

Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante

Mickaël LAGUERRE
Luis Javier LÓPEZ-GIRALDO
Jérôme LECOMTE
Michel PINA
Pierre VILLENEUVE

CIRAD, Laboratoire de lipotechnie,
UMR 1208 Ingénierie des Agropolymères et
Technologies Emergentes,
34000 Montpellier
<villeneuve@cirad.fr>

Abstract: Oxidative degradation of lipids leads to quality deterioration of foods and cosmetics and has received increasing attention as a causative or associative factor in a variety of pathological conditions. A current very promising way to counteract lipid oxidation is to use vegetable antioxidants for nutritional, therapeutic or food quality preservation purpose. A major challenge is to develop analytical tools to assess the real antioxidant power of these molecules. In this way, many *in vitro* tests are now available, which monitor generally the inhibitory effect of antioxidant on the oxidative degradation of lipid or lipid-like substrate under natural or artificial oxidizing conditions. Overall, this measurement necessitates focusing either on the oxidizable substrate loss, or on the formation of oxidation products. To perform the first strategy, fluorophores such as *cis*-parinaric acid, BODIPY, and phospholipidic derivatives of fluorescein are often used, whereas the second employs usually linoleic acid, its methyl ester or natural lipids. After a brief recall of antioxidation mechanisms, this review presents a panorama of the available *in vitro* methodologies and of the last advances in this field. A comparative study between methods will be also discussed in terms of advantages and drawbacks.

Key words: antioxidants, antioxidant capacity, lipid oxidation, loss of substrate, appearance of oxidation products

Introduction

L'oxydation des lipides dans les systèmes biologiques par l'intermédiaire de réactions radicalaires en chaîne non contrôlées aboutit à de nombreux types de lésions cellulaires. Dans les membranes, l'oxydation des lipides et la réaction des produits d'oxydation avec les autres constituants membranaires vont altérer certaines fonctions biologiques cruciales telles que la perméabilité, la fluidité ou encore l'activité de récepteurs et d'enzymes [1]. Dans les LDL, l'oxydation des lipides joue un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose. Les LDL oxydés se comportent en effet comme de véritables « chevaux de Troie », en introduisant dans les macrophages des produits d'oxydation qui participent – par des mécanismes encore partiellement élucidés – à la formation de cellules spumeuses et de stries lipidiques concomitantes. L'oxydation des lipides pose également de sérieux problèmes pour les industries agroalimentaires et cosmétiques qui utilisent de plus en plus d'acides gras polyinsaturés, tels que ceux issus de la famille n-3 (ω -3), très sensibles à l'oxydation [1]. Dans le domaine alimentaire et au-delà de l'altération des qualités gustatives (rancissement) et nutritionnelles (pertes en vitamines et acides gras essentiels), l'oxydation des lipides en composés hautement réactifs et toxiques (lipoperoxyradicaux, malondialdéhyde...) représente un danger réel pour le consommateur.

Pour réguler ces réactions d'oxydation, l'organisme a développé ses propres systèmes de défense antioxydante. Parmi eux, les systèmes enzymatiques, notamment les superoxyde dismutases, les catalases, les glutathions peroxydases, ainsi que les systèmes thiorédoxines, sont reconnus comme étant les plus performants dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques regroupent quant à eux le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles œstrogéniques, l'acide urique, le coenzyme Q10 et l'acide lipoïque. En outre, nombre d'études s'accordent aujourd'hui sur l'importance de la contribution des antioxydants exogènes apportés par l'alimentation, dans la lutte contre les maladies associées au stress oxydant [2, 3]. Ces antioxydants, essentiellement d'origine végétale, sont apportés sous la forme de composés phénoliques (acides, esters et alcools phénoliques, flavonoïdes aglycones ou glycosylés, stilbènes, tocophérols, tocotriénols), d'acide ascorbique et de caroténoïdes (figures 1 à 4). Se pose alors la question de l'efficacité réelle de ces molécules et des outils nécessaires à leur évaluation.

La première difficulté est que l'activité antioxydante est relayée par une multitude de voies d'action parmi lesquelles figurent l'inhibition d'enzymes pro-oxydantes, la désactivation de l'oxygène singulet, la filtration des UV, la détoxification des ERO par voie enzymatique, la chélation des métaux de transition, ainsi que la stabilisation des ERO par cession d'un radical hydrogène. Ainsi, la complexité et la diversité des systèmes d'étude ont conduit au développement d'une multitude de tests, aucun d'entre eux ne présentant malheureusement un caractère universel [4].

Après un bref rappel théorique concernant les principaux mécanismes d'antioxydation, cette revue se propose d'aborder les différentes méthodes destinées à évaluer la capacité antioxydante. Une

Article reçu le 9 mai 2007
accepté le 28 septembre 2007

FONDAMENTAL

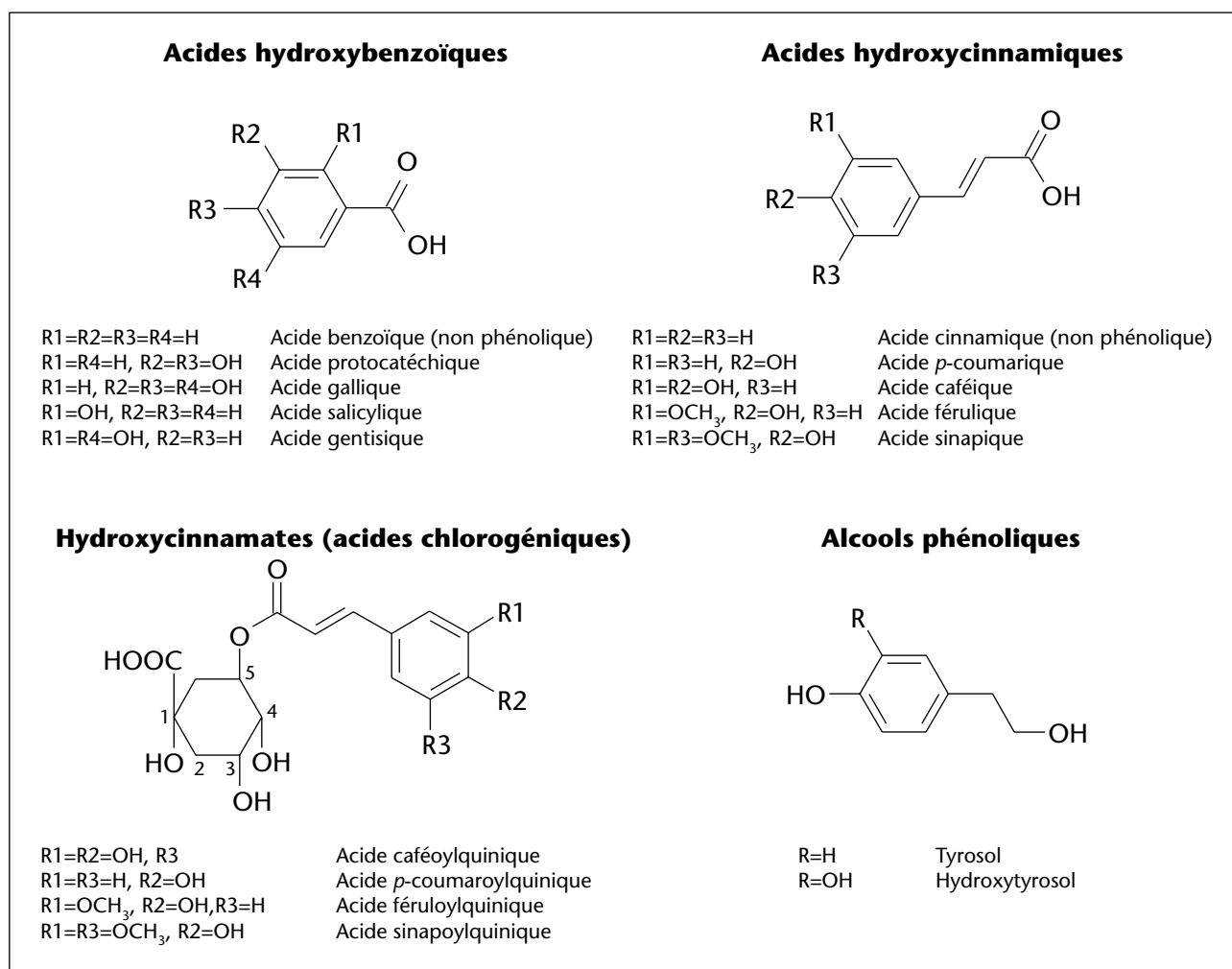


Figure 1. Principaux acides, esters et alcools phénoliques issus du règne végétal.

analyse comparative des principaux avantages et inconvénients des méthodes sera également présentée.

