures de suivi cinétique. Comme pour le test de décoloration de la crocine, la 6,7-dihydroxy-4-méthylcoumarine (composé 4) est moins efficace que les autres coumarines, permettant tout de même une prolongation de la phase de latence de 70% à 1 μM .

Tableau-V-5. Inhibition par les 4-méthylcoumarines de l'oxydation des LDL initiée par Cu^{2+} ou AAPH, $[\text{Cu}^{2+}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{AAPH}] = 4 \text{mM}$ (B) $T = 37^\circ\text{C}$. a) : inhibition totale de l'oxydation des LDL sur 4 heures, soit une prolongation de phase de latence $>158\%$.

Composé			Prolongation de la phase de latence par rapport à celle du contrôle (%)			
			Initiation par Cu^{2+}		Initiation par AAPH	
	Position des OH	Substitution en C-3	1 μM	10 μM	1 μM	10 μM
1	7 et 8	H	119	a)	99	302
2	7 et 8	CH_2COOEt	127	a)	107	357
3	7 et 8	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOEt}$	a)	a)	92	364
4	6 et 7	H	70	a)	67	266
5	5 et 7	H	-16	-25	56	63
	Position des OAc	Substitution en C-3				
6	7 et 8	H	0	a)	99	204
7	7 et 8	CH_2COOEt	8	a)	136	353
8	7 et 8	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOEt}$	127	a)	114	407
	Position des OCH_3	Substitution en C-3				
9	5 et 7	CH_2COOEt	0	0	85	85

En raccourcissant la phase de latence de 16% et 25%, à 1 et 10 μM respectivement, la 5,7-dihydroxy-4-méthylcoumarine (composé 5) qui ne possédait aucun pouvoir antioxydant dans le test de décoloration de la crocine, apparaît même pro-oxydante dans ce test (Figure-V-10-A et Tableau-V-5).

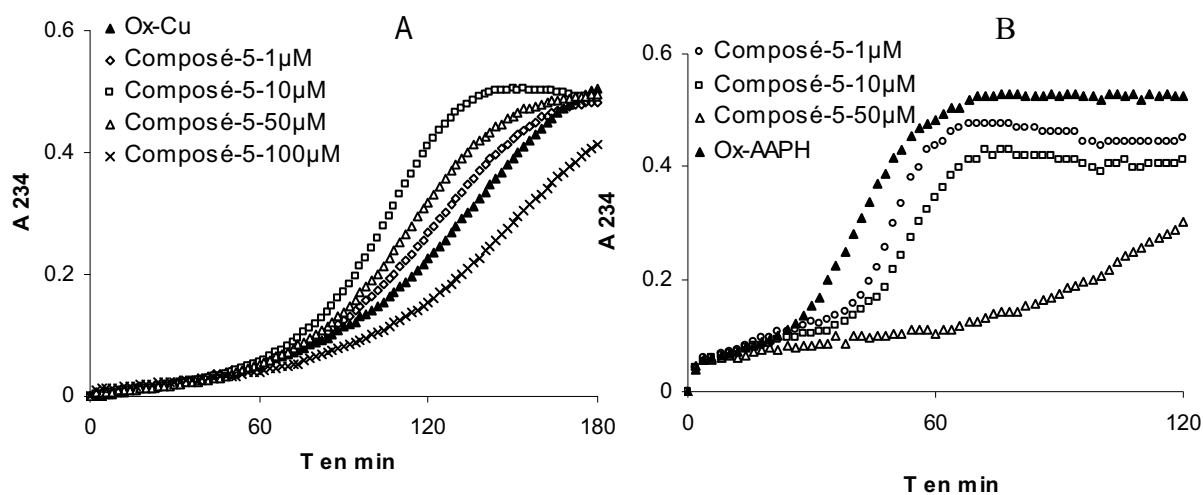


Figure-V-10. Oxydation des LDL initiée soit par Cu^{2+} (A) $[\text{Cu}^{2+}] = 5 \mu\text{M}$, soit par AAPH (B), $[\text{AAPH}] = 4 \text{mM}$, en présence du composé-5. $[\text{Composé-5}] = 1, 10, 50$ et $100 \mu\text{M}$. $T = 37^\circ\text{C}$.