Mécanismes de l'action anti-oxydante retardeur versus briseur de chaîne

Les antioxydants peuvent agir contre l'oxydation de deux manières distinctes : soit en protégeant les lipides cibles des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la phase de propagation [5]. Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs (ou retardeurs), empêchent la formation ou piègent les ERO responsables de l'initiation de l'oxydation ($O_2^{\cdot-}$, 1O_2 ...). Dans le second cas, les antioxydants dits *briseurs de chaîne* interceptent les radicaux propagateurs de l'oxydation (lipoperoxyradicaux, ou LOO^{\cdot}) ou participent indirectement à l'interruption de l'oxydation radicalaire en chaîne.

Sur le plan cinétique, les antioxydants briseurs de chaîne induisent une phase de latence durant laquelle le substrat n'est pas notablement oxydé. Cette phase persiste tant que l'antioxydant n'est pas totalement consommé. Après la disparition complète de l'antioxydant, la vitesse de la peroxydation augmente très rapidement pour atteindre la même vitesse que lors de l'oxydation non inhibée. À l'opposé, un antioxydant retardeur est un composé qui réduit le taux de peroxydation en piégeant les radicaux impliqués dans la phase d'initiation de l'oxydation, ce qui se

traduit par un ralentissement plus ou moins continu du processus oxydatif, sans phase de latence distincte.

Bien que ces modes d'action soient abordés ici de manière séquentielle, les antioxydants agissent bien souvent par le biais de mécanismes d'action mixtes associant différents types d'antioxydation.

Mécanisme retardeur

La diversité des agents initiateurs de l'oxydation conduit à une multiplicité des voies d'antioxydation préventives : détoxification enzymatique des ERO, chélation de métaux de transition, désactivation de l'oxygène singulet, filtration des UV, inhibition des enzymes prooxydantes, cofacteurs d'enzymes antioxydantes...

– La détoxification des ERO constitue une voie de prévention primordiale de l'oxydation, principalement relayée par les systèmes antioxydants enzymatiques endogènes. Tout d'abord, la superoxyde dismutase, une métalloenzyme ubiquitaire chez les eucaryotes, catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Une autre enzyme, la glutathion peroxydase détoxifie le peroxyde d'hydrogène en accélérant la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique) par le peroxyde d'hydrogène, qui est alors réduit en eau. Une troisième enzyme, la catalase, a également comme substrat le peroxyde d'hydrogène qu'elle réduit en eau et en oxygène moléculaire. *In vivo*, il est classiquement admis qu'il existe une coopération

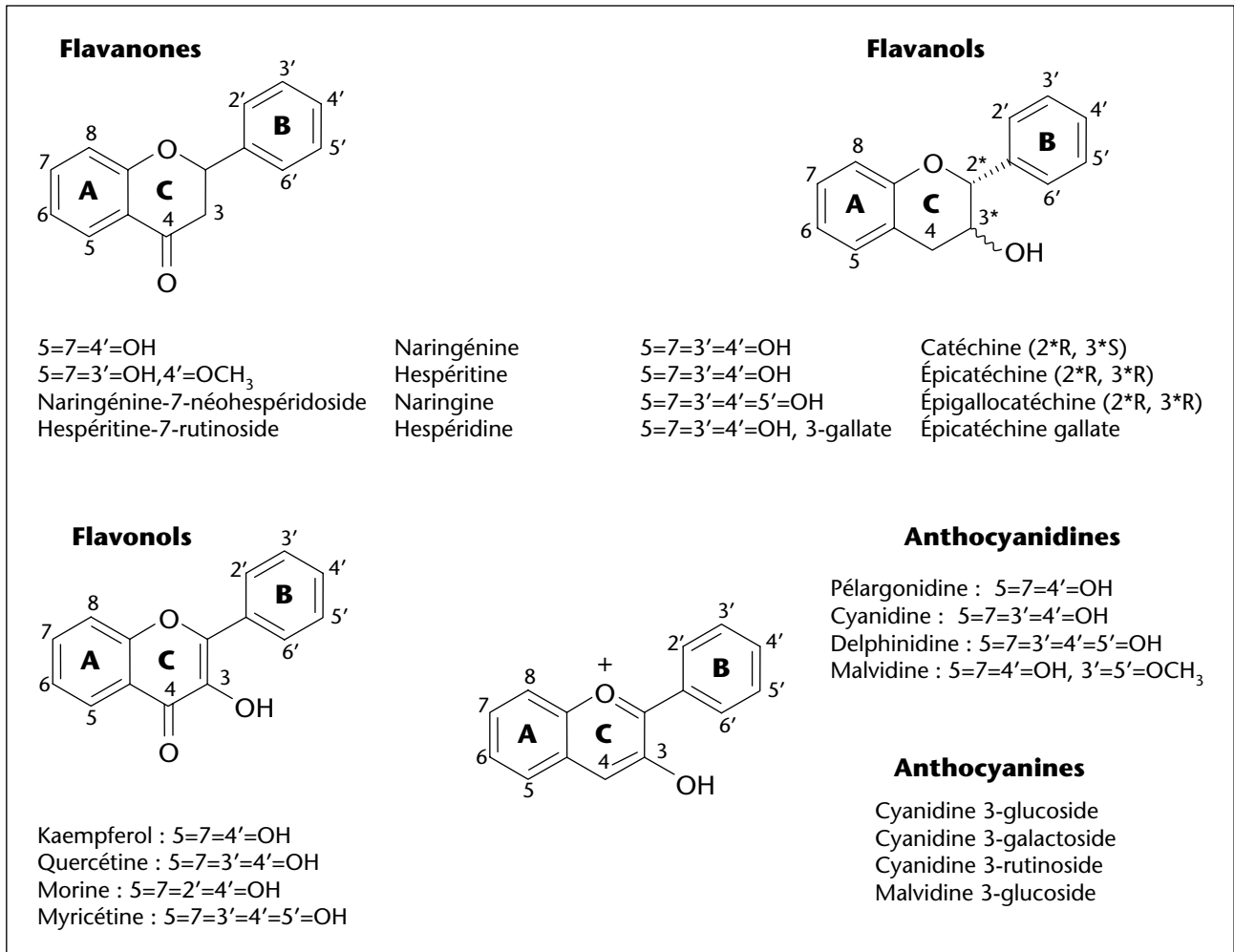


Figure 2. Principales classes de flavonoïdes aglycones ou glycosylés issues du règne végétal.

étroite entre ces différentes enzymes. Ainsi, l'activité superoxyde dismutase conduit à la formation de peroxydes d'hydrogène dont la détoxification est alors prise en charge par le système catalase et/ou glutathion peroxydase.

– Les chélateurs de métaux de transition comme le cuivre et le fer peuvent prévenir l'oxydation en formant des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Il s'agit de protéines telles que la transferrine, la ferritine, la lactalbumine qui séquestrent le fer, ou encore

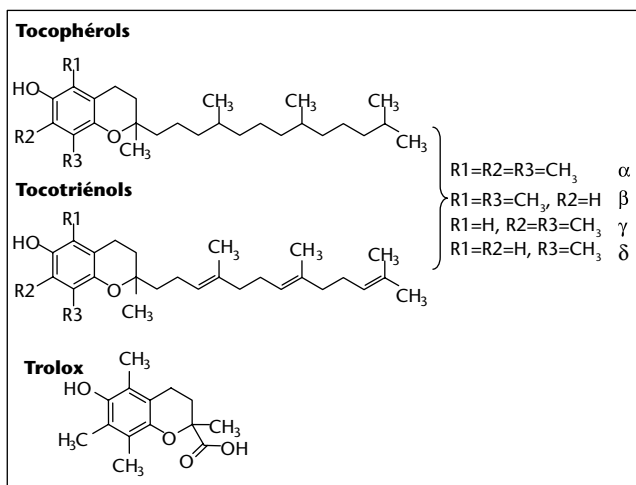


Figure 3. Structure chimique des tocophérols, des tocotriénols et du Trolox.

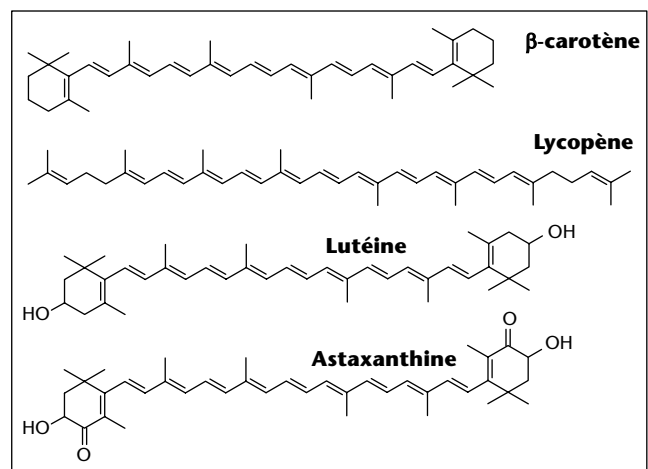
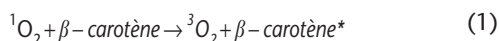


Figure 4. Principaux caroténoïdes anti-oxydants.

la céruloplasmine et l'albumine qui séquestrent le cuivre. Les polyphosphates, l'acide éthylènediaminetétracétique, l'acide citrique, les acides phénoliques et les flavonoïdes sont également connus pour leur capacité à chélater les métaux de transition. Il semblerait cependant que l'importance de ce type d'antioxydation dépende étroitement de la cible à protéger. Comparé à l'activité antiradicalaire par capture de ERO, ce mode d'action serait mineur dans l'inhibition de la peroxydation lipidique mais prédominant dans l'inhibition de la coupure oxydante des brins d'ADN [6].

– Les caroténoïdes sont, en l'état actuel de nos connaissances, les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet. Les caroténoïdes peuvent être des hydrocarbures purs appelés carotènes (lycopène, β -carotène...) ou posséder un groupement fonctionnel oxygéné et dans ce cas, s'appeler xanthophylles (astaxanthine, lutéine...) (figure 4). Comme nous le verrons plus loin, les caroténoïdes, comme nombre d'antioxydants, exercent une activité antioxydante par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes distincts bien que probablement complémentaires (i.e. antioxydant briseur de chaîne et piégeur d'oxygène singulet). Ce dernier mode d'action s'exerce par la désactivation de 1O_2 en 3O_2 (réaction 1).



Grâce au long système polyénique conjugué de ces molécules, l'excès d'énergie de leur état excité (β -carotène*) est dissipé au travers d'interactions vibrationnelles et rotationnelles avec le solvant ou leur environnement [7] (réaction 2).

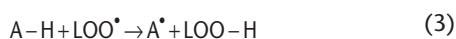


Par ce mécanisme de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, le β -carotène régénéré peut commencer un nouveau cycle de piégeage de l' 1O_2 et constitue par conséquent un piégeur non stœchiométrique. Il est estimé que chaque molécule de caroténoïde pourrait piéger environ 1 000 molécules de 1O_2 , avant de réagir chimiquement et de former un produit.

En dehors des caroténoïdes, il existe d'autres piégeurs d' 1O_2 , parmi lesquels nous citerons plus particulièrement les tocophérols et les thiols. Di Mascio *et al.* [8] ont ainsi étudié la capacité de certains antioxydants à piéger l' 1O_2 préalablement généré par la thermodynamique des endoperoxydes de 3,3'-(1,4-naphthylidène) dipropionate. Il s'est avéré que leur efficacité diminuait dans l'ordre suivant : lycopène, γ -carotène, bixine, zéaxanthine, lutéine, bilirubine, biliverdine, tocophérols et thiols. Ces auteurs soulignent cependant que les piégeurs les moins actifs sont paradoxalement les composés présents en plus grandes concentrations dans les tissus biologiques. Il en ressort que les caroténoïdes et les tocophérols contribueraient de façon égale à la protection tissulaire contre les effets délétères de l' 1O_2 , puisqu'on estime que les tocophérols sont environ 30 fois plus abondants que le β -carotène, *in vivo*.

Mécanisme briseur de chaîne

Dans le cadre de la peroxydation lipidique, cette catégorie d'antioxydants va le plus souvent céder un radical hydrogène (H^*) aux lipoperoxyradicaux propagateurs (LOO^* , réaction 3), interrompant ainsi la réaction de propagation radicalaire de l'oxydation.



Dans le règne végétal, il s'agit principalement de composés phénoliques mono- ou poly-hydroxylés (tocophérols, tocotriénols, flavonoïdes, acides, esters et alcools phénoliques, stilbènes...) possédant différents substituants sur le(s) noyau(x) aromatique(s). D'un point de vue théorique, la capacité du phénol à céder un atome d'hydrogène peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison O-H (*bond disso-*

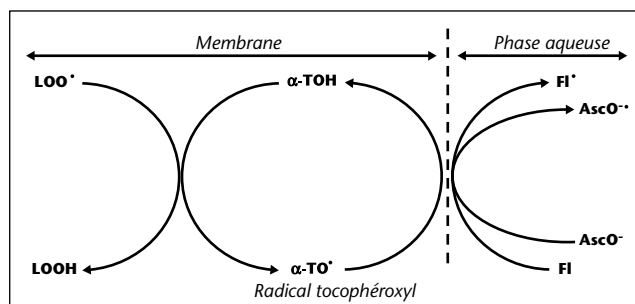


Figure 5. Mécanisme de régénération potentiel entre l' α -tocophérol (α -TOH), l'ascorbate ($AscO$) et les flavonoïdes (F) dans les systèmes membranaires (adapté d'après la référence [5]).

ciation energy, BDE)¹. Plus la BDE d'un phénol est faible, plus son caractère donneur d'atome H est élevé [6]. Ce facteur n'est cependant pas le seul à gouverner le caractère briseur de chaîne dont le déterminisme est multifactoriel. En effet, un positionnement favorable et une bonne mobilité vers les sites de production des LOO^* sont des attributs déterminants pour qu'un antioxydant soit un bon briseur de chaîne. Enfin, la réactivité du radical issu de l'antioxydant vis-à-vis des lipides insaturés est un paramètre à prendre en compte. Ce devenir est généralement gouverné par la capacité de l'antioxydant à stabiliser l'électron non apparié par délocalisation. De ce point de vue, la structure aromatique et la présence éventuelle de groupements encombrants confèrent aux radicaux phénoliques une bonne stabilité. *In vivo*, notons qu'il existe également des systèmes de régénération qui prennent en charge la réduction des formes radicalaires rémanentes, comme c'est le cas pour les tocophérols (figure 5).

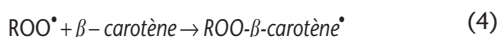
Les briseurs de chaîne les plus puissants connus à ce jour appartiennent sans conteste à la famille des tocophérols qui génère une phase de latence très distincte, notamment pour le vitamère α . De nombreuses études ont montré que ce briseur de chaîne piège deux molécules de peroxyradicaux [9, 10].

En théorie, la vitamine C et les polyphénols semblent également capables de réduire les peroxyradicaux [11]. Néanmoins, leur caractère hydrophile et leur éloignement de ces radicaux lipophiles semblent empêcher toute action directe par contact. Pour la vitamine C ou l'ascorbate ($AscO$, figure 5), il est maintenant bien établi qu'elle intervient au niveau de la régénération (réduction) du radical tocophéroxyl (α -TO*) dérivé du tocophérol (α -TOH), produisant une synergie entre les deux molécules. Ainsi, il y a plus de 60 ans, Golumbic et Mattil [12] rapportaient que la vitamine C exerçait (dans le lard et l'huile de coton) une phase de latence plus importante en présence de tocophérols que ne le laissait supposer la somme de leur phase de latence mesurée individuellement, excluant donc un simple effet additif. Par la suite, Tappel [13] fut le premier à suggérer qu'*in vivo* la vitamine C pouvait réduire le tocophérol oxydé, conduisant à un effet synergiste. Cette régénération, à la base du système de protection antiradicalaire des membranes biologiques et des LDL, est largement documentée aussi bien *in vivo* [14], qu'*in vitro* en solution organique [15], sur linoléate de méthyle [10], sur systèmes membranaires [16] ou sur LDL [17]. Théoriquement, la réduction du radical α -tocophéroxyl par l'ascorbate est rendue possible par le faible potentiel réducteur du couple redox associant l'acide ascorbique et sa forme oxydée (E^0 -0.28 V) par rapport à celui de l' α -tocophérol et du radical tocophéroxyl (E^0 -0.5 V).

¹ La BDE du phénol est seulement calculable lorsque ce dernier est sous forme protonée.