Les 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines ont toutes inhibé efficacement l'oxydation des LDL à 10 μM (aucun démarrage d'oxydation pendant 4 heures). A 1 μM , lorsque la position C3 n'est pas substituée (composé 6), aucun effet n'est observé. La phase de latence est prolongée de 8% et 127% par introduction des chaînes éthoxycarbonylméthyle et éthoxycarbonyléthyle, respectivement (composé

7 et 8). Une nette différence d'efficacité entre les 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines et les 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines est aussi perceptible (Tableau-V-5). Elle pourrait être attribuée à la chélation des ions du cuivre que seules les premières sont en mesure d'assurer. Enfin, le composé diméthoxylé (composé 9) est sans effet.

Pour les 7,8-dihydroxy- et 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines, l'introduction d'une chaîne ester en position C3 étend la phase de latence selon l'ordre : $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOEt} > \text{CH}_2\text{COOEt} > \text{H}$. La chaîne $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOEt}$ pourrait conférer aux molécules un caractère plus hydrophobe, favorisant ainsi leurs interactions avec la partie lipidique pour une meilleure régénération de l' α -tocophérol présent initialement dans les LDL.

Dans le cas de l'oxydation des LDL initiée par le AAPH, les comportements des composés sont différents. Tous les composés exercent des activités antioxydantes et prolongent la phase de latence de 50% au minimum (Figure-V-10-B et Tableau-V-5). Dans ce système, aux concentrations de 1 μM comme de 10 μM , il est intéressant de voir que certaines des 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines et des 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines permettent d'obtenir des phases de latence du même ordre de grandeur. La superposition des cinétiques d'oxydation des LDL pour les composés 1 et 6 (à 1 μM) et les composés 2 et 7 (à 10 μM) illustre cette remarque (Figure-V-11). Même si les effets sont moins nets aux autres concentrations testées, cette observation semble confirmer l'hypothèse de Raj et al. [11] selon laquelle les radicaux peroxytes pourraient convertir les 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines en 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines selon un processus radicalaire de désacétylation. Cependant, le fait que les 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines soient dans l'ensemble bien moins efficaces que les 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines correspondantes dans le test de décoloration de la crocine, où elles sont pourtant confrontées aux mêmes radicaux peroxytes, suggère plutôt une désacétylation induite par une activité estérase de la partie protéique des LDL (ApoB-100). Les résultats plus contrastés des 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines dans l'inhibition de la peroxydation des LDL induite par Cu^{2+} ne permettent cependant pas de confirmer complètement cette hypothèse. Seule une étude de la stabilité des 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines en présence de LDL le permettrait.

A la concentration de 1 μM , ce test est moins discriminant que le précédent. Il ne permet plus de détecter l'influence de la substitution en C3 sur l'inhibition de l'oxydation des LDL, que ce soit pour les 7,8-dihydroxy ou les 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarines. En revanche à 10 μM , pour les deux séries de 4-méthylcoumarines, l'effet bénéfique de l'introduction de la chaîne ester en C3 est à nouveau observé.

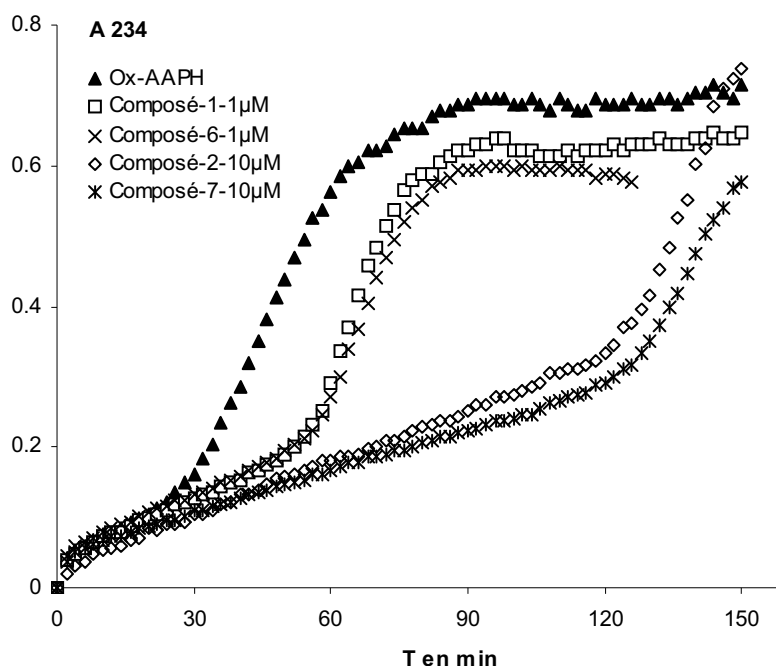


Figure-V-11. Oxydation des LDL initiée par le AAPH, [AAPH] = 4 mM en présence des composé 1 et 6 à 1 μ M et des composés 2 et 7 à 10 μ M. T = 37°C.