Concernant les polyphénols, il ressort de nombreuses études *in vitro* [18-24] qu'une substitution 1,2-dihydroxy ou structure catécholique sur le cycle B (figure 2) est le déterminant majeur de l'activité antioxydante des flavonoïdes en accord avec la faible BDE des groupements OH correspondants. En général, on explique la meilleure efficacité antioxydante des *ortho*-diphénols par la stabilisation du radical phenoxy AO* au moyen de la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire [6]. *In vivo*, il semble selon toute vraisemblance, que les flavonoïdes agissent de la même façon que l'acide ascorbique [25]. Cette voie d'action impliquerait la régénération du radical tocophéroxyl en tocophérol par l'oxydation du polyphénol en radical phénoxyl (figure 5). Sur le plan structural, Zhu *et al.* [26] ont montré que le groupe catéchol du cycle B est de prime importance pour régénérer l' α -tocophérol. En effet, parmi les quatre flavonols testés (kaempferol, morine, myricétine et quercétine, figure 2), il s'est avéré que la quercétine, qui est le seul flavonol à comporter une telle structure, est de loin le meilleur régénérateur. Cependant, dans notre laboratoire, certaines données encore non publiées laissent penser que cette capacité régénératrice n'est pas le seul apanage des flavonoïdes et qu'elle pourrait être rencontrée chez une grande majorité de composés phénoliques. Toutefois, contrairement au cas du radical ascorbyle, on ne connaît pas de système régénérateur du radical phénoxyle en phénol dans le règne animal [5].

Enfin, le transfert d'atome d'hydrogène à un radical libre propagateur tel que LOO* n'est pas le seul mode d'action des briseurs de chaîne. Sur ce plan, il semblerait que le mécanisme d'interruption de la peroxydation en chaîne du β -carotène s'exerce *via* d'autres voies d'action, comme la formation d'adduits. En effet, bien que le transfert d'hydrogène du β -carotène au peroxyradical soit thermodynamiquement possible, puisque la BDE de l'hydrogène le plus labile du β -carotène (309 kJ/mol) [27] est inférieure à celle de l'hydrogène du ROO-H (370-380 kJ/mol), l'hypothèse selon laquelle le β -carotène exercerait son activité antioxydante *via* un mécanisme d'addition (réactions 4, 5) a été avancé par de nombreux auteurs [28-30].



Black [31] a récemment proposé un mécanisme par lequel le β -carotène régènerait le radical tocophéroxyl, la réduction du radical issu du β -carotène étant prise en charge par l'acide ascorbique. Or, comme le souligne Léger [5], ce mode d'action est contredit par certaines données expérimentales indiquant que le β -carotène n'interagit pas avec le radical tocophéroxyl [32]. De telles études visant à comprendre le rôle du β -carotène *in vivo* prennent une importance considérable et pourraient contribuer à obtenir une vision cohérente du schéma d'interdépendance des antioxydants.

Il faut enfin rappeler que les interactions entre les antioxydants n'ont pas pour seul site les membranes biologiques et les lipoprotéines. Elles prennent notamment place dans la lumière du tube digestif, où leur étude, tenant compte de la variété des matrices alimentaires, doit être développée [5].

Méthodes existantes et nouvelles voies d'approche

De manière générale, les méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante s'articulent autour de quatre composantes : (i) un substrat oxydable dont la dégradation oxydative peut être suivie par des méthodes physico-chimiques ou sensorielles, (ii) un milieu, permettant la mise en contact des différentes composantes, (iii) des conditions d'oxydation, permettant d'oxyder le substrat, ainsi que (iv) des substances antioxydantes, dont on souhaite évaluer l'aptitude à protéger le substrat oxydable. Dans un tel système de test, la mesure du pouvoir antioxydant passe

nécessairement par l'évaluation du degré d'oxydation du substrat lipidique, en présence ou en absence d'une molécule ou d'un extrait végétal potentiellement antioxydant. Une stratégie de mesure idéale consisterait à évaluer de manière fiable et rapide les meilleurs marqueurs de l'oxydation, en termes de spécificité et de représentativité du processus oxydatif. Cependant, toute la difficulté à mettre en œuvre une telle méthode repose sur la complexité des mécanismes d'oxydation et d'antioxydation.

Concrètement, l'évaluation de la capacité antioxydante d'une molécule vis-à-vis d'un substrat lipidique peut se fonder sur quatre stratégies de mesure différentes : (i) déplétion en oxygène, (ii) disparition du substrat, apparition de produits d'oxydation (iii) primaire et/ou (iv) secondaires. Nous allons donc examiner dans ce chapitre les problèmes soulevés par cette évaluation et passer en revue, de manière non exhaustive, les tests les plus courants que nous classerons en fonction de la stratégie de mesure adoptée. Une mise en balance des avantages et inconvénients respectifs de chacune des méthodes abordées sera également discutée.

Déplétion en oxygène

L'étude cinétique de la consommation en oxygène permet de mesurer la durée de la phase d'initiation et son allongement en présence d'agents antioxydants. Les méthodes de mesure peuvent être manométriques ou gravimétriques par mesure de l'augmentation du poids consécutive à la fixation d'oxygène sur les acides gras [33]. Il est également possible de mettre en œuvre la chromatographie d'espace de tête, en mesurant l'absorption d'oxygène à l'aide d'un détecteur de type thermoconductimètre [34]. La méthode polarographique qui emploie une électrode de Clark reste cependant la plus communément employée. À titre d'exemple, Roginsky et Barsukova [35] ont utilisé cette méthode pour étudier la consommation en oxygène induite par la peroxydation en chaîne de micelles de linoléate de méthyle en système aqueux, l'oxydation du substrat lipidique étant induite par le 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) qui est un initiateur azo générant des peroxyradicaux à température modérée. Cette procédure a été appliquée pour déterminer la capacité antioxydante de vins rouges et blancs, de bières, de cafés solubles et de thés noirs et verts.

Cependant, la principale limite de l'électrode de Clark tient au fait qu'elle consomme elle-même de l'oxygène ce qui biaise les résultats, d'autant plus considérablement que l'oxygène est présent en très faible quantité. C'est notamment pour pallier ces inconvénients qu'a été développée la mesure optique de la consommation en oxygène. Les sondes de mesure basées sur ce principe sont alors appelées optodes. Bien que différentes approches aient été développées, les optodes comportent bien souvent une membrane polymérique recouverte de fluorophores qui une fois excités par une radiation (*via* une diode électroluminescente ou un laser) émettent une lumière de moindre énergie (phénomène de fluorescence) (figure 6A). Le principe de la mesure repose sur un piégeage dynamique de cette fluorescence par l'oxygène triplet. Ainsi, en présence d'oxygène, un transfert d'énergie a lieu entre le fluorophore excité et l'oxygène moléculaire, celui-ci transitant alors de son état fondamental (état triplet, $^3\text{O}_2$) à un état excité (état singulet, $^1\text{O}_2$) (figure 6B). En corollaire, le fluorophore n'émet pas de fluorescence, ce qui se traduit par une extinction de fluorescence [36]. Une relation existe alors entre la concentration en oxygène et (i) l'intensité de fluorescence ou (ii) la durée de fluorescence. Ces optodes présentent un grand intérêt en tant qu'alternative à l'électrode de Clark puisqu'elles ne consomment pas d'oxygène. D'autre part, la possibilité d'utiliser des optodes à sonde déportée et miniaturisable confère à ces dernières une grande facilité d'utilisation associée à une amélioration de la résolution spatiale. Notons enfin qu'il existe des applications à haut débit, sur lecteur de microplaques.

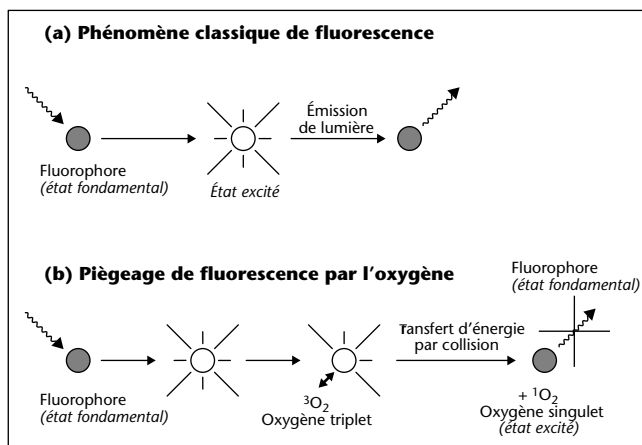


Figure 6. Principe du piégeage de fluorescence par l'oxygène moléculaire.

Disparition du substrat

Cette stratégie de mesure est fréquemment employée pour l'établissement du degré d'oxydation en système modèle simple (*i.e.* substrat unique et parfaitement caractérisé) ou en système complexe marqué (particules biologiques ou cellules vivantes marquées par un fluorophore). En d'autres termes, cette stratégie n'est pas très souple puisqu'elle impose de travailler avec un substrat lipidique donné, tout en présentant par ailleurs de multiples avantages. Mis à part quelques méthodes chromatographiques destinées à doser les substrats non oxydés résiduels, les méthodes adoptant cette stratégie impliquent généralement une mesure spectrale (tableau 1). En effet, les substrats oxydables utilisés dans ces tests présentent en majorité une structure polyénique conjuguée qui leur confère des propriétés d'absorption et/ou de fluorescence dans le spectre UV-VIS et qui permet de suivre leur dégradation oxydative.

Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco [37], puis légèrement modifiée par Miller [38]. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs [39] ou sous forme d'extraits végétaux [40, 41] induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. Elle présente également l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince [42]. Après séparation chromatographique, un mélange de β -carotène et d'acide linoléique est pulvérisé sur la plaque, celle-ci étant alors exposée plusieurs heures à la lumière du jour ou aux UV jusqu'à décoloration du fond jaune. Les bandes où la couleur jaune persiste, indiquent la présence de substances antioxydantes.

Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats. Pour contourner ce problème, certains auteurs ont remplacé la chaleur par des agents oxydants conduisant à des résultats plus reproductibles, comme l'AAPH [43] ou la lipoxygénase de soja [44]. Cette méthode est d'autre part sujette au parasitage de composés absorbants dans la fenêtre spectrale du β -carotène. Frankel [45] a également critiqué l'utilisation d'acides gras libres qui ne représentent pas des modèles lipidiques réalistes. Enfin, l'interprétation des données n'est pas aisée car

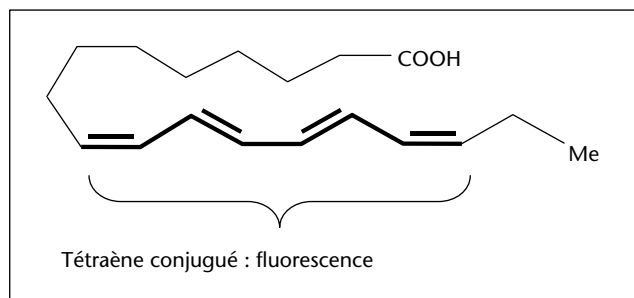


Figure 7. Structure chimique de l'acide cis-parinarique issu de *Parinari glaberrimum*.

le β -carotène est lui-même un antioxydant, sensible à l'oxygène de surcroît.

Chute de fluorescence de l'acide cis-parinarique

En 1987, Kuypers *et al.* [46] ont montré l'intérêt d'utiliser l'acide cis-parinarique comme sonde fluorescente pour évaluer le degré de peroxydation lipidique en système membranaire. L'acide cis-parinarique ou acide 9-cis,11-trans,13-trans,15-cis(octadécatétraénoïque) est un acide gras polyinsaturé comportant quatre doubles liaisons conjuguées (figure 7). Ce tétraène conjugué linéaire confère à la molécule de fortes propriétés de fluorescence ($\lambda_{ex/em}$: 320/432 nm), ainsi qu'une sensibilité accrue aux attaques des radicaux libres par rapport à la plupart des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés. Le point essentiel à retenir est que la fluorescence de l'acide cis-parinarique est irréversiblement perdue lors de son oxydation, ce qui a conduit au développement de nombreux tests utilisant ce substrat. Par ailleurs, l'acide cis-parinarique peut être intégré par voie métabolique aux structures membranaires de divers types cellulaires, permettant d'améliorer la sensibilité de détection des processus oxydatifs dans ces structures hautement organisées. De ce fait, l'acide cis-parinarique a, entre autres, été utilisé pour mesurer la peroxydation lipidique dans les érythrocytes [47, 48], les particules submitochondriales [49], le reticulum sarcoplasmique [50], les macrophages [51], les cardiomyocytes [52, 53] et certaines cellules leucémiques humaines [54]. Cette méthode a également été employée pour mesurer la capacité de différentes substances à protéger des LDL [55] ou des liposomes [56] marqués par de l'acide cis-parinarique (tableau 1). À titre d'exemple, Osaka *et al.* [57] ont déterminé l'aptitude de l'amphotéricine B à contrer la peroxydation de l'acide cis-parinarique en complexe avec l'albumine de sérum humain ou incorporé dans des liposomes, l'initiation de l'oxydation du complexe étant assurée par l'AAPH, celle du système liposomal par le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (AMVN). Laranjinha *et al.* [58] ont, quant à eux, étudié en termes de relation structure-activité, la capacité antioxydante de différents composés phénoliques alimentaires vis-à-vis d'acide cis-parinarique incorporé dans des particules de LDL et oxydé par de l'AAPH.

Entre autres avantages, l'acide cis-parinarique est biomimétique et ne perturbe pas la bicouche lipidique. Il présente de plus un très large déplacement de Stokes² (~ 110 nm). Enfin, la possibilité de l'incorporer par voie métabolique au sein des phospholipides membranaires de cellules en culture fait de l'acide cis-parinarique une sonde membranaire particulièrement bien adaptée à la détection des stades initiaux de la peroxydation lipidique [52-54].

En termes d'inconvénients, l'acide cis-parinarique est sensible à l'air et est susceptible de se photodimériser sous la lumière d'excitation, entraînant

² Différence en longueur d'onde (ou en fréquence) entre la position du pic du spectre d'absorption et celle du pic du spectre d'émission de la même transition électronique.

Tableau 1. Quelques méthodes fondées sur la disparition du substrat et sur l'apparition des produits d'oxydation.

Substrat oxydable	Méthode analytique	Conditions expérimentales	Ref
Émulsion d'acide linoléique et de β -carotène	Spectrophotométrie à 450 nm	Eau + Tween 40/50°C	[37]
	Spectrophotométrie à 470 nm	AAPH ^a /Émulsion/32°C	[43]
	Spectrophotométrie à 460 nm	Lipoxygénase de soja type 1-S/Tampon (pH 7)/25°C	[44]
Liposomes marqués au cPnA ^b	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 324/413 nm)	CuSO ₄ +H ₂ O ₂ /150 mM NaCl, 10 mM tampon Tris-HCl (pH 7,4)/25°C	[46]
LDL marqués au cPnA	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 324/413 nm)	AAPH/110 mM NaCl, 20 mM tampon phosphate (pH 7,4)/37°C	[55]
Cardiomyocytes marqués au cPnA	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 304/413 nm)	Hydroperoxyde de cumène /Tampon (pH 7,4)/37°C CuSO ₄ + H ₂ O ₂ / Tampon (pH 7,4)/37°C AAPH/Tampon (pH 7,4)/37°C	[53]
Érythrocytes marqués au C ₁₁ -fluor ^c	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 500/520 nm) et cytométrie de flux (λ_{ex} : 488 nm)	Hydroperoxyde de cumène	[62]
Érythrocytes marqués au fluor-DHPE ^d	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 488/520 nm) et cytométrie de flux (λ_{ex} : 488 nm)	Benzoyl peroxyde ou Hydroperoxyde de cumène	[63]
C ₁₁ -BODIPY ^{581/591e}	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 570/600 nm)	AMVN ^f /Octane:butyronitrile (9:1, v:v)/41°C	[61]
Liposomes marqués au C ₁₁ -BODIPY ^{581/591}	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 540/600 nm)	AMVN/Tampon 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)/42°C	[61]
C ₁₁ -BODIPY ^{581/591}	Fluorimétrie (λ_{ex} : 488 nm ; spectre d'émission : 500-700nm)	MeO-AMVN ^g ou AAPH /Éthanol/37°C CuSO ₄ + Hydroperoxyde de cumène/Éthanol/37°C CuSO ₄ + H ₂ O ₂ /Éthanol /37°C Peroxynitrite/Éthanol/37°C	[67]
BODIPY ^{665/676 h}	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 620/675 nm)	AMVN/Octane:butyronitrile (9:1, v:v)/39°C	[71]
	Fluorimétrie ($\lambda_{ex/em}$: 600/700 nm)	AMVN/Tampon 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)/39-41°C	[71]
Émulsion d'acide linoléique	Spectrophotométrie à 234 nm	AAPH/SDS ⁱ + tampon phosphate à 50 mM (pH 7,4)/40°C	[79]
Viande pré-cuite	SHS-GC ^j (mesure du pentane et de l'hexanal)	120°C	[97]
Homogénéisats de foies de rats	SHS-GC (mesure de l'hexanal et des volatils totaux)	37°C	[96]
Huile de colza décolorée	SPME-GC-MS ^k (mesure des volatils totaux)	Fibre de polydiméthylsiloxane/80°C	[103]

^a AAPH : 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride.

^b cPnA : acide *cis*-parinarique.

^c C₁₁-fluor : 5-(N-dodécanyl)aminofluorescéine.