III.3 Conclusion

Les 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarines possèdent d'excellentes capacités de capture de radicaux quel que soit le test utilisé. Comme pour les flavonoïdes et acides hydroxycinnamiques, le noyau catéchol est d'une grande importance dans le pouvoir antioxydant. Dans l'inhibition de la peroxydation des LDL, les dérivés 7,8-diacétoxy, contrairement au dérivé diméthoxy, possèdent aussi un pouvoir antioxydant intéressant qui peut égaler celui de leurs homologues dihydroxy, validant ainsi la possibilité d'une désacétylation [11]. L'introduction en position C3 d'une chaîne éthoxycarbonyléthyle a un impact généralement favorable sur la capacité antioxydante quel que soit le test utilisé. L'origine de ce phénomène reste floue.

Contrairement aux coumarines non substituées en C4, les 4-méthylcoumarines présentent l'avantage de ne pas être métabolisées en intermédiaires époxydes toxiques. A terme, l'objectif est la mise au point de médicaments à base de coumarines non toxiques. Les résultats de ce chapitre sur le pouvoir antioxydant des 4-méthylcoumarines sont encourageants.

Références bibliographiques

1. Hoult JRS, Paya M. **Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential.** *General Pharmacology* 1996,27:713-722.
2. Cherng JM, Chiang W, Chiang LC. **Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids.** *Food Chemistry* 2008,106:944-950.
3. Parmar VS, Rathore JS, Singh S, Jain AK, Gupta SR. **Troupin, a 4-methylcoumarin from Tamarix-Troupii.** *Phytochemistry* 1985,24:871-872.
4. Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis DN. **Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities.** *Current Pharmaceutical Design* 2004,10:3813-3833.
5. Kostova I. **Synthetic and natural coumarins as antioxidants.** *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2006,6:365-374.
6. Lacy A, O'Kennedy R. **Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer.** *Current Pharmaceutical Design* 2004,10:3797-3811.
7. Paya M, Halliwell B, Hoult JRS. **Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species - Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals.** *Biochemical Pharmacology* 1992,44:205-214.
8. Finn GJ, Kenealy E, Creaven BS, Egan DA. **In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines.** *Cancer Letters* 2002,183:61-68.
9. Lin WL, Wang CJ, Tsai YY, Liu CL, Hwang JM, Tseng TH. **Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver.** *Archives of Toxicology* 2000,74:467-472.
10. Pedersen JZ, Oliveira C, Incerpi S, Kumar V, Fiore AM, De Vito P, *et al.* **Antioxidant activity of 4-methylcoumarins.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2007,59:1721-1728.
11. Raj HG, Parmar VS, Jain SC, Goel S, Poonam, Himanshu, *et al.* **Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part I: Dioxygenated 4-methyl coumarins as superb antioxidant and radical scavenging agents.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1998,6:833-839.
12. Liu ZQ, Yu W, Liu ZL. **Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein.** *Chemistry and Physics of Lipids* 1999,103:125-135.
13. Parmar VS, Bisht KS, Rajni J, Suddham S, Sharma SK, Suman G, *et al.* **Synthesis, antimicrobial and antiviral activities of novel polyphenolic compounds.** *Indian Journal of Chemistry. Section B, Organic including Medicinal* 1996,35:220-232.
14. Bors W, Michel C, Saran M. **Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin. A rapid test for quantifying antioxidant activity.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1984,796:312-319.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951,193:265-275.
16. Raj HG, Sharma RK, Garg BS, Parmar VS, Jain SC, Goel S, *et al.* **Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part 3: A novel mechanism for the inhibition of biological membrane lipid peroxidation by dioxygenated 4-methylcoumarins mediated by the formation of a stable ADP-Fe-inhibitor mixed ligand complex.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1998,6:2205-2212.
17. Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. **Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999,47:1453-1459.