^d Fluor-DHPE : dihexadécanylglycérophosphoéthanolaminofluorescéine.

^e C₁₁-BODIPY^{581/591} : acide 4,4-dichloro-5-(4-phényl-1,3-butadiényl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-undécanoïque.

^f AMVN : 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile).

^g MeO-AMVN : 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile).

^h BODIPY^{665/676} : 4,4-difluoro-3,5-bis(4-phényl-1,3-butadiényl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène.

ⁱ SDS : dodécyl sulfate de sodium.

^j SHS-GC : espace de tête statique-chromatographie en phase gazeuse.

^k SPME-GC/MS : microextraction en phase solide-chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse.

ainsi une perte de fluorescence qui peut conduire à une surestimation du degré d'oxydation [59-61]. Qui plus est, l'acide *cis*-parinarique absorbe dans le spectre ultraviolet à 320 nm, fenêtre spectrale dans laquelle de nombreux composés et en particulier les flavonoïdes absorbent également. Concrètement, les résultats peuvent être faussés si la molécule interférente, ici le flavonoïde, absorbe tout ou partie des photons d'excitation et/ou d'émission.

Cytométrie de flux et fluorescéines lipophilisées

En partant du principe que la fluorimétrie permettait seulement d'étudier la peroxydation lipidique sur une large population cellulaire, sans donner accès à l'échelle de la cellule, Makrigiorgos *et al.* [62] ont développé une méthode fondée sur la cytométrie de flux. Pour cela, la 5-(N-

dodécanyl)aminofluorescéine (C11-fluor, *figure 8A*), un dérivé lipophile de la fluorescéine commercialement disponible a été incorporé au sein de membranes d'érythrocytes. L'oxydation de la C11-fluor induite par l'hydroperoxyde de cumène, s'accompagne d'une extinction graduelle de fluorescence. Dans ce test, le Trolox (équivalent hydrophile de l' α -tocophérol, *figure 3*) ou l' α -tocophérol inhibent clairement la peroxydation lipidique lorsqu'ils sont incubés avec les cellules, comme en témoigne le ralentissement continu de la cinétique d'extinction de fluorescence. Cependant, la condition *sine qua none* pour une application courante de cette méthode à la détection de l'oxydation de sous-populations cellulaires spécifiques est que la sonde fluorescente ne soit pas échangeable d'une cellule à l'autre. En effet, si l'échange peut avoir lieu, la différence de peroxydation entre les cellules ne pourra pas être

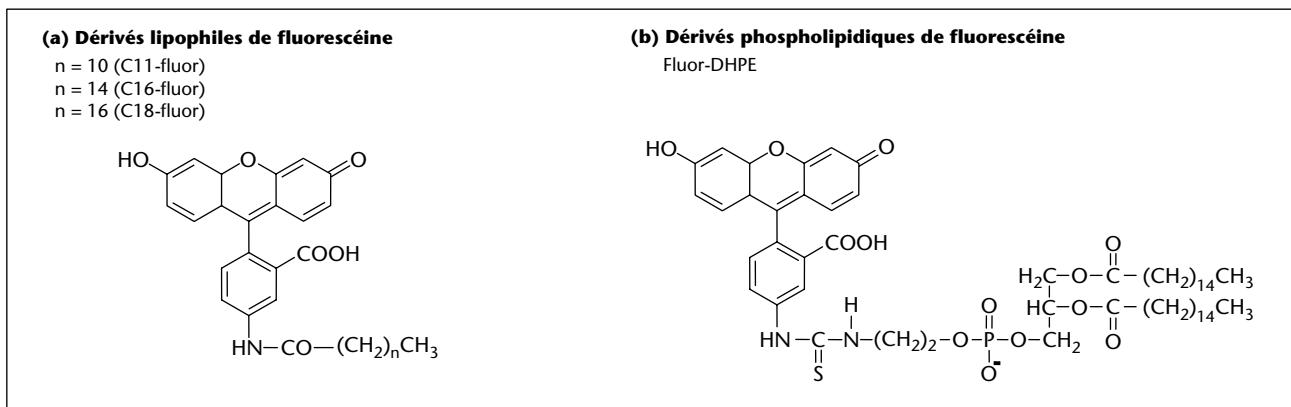


Figure 8. Structure chimique des dérivés lipophiles (A) et phospholipidiques (B) de la fluorescéine.

détectée. Dans cette optique, Maulik *et al.* [63] ont examiné et comparé quatre fluorescéines lipophilisées : la C11-fluor, la 5-hexadécanylaminofluorescéine (C16-fluor) et la 5-octadécanylaminofluorescéine (C18-fluor) et la dihexadécanylglycérophosphoéthanolaminofluorescéine (fluor-DHPE) (figure 8). Parmi elles, seule la fluor-DHPE s'est avérée être une sonde non échangeable. Cette méthodologie a par la suite été appliquée à l'étude de l'efficacité antioxydante de l' α -tocophérol et des acides ascorbique et urique vis-à-vis des membranes cellulaires d'érythrocytes marquées au C11-fluor et oxydées par l'hydroperoxyde de cumène [64]. Les résultats indiquent que l' α -tocophérol est l'antioxydant le plus efficace, mais également que l'ascorbate stoppe la propagation en chaîne, probablement par un mécanisme de recyclage redox du radical tocophéroxyl. En 2004, Amer *et al.* [65] ont utilisé la fluor-DHPE pour marquer les membranes d'érythrocytes de donneurs normaux et de patients thalassémiques (maladie génétique liée à une déficience de la synthèse de l'hémoglobine). La mesure du degré de l'oxydation induite par H_2O_2 a été réalisée par cytométrie de flux et a montré que les cellules des patients thalassémiques y étaient plus sensibles.

En termes d'avantages, la longueur d'onde d'excitation de ces sondes (488 nm) semble particulièrement bien adaptée à la fois aux cellules mais également à une utilisation courante en cytométrie de flux qui utilise généralement un laser émettant à cette même longueur d'onde. En outre, la fluor-DHPE mime relativement bien les lipides membranaires. Globalement, la méthode en donnant accès à l'échelle de la cellule individuelle ou de la sous-population est un outil, certes coûteux et complexe à mettre en oeuvre, mais particulièrement précieux pour les chercheurs. À notre connaissance, le seul inconvénient que l'on puisse relever est que cette méthode a été employée uniquement sur des érythrocytes. Il serait souhaitable à l'avenir de confirmer que la fluor-DHPE est une sonde suffisamment sensible pour être utilisée avec d'autres types cellulaires.

Chute de fluorescence du BODIPY

Cette méthode fluorimétrique a initialement été développée en utilisant comme substrat oxydable, l'acide 4,4-difluoro-5-(4-phényl-1,3-butadiényl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-undécanoïque (C11-BODIPY^{581/591}) [61]. Cet analogue d'acide gras fluorescent (figure 9) au sein duquel le motif BODIPY est connecté au groupement phényl par l'intermédiaire d'un diène conjugué - qui agit comme un pont de résonance - exhibe une fluorescence rouge, caractérisée par une émission maximale dans la gamme spectrale de 591-595 nm. Le nombre de doubles liaisons conjuguées rend ce substrat particulièrement oxydable par les peroxyradicaux. Il a été mesuré que la vitesse de réaction entre le C11-BODIPY^{581/591} et les peroxyradicaux est environ deux fois plus élevée que celle entre les lipides polyinsaturés et ces radicaux. L'oxyda-

tion du C11-BODIPY^{581/591} se traduit par l'extinction progressive du signal fluorescent. Le principe de la méthode, telle que développée par Naguib [61], consiste à évaluer la capacité de molécules antioxydantes à protéger le C11-BODIPY^{581/591} de l'attaque des peroxyradicaux générés par l'AMVN à une température avoisinant les 40 °C. La capacité antioxydante se traduit alors par l'apparition d'une phase de latence plus ou moins marquée en fonction de la quantité d'antioxydants briseurs de chaîne. Pour cela, Naguib a utilisé deux approches complémentaires : (i) soit le C11-BODIPY^{581/591} est directement solubilisé dans un milieu organique apolaire constitué d'octane et de butyronitrile (9 : 1, v : v), (ii) soit cette sonde est incorporée dans des liposomes de dioléoylphosphatidylcholine mis en suspension aqueuse. Dans les deux cas, le Trolox a été utilisé comme molécule antioxydante de référence et l'information a été extraite des données analytiques par l'intermédiaire du calcul de l'aire sous la courbe. Aldini *et al.* [66] ont par la suite adapté la méthode à la détermination de l'oxydabilité des compartiments aqueux et lipidiques du plasma. Pour suivre l'oxydation dans ce dernier, le 2,2'azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile) (MeO-AMVN) et le C11-BODIPY^{581/591} ont été utilisés, tandis que pour le plasma aqueux l'étendue de l'oxydation a été déterminée en utilisant l'AAPH et la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine.

L'un des avantages de la méthode est que l'oxydation de cette sonde par divers agents oxydants, ainsi que la nature des produits obtenus en

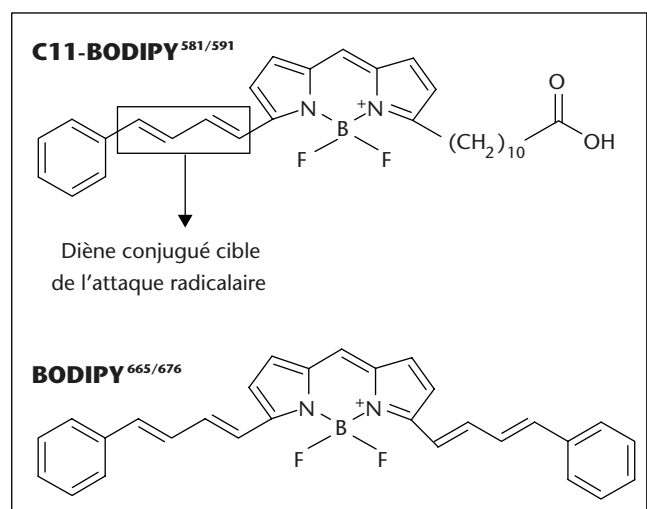


Figure 9. Structure chimique des sondes fluorescentes C11-BODIPY^{581/591} et BODIPY^{665/676}.

relation avec leurs spectres de fluorescence, sont relativement bien documentées [67]. Ainsi, le diène conjugué (figure 9) a été caractérisé comme étant la cible privilégiée de l'oxydation du C11-BODIPY^{581/591}. De plus, cette méthodologie peut être appliquée sur lecteur de micro-plaques pour une analyse à haut débit, mais également en cytométrie de flux, permettant ainsi d'avoir accès à des sous-populations cellulaires [68]. Concernant les inconvénients, Huang *et al.* [69] ont montré que la sonde C11-BODIPY^{581/591} peut perdre 30 % de sa fluorescence en absence d'AMVN, ce qui suggère, à l'instar de l'acide *cis*-parinarique, une certaine photosensibilité à la longueur d'onde d'excitation. Ce résultat est troublant puisque de nombreuses études ont montré que cette sonde est photostable dans les conditions d'analyse classique de fluorimétrie [61, 70].

Notons enfin que d'autres dérivés du BODIPY ont été utilisés. Ainsi Naguib [71] a testé la faisabilité de la méthode en remplaçant le C11-BODIPY^{581/591} par le BODIPY^{665/676} (figure 9). Entre autres avantages, le BODIPY^{665/676} est plus facilement oxydable que le C11-BODIPY^{581/591} en raison de l'extension du système polyénique conjugué ce qui nécessite moins d'AMVN. De plus, son déplacement de Stokes (15 nm) est légèrement plus grand que celui du C11-BODIPY^{581/591} (10 nm).

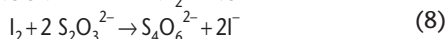
Apparition des produits primaires d'oxydation

À l'opposé de la stratégie de mesure fondée sur la disparition du substrat, celle reposant sur l'apparition des produits d'oxydation (primaires ou secondaires) semble adaptée à l'étude de tous types de systèmes lipidiques tels que les systèmes modèles, les aliments ou les échantillons biologiques extraits de leur environnement. Ainsi, bien qu'il n'existe pas de marqueurs universels, l'oxydation des systèmes complexes génère certains produits d'oxydation détectables par des méthodes physico-chimiques.

Concernant les produits d'oxydation primaires, les hydroperoxydes sont considérés comme étant ceux qui fourniraient l'information la plus pertinente sur l'intensité de la lipoperoxydation. La mesure des hydroperoxydes est probablement l'approche ayant suscité le plus grand nombre de développements. Nous aborderons dans ce chapitre les principales techniques de dosages de ces produits.

Mesure des hydroperoxydes

L'une des méthodes classiques et normalisées pour quantifier les hydroperoxydes totaux et le peroxyde d'hydrogène correspond au titrage iodométrique [72]. Il s'agit de la méthode la plus ancienne et la plus communément utilisée pour suivre l'oxydation d'un substrat lipidique. En milieu acide, les hydroperoxydes (réaction 6) et les ROOR (réaction 7) réagissent avec l'ion iodure, pour générer de l'iode qui est titré par une solution de thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon (réaction 8).



L'indice de peroxyde (IP) est alors défini comme étant la quantité d'oxygène actif, exprimée en mg, contenue dans 1 g de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. L'IP atteindra un maximum durant la phase de propagation, puis diminuera lors de la phase de terminaison pour laquelle la cinétique de décomposition des hydroperoxydes est plus importante que celle de leur formation. Il faut souligner que cette méthode présente cependant un certain nombre d'inconvénients. Ainsi, l'IP est une mesure exploitable uniquement pour des échantillons dont l'autoxydation n'a pas atteint un stade trop avancé et sous des conditions de température suffisamment douces pour éviter la décomposition des hydroperoxydes. De plus, l'exposition à la lumière, l'absorption d'iode par les acides gras insaturés et la formation

d'iode par oxydation des ions iodures en présence de l'oxygène de l'air interfèrent et peuvent conduire à une sous- ou une surestimation selon les cas [45]. D'autre part, si cette méthode est relativement simple à mettre en œuvre en système anhydre de type « *bulk oil* », il en est tout autrement des milieux émulsionnés, alimentaires ou biologiques, pour lesquels l'eau s'avère rédhitoire. Dans ces trois cas, il est alors nécessaire de réaliser préalablement une extraction quantitative, sélective et non altérante des lipides, ce qui suppose un certain nombre de précautions pour éviter tout stress oxydatif. Pour les émulsions, deux stratégies sont envisageables : (i) briser l'émulsion par augmentation de la force ionique ou par centrifugation, (ii) ou procéder à une extraction liquide/liquide des lipides suivie d'une élimination du solvant d'extraction par évaporation. En terme d'inconvénients, l'extraction des lipides effectuée en présence d'oxygène peut elle-même générer des hydroperoxydes parfois même en plus grande quantité que ceux originellement présents. Il est de plus préférable d'extraire les lipides à froid par un mélange méthanol/chloroforme, selon la méthode de Folch préconisée pour les lipides des tissus animaux. D'autre part, l'élimination du solvant à haute température entraîne une décomposition significative des peroxydes. La méthode couramment employée consiste à utiliser une évaporation du solvant d'extraction sous pression réduite. Bien que ces difficultés ne soient pas insurmontables, la mesure de l'IP dans les émulsions, les aliments et les échantillons biologiques est grandement freinée par l'aspect discontinu et par les interférences qu'elle implique. Pour toutes ces raisons, des méthodes alternatives ont été développées. Parmi elles, citons les méthodes colorimétriques au thiocyanate [73, 74] ou au xylénol orange [75], la mesure enzymatique par la glutathion peroxydase [76] ou encore la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier [77].

Détermination ultraviolette des diènes conjugués

En 1931, Gillam *et al.* [78] démontrent que les graisses naturelles développent un pic d'absorption proche de 230-235 nm durant le stockage. En fait, plus de 90 % des hydroperoxydes formés par lipoperoxydation présentent un système diénique conjugué résultant d'une stabilisation de l'état radicalaire par réarrangement des doubles liaisons. Ces composés relativement stables absorbent dans le spectre ultraviolet (235 nm) et sont donc quantifiables par spectrophotométrie d'absorption. Toute substance contenant des acides gras polyinsaturés peut servir de substrat oxydable pour cette méthode puisque les diènes conjugués ne peuvent se former qu'à partir d'acides gras comportant au moins deux doubles liaisons, comme l'acide linoléique.

Il serait illusoire de vouloir établir une liste, même partielle, des études réalisées avec cette méthode, aussi nous bornerons-nous à quelques exemples. En 1993, Pryor *et al.* [79] ont évalué la capacité antioxydante de composés synthétiques et naturels, en mesurant leur influence sur la cinétique d'apparition des diènes conjugués formés par l'oxydation (AAPH) de micelles d'acide linoléique en milieu aqueux (tableau 1). Entre autres avantages, ces auteurs reportent que cette stratégie de mesure est plus sensible que celle basée sur la consommation d'oxygène. L'activité antioxydante de baies, de fruits, de vins et de liqueurs a été comparée par cette méthode en utilisant le linoléate de méthyle comme substrat [80]. Enfin, la mesure des diènes conjugués est très fréquemment employée pour mesurer l'oxydabilité des LDL *in vitro*. À titre d'exemple, Gordo *et al.* [81] ont observé que l'apport d' ω -3 diminuait la susceptibilité oxydative des LDL mesurée par le taux d'apparition et la quantité totale de diènes conjugués, en comparaison d'un apport d' ω -6³.