18. Yeomans VC, Linseisen J, Wolfram G. **Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of human low density lipoproteins.** *Eur J Nutr* 2005,44:422-428.
19. O'Reilly JD, Sanders TAB, Wiseman H. **Flavonoids protect against oxidative damage to LDL in vitro: Use in selection of a flavonoid rich diet and relevance to LDL oxidation resistance ex vivo?** *Free Radical Research* 2000,33:419-426.
20. Miura S, Watanabe J, Sano M, Tomita T, Osawa T, Hara Y, Tomita I. **Effects of various natural antioxidants on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of low-density-lipoprotein.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1995,18:1-4.
21. Hou L, Zhou B, Yang L, Liu Z-L. **Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides.** *Chemistry and Physics of Lipids* 2004,129:209-219.
22. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. **Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties.** *Biochemical Journal* 1998,330:1173-1178.
23. Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C. **Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives.** *Free Radical Biology and Medicine* 1995,19:541-552.
24. Gomez-Ruiz JA, Leake DS, Ames JM. **In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007,55:6962-6969.
25. Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. **Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995,323:373-381.

ANNEXES
ANNEXE 1

Dosage des LDL, par la méthode de Lowry [15]

Une solution d'albumine (qualité A9647, PM = 66500 g.mol⁻¹, 96%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) à 0,2 mg/mL est utilisée comme standard. Les LDL isolés sont dilués au dixième.

Pour le dosage, on procède selon le tableau suivant :

Albumine (0,2 mg/mL) (μ L)	H ₂ O (μ L)	Solution C (μ L)		Solution E (μ L)	
5	95	1000	Attente 15 min	100	Lecture à 750 nm Attente 30 min
12,5	87,5	1000		100	
25	75	1000		100	
37,5	62,5	1000		100	
50	50	1000		100	
LDL (1/10) (μ L)					
10	90	1000		100	
20	80	1000		100	
Blanc					
0	100	1000		100	

Solution A : Na₂CO₃ 2% dans NaOH (0,1 N)

Solution B : CuSO₄ 0,5%, 5 H₂O dans le tartrate de sodium ou potassium 1%

Les solutions C et E sont à faire extemporanément

Solution C = 50 Vol solution A + 1 Vol solution B

Solution E = 1 Vol Folin + 1 Vol H₂O

Le réactif de Folin-Ciocalteu (F9252) provient de chez Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

« Toute avancée des connaissances génère autant d'interrogations qu'elle apporte de réponses »

Pierre Joliot, *La Recherche Passionnément*

CONCLUSION GENERALE

Le fil directeur de cette thèse est la modélisation chimique de l'oxydabilité des triglycérides dans l'estomac en fonction des agents pro-oxydants (diverses formes de fer alimentaire) et antioxydants (polyphénols, vitamine C et caroténoïdes) pouvant se combiner dans le bol alimentaire.

L'ingestion de lipides peut être vecteur d'espèces pro-oxydantes que sont, par exemple, les hydroperoxydes lipidiques et les aldéhydes issus de leur coupure, et ce avant toute activité oxydante intragastrique. Quant aux fruits et légumes, ils apportent des microconstituants antioxydants tels que les caroténoïdes, la vitamine C et les polyphénols. Dans ce compartiment, les microconstituants sont présents en fortes concentrations indépendamment de leur biodisponibilité. Ils pourraient ainsi exercer leurs effets bénéfiques, dès l'estomac, en inhibant l'oxydation lipidique et la formation d'espèces oxydées toxiques et pouvant être absorbées au travers de la paroi intestinale.

La plupart des tests antioxydants chimiques se bornent à mesurer la capacité d'un composé à céder des atomes d'hydrogène ou des électrons. Toutefois dans un milieu biologique tel que l'estomac, ces données ne peuvent à elles seules expliquer le pouvoir antioxydant des composés. D'autres éléments comme l'environnement gastrique (pH, température, O₂) et la composition du repas sont à prendre en compte pour déterminer la capacité antioxydante des microconstituants présents dans les aliments.

Les principaux objectifs de ce travail ont été : i) la modélisation chimique de l'environnement gastrique par l'élaboration d'émulsions de triacylglycérols stabilisées par des protéines ou des phospholipides, ii) l'étude de la stabilité des polyphénols au sein de ces émulsions, iii) l'évaluation de la capacité des polyphénols à inhiber l'autoxydation lipidique initiée par la metmyoglobine au sein des émulsions et iv) l'application de ce nouveau test doté d'une signification biologique à l'étude des capacités antioxydantes de fruits et légumes frais et appertisés.

Dans un premier temps, deux modèles chimiques de l'environnement gastrique constitués d'émulsions d'huile de tournesol dans l'eau et stabilisées soit par de la serum albumine bovine, soit par des phospholipides, ont été développés et caractérisés en granulométrie par le diamètre moyen des gouttelettes lipidiques. Différents composés phénoliques et antioxydants ont été introduits dans ces modèles en présence de metmyoglobine et d'autres espèces pro-oxydantes à des pH simulant différentes phases de la digestion. L'oxydation lipidique a été évaluée par le dosage de deux

marqueurs, les diènes conjugués, composés primaires d'oxydation, et les composés volatils issus de la décomposition de ces premières espèces. Le pH du milieu et la nature de l'émulsifiant sont les deux principaux facteurs modulant les vitesses d'oxydation lipidique et la stabilité des antioxydants. A pH 5,8, les polyphénols tels que la quercétine, la rutine, la (+)-catéchine, les acides caféique et chlorogénique ont fortement inhibé la peroxydation lipidique initiée par la metmyoglobine dans le modèle-SAB, contrairement à l' α -tocophérol et à la vitamine C. En revanche, dans le modèle-PL, l'inhibition a généralement été moins marquée sauf pour l' α -tocophérol (composé peu polaire) qui a vu son pouvoir antioxydant augmenter. Pour tous les composés, la baisse du pH (pH 4) a entraîné une forte diminution de l'activité antioxydante dans le modèle-SAB et plus encore dans le modèle-PL. Différents produits d'oxydation des polyphénols ont été identifiés. Certains possèdent également une capacité antioxydante prolongeant l'activité globale.

En parallèle de ces essais, d'autres études plus fondamentales ont été mises en place pour élucider les mécanismes des réactions mises en jeu dans les émulsions. Ainsi, les polyphénols, de nature polaire, exerceraient principalement leur action antioxydante à l'interface en réduisant directement l'espèce fer-oxo de l'hème activé (et partiellement dégradé) par les hydroperoxydes lipidiques. Parmi les polyphénols, la quercétine, en raison de son affinité relativement élevée pour la SAB, aurait un mode d'action original : la réduction du fer-oxo interviendrait au sein d'un complexe ternaire quercétine-albumine-metmyoglobine via des transferts d'électrons à longue portée. Plus généralement, en exposant directement les polyphénols au contact de la phase lipidique, l'albumine interfaciale contribuerait au pouvoir antioxydant des polyphénols. A pH 4, la globine et l'hème se dissocient. L'amorçage de la peroxydation par le seul cofacteur est plus rapide et l'accès des polyphénols à l'hème activé plus difficile, d'où la baisse du pouvoir antioxydant enregistré à ce pH.

Après validation des modèles sur des composés phénoliques individuels, le nouveau test a été appliqué à la mesure de la capacité antioxydante de purées et d'extraits phénoliques de fruits et légumes frais et appertisés. Les extraits phénoliques ont montré un meilleur pouvoir antioxydant que les purées, mettant en évidence l'impact de la matrice alimentaire sur la rétention des composés phénoliques. Le test ORAC effectué en parallèle n'a pas permis de discriminer les échantillons et s'est révélé inadapté aux matrices alimentaires. Enfin, pour se rapprocher des conditions physiologiques, nous avons incorporé à nos émulsions du suc gastrique humain contenant notamment de la lipase gastrique. Le suc gastrique n'a pas affecté les vitesses de peroxydation de l'émulsion mais a profondément abaissé le pouvoir antioxydant de la quercétine. Ce phénomène peut être dû à la complexation de la quercétine par les protéines du suc gastrique (en compétition avec la SAB) et à la

perte de la complexation quercétine-SAB qui maintiendraient la quercétine en phase aqueuse et ne lui permettrait plus d'exercer son effet protecteur à la surface de l'émulsion.

Cette étude a donc permis de développer un nouveau test de mesure du pouvoir antioxydant en conditions gastriques. Un indice antioxydant optimisé peut être obtenu par intégration des courbes exprimant la concentration des diènes conjugués en fonction du temps. Contrairement aux tests chimiques conventionnels, cet indice prend en compte non seulement la structure des composés phénoliques mais aussi leur environnement chimique (émulsions) et leurs interactions, notamment avec des protéines alimentaires, en le site même où ils semblent le plus susceptibles d'exercer une activité antioxydante, c'est-à-dire le compartiment gastrique. De ce point de vue, ce test est susceptible de fournir aux professionnels de l'industrie agro-alimentaire un indice antioxydant relativement simple mais cependant doté d'une signification biologique dont les tests classiques sont essentiellement dépourvus.

PERSPECTIVES

Au vu des résultats obtenus dans cette étude, de nombreuses perspectives sont envisageables.

Tout d'abord, pour continuer à se rapprocher des conditions biologiques, il apparaît judicieux de poursuivre les essais en présence d'enzymes digestives. Le suc digestif humain étant un produit rare et précieux, il peut être envisagé de se tourner vers des enzymes commerciales, lipases et protéases (pepsine). L'ajout d'enzymes de la salive (par exemple, l'amylase), susceptibles de modifier la structure du bol alimentaire et des composés phénoliques, serait également intéressant dans le modèle. Ces essais seraient à réaliser en présence de composés phénoliques puis d'aliments réels.

En outre, d'autres constituants alimentaires de type polysaccharide (amidon, pectines) en combinaison avec les enzymes associées à leur dégradation (amylase, pectinases) et pouvant modifier les phénomènes antioxydants pourraient compléter nos modèles. De même, il est envisageable de remplacer la SAB par d'autres protéines d'origine alimentaire comme la caséine (lait) et les globulines (céréales) et d'inclure également des protéines d'origine gastrique (mucines).

Par ailleurs, nos travaux suggèrent que des concentrations significatives de produits d'oxydation de microconstituants peuvent s'accumuler dans le tractus digestif. Il apparaît important de mieux connaître les propriétés (stabilité, interactions, pouvoir antioxydant) et la biodisponibilité de ces composés à ce jour largement négligés dans les études nutritionnelles.

Enfin, l'étude de l'oxydation lipidique du bol alimentaire dans les conditions intestinales serait une suite logique à ce travail. En effet, les produits d'oxydation lipidique atteignent généralement l'intestin pour y être absorbés. Cette perspective nécessiterait d'apporter différentes modifications aux modèles existants. Ainsi, l'environnement intestinal diffère de l'environnement gastrique de par son pH moins acide (6,1 - 6,6) et sa plus faible teneur en dioxygène qui amènerait à considérer d'autres formes de stress oxydant (stress induit par le fer alimentaire et le peroxyde d'hydrogène par exemple) pouvant être impliquées dans les cancers du tube digestif. L'ajout de sels biliaires (taurocholate de sodium) et la prise en compte de la lipolyse des triglycérides (formation de micelles mixtes) seraient également nécessaires.

Ces perspectives soulignent la complexité des mécanismes physiologiques se déroulant au cours des différentes étapes de la digestion d'un repas. Elles mettent ainsi l'accent sur la difficulté de

d'étudier ces phénomènes par des modèles chimiques simples. Notre modèle gastrique présage donc de nombreux autres travaux scientifiques à l'interface entre la chimie et la nutrition pour permettre une compréhension plus fine des mécanismes antioxydants *in vivo*.

Modélisation chimique du pouvoir antioxydant des polyphénols dans le compartiment gastrique
Inhibition de l'oxydation lipidique initiée par la metmyoglobine dans des émulsions stabilisées par la sérum albumine ou les phospholipides

Résumé

Les régimes alimentaires riches en fruits et légumes sont associés à une réduction du risque de maladies dégénératives. Les antioxydants d'origine végétale sont des médiateurs possibles de ces effets bénéfiques. Ils pourraient jouer un rôle clé dès le tractus digestif où ils peuvent s'accumuler en fortes concentrations après un repas. En effet, le compartiment gastrique, exposé à diverses espèces pro- et antioxydantes d'origine alimentaire, constitue un véritable bioréacteur. L'oxydation des lipides y est rapide et conduit à la formation de produits d'oxydation toxiques et biodisponibles. L'objectif de cette thèse est d'étudier l'oxydation lipidique initiée par la metmyoglobine dans des modèles chimiques de l'environnement gastrique ainsi que son inhibition par des polyphénols communs dans les aliments (quercétine, rutine, (+)-catéchine, acides caféique et chlorogénique) et des vitamines (α -tocophérol et acide ascorbique). L'oxydation d'émulsions modèles d'huile de tournesol dans l'eau et stabilisées soit par la sérum albumine bovine (SAB), soit par des phospholipides est suivie à pH 4 et 5,8 par l'accumulation des diènes conjugués et des composés volatils en l'absence et en présence des antioxydants. Les polyphénols (en particulier, la quercétine) sont de meilleurs inhibiteurs de l'oxydation lipidique que l' α -tocophérol et l'acide ascorbique. Le pH du milieu et la nature de l'émulsifiant sont les principaux facteurs modulant les vitesses d'oxydation lipidique et la stabilité des antioxydants. Différents produits d'oxydation, identifiés par analyse CLHP-SM, possèdent également une capacité antioxydante. Une étude par spectrofluorimétrie indique que l'oxydation des lipides affecte la SAB. La détermination des constantes d'affinité permet de montrer que la quercétine est presque totalement liée à la SAB tandis que la rutine est essentiellement sous forme libre. La SAB module l'activation de la metmyoglobine par les hydroperoxydes, étape clé dans l'initiation de la peroxydation. Les polyphénols agissent en réduisant les formes activées de la metmyoglobine à l'interface des gouttelettes lipidiques. L'addition de suc gastrique comprenant une lipase ne modifie pas l'oxydation lipidique mais diminue fortement l'activité antioxydante de la quercétine. Enfin, le modèle est appliqué à l'évaluation du pouvoir antioxydant de purées de fruits et légumes et de leurs extraits phénoliques. Un effet matrice négatif sur le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est démontré.

Mots-Clés : polyphénol, antioxydant, quercétine, peroxydation lipidique, émulsion, sérum albumine bovine (SAB), phospholipides, myoglobine, tractus gastro-intestinal

Chemical modelling of the antioxidant capacity of polyphenols in the gastric tract
Inhibition of lipid oxidation initiated by metmyoglobin in emulsions stabilized by serum albumin or phospholipids

Abstract

Diets rich in fruits and vegetables are associated with a lower incidence of degenerative diseases. Dietary antioxidants are possible mediators of these beneficial effects. They could play a key role within the gastric tract where they are accumulated in large concentrations after a meal rich in plant products. Indeed, the gastric tract, exposed to pro- and antioxidant species from the diet, can be regarded as an effective bioreactor. Lipid oxidation there can be quite fast and leads to the formation of toxic and bioavailable oxidation products. This work is aimed at studying lipid oxidation initiated by metmyoglobin in chemical models of the gastric content and its inhibition by dietary polyphenols (quercetin, rutin, (+)-catechin, caffeic and chlorogenic acids) and vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid). The oxidation of sunflower oil-in-water emulsions stabilized either by serum albumin (BSA) or phospholipids is monitored at pH 4 or 5,8 by the accumulation of conjugated dienes and volatile compounds in the presence or absence of antioxidants. Polyphenols (especially quercetin) are better lipid oxidation inhibitors than α -tocopherol and ascorbic acid. The pH and emulsifier are the main factors governing the oxidation rates and the antioxidant stability. Several oxidation products elucidated by HPLC-MS analysis also possess an antioxidant activity. A deeper investigation by spectrofluorimetry reveals that lipid oxidation could also affect BSA. The measurement of binding constants indicates that quercetin is mainly bound to BSA whereas rutin is essentially free. Moreover, the presence of BSA modulates the activation of metmyoglobin by hydroperoxides, a key-step in the initiation of the peroxidation process. Polyphenols act by reducing the activated myoglobin at the interface of lipid droplets. The addition of gastric juice, which includes a lipase, does not modify the lipid oxidation rates whereas the antioxidant activity of quercetin is altered. Finally, the model is used to investigate the antioxidant capacity of fruit and vegetable purees and phenolic extracts. A negative effect of the food matrix on the antioxidant capacity of phenolic compounds is demonstrated.

Keywords : polyphenol, antioxidant, quercetin, lipid peroxidation, emulsion, bovine serum albumin (BSA), phospholipids, myoglobin, gastro-intestinal tract