Bien que la méthode des diènes conjugués puisse être employée pour mesurer la peroxydation lipidique de manière continue, elle souffre

³ Il est toutefois à noter que l'influence des ω -3 sur l'oxydabilité des LDL est loin d'être élucidée.

néanmoins du fait que le pic d'absorption des diènes conjugués apparaît souvent comme un épaulement d'une large bande générée par les lipides non oxydés [82]. Pour pallier ce manque de résolution, plusieurs auteurs ont utilisé la dérivation seconde dans l'évaluation d'huiles végétales, de lipides alimentaires ou d'échantillons biologiques [83-85]. D'autre part, la mesure directe des diènes conjugués dans les tissus ou les fluides biologiques est bien souvent irréalisable puisque de nombreux autres substances absorbant dans cette région spectrale sont présentes, comme les protéines hémiques, la chlorophylle, les purines et les pyrimidines. Les composés susceptibles d'interférer doivent donc être identifiés de manière à corriger autant que possible ce biais expérimental. De plus, l'extraction des lipides par l'intermédiaire d'un solvant organique avant l'analyse est une approche systématique qui peut permettre de contourner ce problème de parasitage. D'autre part, à l'instar de la mesure de l'IP, il importe que cette réaction d'oxydation n'ait pas atteint un stade avancé et que les conditions opératoires soient suffisamment douces afin de limiter la décomposition des hydroperoxydes. Malgré ces inconvénients, nous pensons que la mesure des diènes conjugués reste de loin la méthodologie la plus adaptée et la plus simple pour accéder aux produits d'oxydation primaire, pour peu que certaines précautions opératoires aient été prises et que les données aient été interprétées avec vigilance.

Apparition des produits secondaires d'oxydation

De la même manière que pour la stratégie de mesure fondée sur l'apparition des produits d'oxydation primaire, celle concernant les produits secondaires semble adaptée à l'étude de systèmes lipidiques modèles, mais également de lipides réels extraits de leur environnement naturel (microsomes, LDL...). Nous allons aborder dans cette partie les deux tests les plus communément employés dans la recherche et l'industrie.

Test à l'acide thiobarbiturique (TBA)

En 1944, Kohn et Liversedge [86] observent que les tissus animaux incubés en aérobiose se colorent en présence d'acide 2-thiobarbiturique (TBA). Par la suite, Berheim *et al.* [87] associent cette coloration rouge à la formation d'un complexe entre les produits d'oxydation des acides gras insaturés et le TBA. En 1951, Patton *et al.* [88] identifient le malondialdéhyde (MDA) comme étant le principal réactant avec le TBA. Plus précisément, ce complexe coloré présentant un maximum d'absorbance à 532 nm résulterait de la condensation de deux moles de TBA et d'une mole de malondialdéhyde sous l'effet conjoint de la température et de l'acidité du milieu (*figure 10B*). La valeur de TBA fut alors définie comme étant la quantité de MDA, exprimée en mg, présente dans 1 kg d'échantillon. De nombreux substrats oxydables ont été utilisés avec cette méthode, incluant des acides gras libres, des huiles végétales, du LDL, des fluides corporels (urine, sérum), des cellules ou des tissus animaux.

Ce test a cependant suscité de nombreuses critiques. L'une d'elles est que le TBA n'est pas spécifique du MDA qui, lui-même, n'est pas exclusivement issu de l'oxydation des lipides. En effet, le MDA peut apparaître lors de l'interaction de l'hydroxyradical avec la vitamine C ou avec le désoxyglucose, tandis que le TBA peut réagir avec d'autres aldéhydes, des produits de la réaction de Maillard, des protéines, des produits de dégradation des sucres, des acides aminés et des acides nucléiques [45, 89]. Ainsi, à la notion initiale de dosage spécifique du MDA, s'est progressivement substituée la notion plus générale de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARs). Entre autres inconvénients, le MDA ne se formerait qu'à partir d'acides gras comportant au moins trois doubles liaisons (comme l'acide linoléique) favorisant par conséquent l'attaque du lipoperoxyradical sur la double liaison portée en β,γ par un mécanisme de cyclisation β,γ [90] (*figure 10A*). Ainsi, le test au TBA ne s'adresse pas aux produits d'oxydation des acides linoléique et oléique

qui ne favorisent pas ce type de cyclisation interne, biaisant de ce fait certains résultats de manière considérable. À titre d'exemple, il est surprenant de constater que les TBARs sont souvent mesurés pour étudier l'influence des ω -3 (dont l'oxydation produit du MDA) sur l'oxydabilité des LDL, par rapport à un régime moins riche en acides gras (dont l'oxydation produit peu ou pas de MDA). L'on s'aperçoit ici de l'énorme biais méthodologique puisque l'utilisation de ce test conclura exagérément que les ω -3 augmentent la susceptibilité oxydative des LDL, ce qui est loin d'être établi [81, 91-93]. D'autre part, un risque de sous-estimation de la réponse peut provenir du fait qu'*in vivo* le MDA est susceptible de former des bases de Schiff - voire des ponts de réticulation - avec les résidus lysine et arginine des protéines pour former des produits de lipoxydation avancée (ALE). Notons enfin que le MDA est absent dans beaucoup de lipides oxydés et constitue fréquemment un produit d'oxydation secondaire mineur [45], ce qui pose un problème de représentativité en sa qualité présumée de marqueur de l'oxydation lipidique. Toutes ces limites ont conduit au développement de techniques alternatives plus spécifiques du MDA et qui reposent, entre autres, sur la purification préalable du complexe TBA/MDA par chromatographie liquide haute performance [94].

Mesure des volatils par chromatographie

Les analytes dosés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sont principalement des aldéhydes, des cétones, des alcools, des acides carboxyliques courts et des hydrocarbures. Parmi ces composés volatils, certains sont hautement spécifiques de la dégradation oxydative d'une famille particulière d'acides gras polyinsaturés. Ainsi, le propanal est le principal marqueur de l'oxydation des acides gras de la famille ω -3 tandis que l'hexanal et le pentanal signalent l'existence d'une voie d'oxydation des acides gras de la série ω -6. L'hexanal est le produit terminal de l'oxydation lipidique le plus fréquemment mesuré, puisque sa formation est beaucoup plus importante que celle de la plupart des autres produits secondaires d'oxydation. Cependant, mesurer l'étendue de l'oxydation avec seulement un ou deux marqueur(s) relève d'une approche cyclo-péenne. La prise en compte d'un large ensemble de composés devrait être une approche à privilégier, d'autant plus que les progrès récents et la généralisation des couplages CPG-SM facilitent grandement la tâche.

Pour collecter les composés volatils marqueurs de l'oxydation, différentes approches sont possibles, parmi lesquelles, les méthodes (i) d'extraction ou (ii) d'analyse d'espace de tête.

(i) Concernant les méthodes d'extraction citons notamment l'extraction distillation simultanée (EDS), dans laquelle l'échantillon est distillé durant plusieurs heures. Le couplage EDS-CPG a été utilisé pour quantifier l'hexanal produit durant le stockage de produits carnés [95]. L'EDS présente l'avantage d'extraire les composés d'intérêt en quantités importantes puisque les volatils ont généralement une solubilité élevée dans les solvants organiques. Cette méthode est cependant longue et laborieuse et nécessite une étape d'évaporation du solvant qui peut conduire à une dégradation substantielle des composés volatils.

(ii) L'analyse d'espace de tête, quant à elle, peut être réalisée par les techniques d'espace de tête statique (SHS), dynamique (DHS) ou de microextraction en phase solide (SPME).

Concernant la SHS, l'échantillon est disposé dans un flacon hermétiquement fermé. La plupart des composés volatils à la température d'analyse quitte l'échantillon et passent dans l'espace de tête gazeux qui le surplombe. Lorsque l'équilibre est atteint, une aliquote de l'espace de tête est collectée puis injectée en CPG. Selon Frankel *et al.* [96], cette méthode couplée à la CPG est rapide (15 déterminations/h), spécifique de l'hexanal et peut être employée pour mesurer la lipoxydation dans des échantillons biologiques de type foie de rat. La SHS a également été employée pour mesurer l'effet antioxydant du butylhydroxytoluène sur l'oxydation de produits carnés [97]. Les principaux avantages de cette

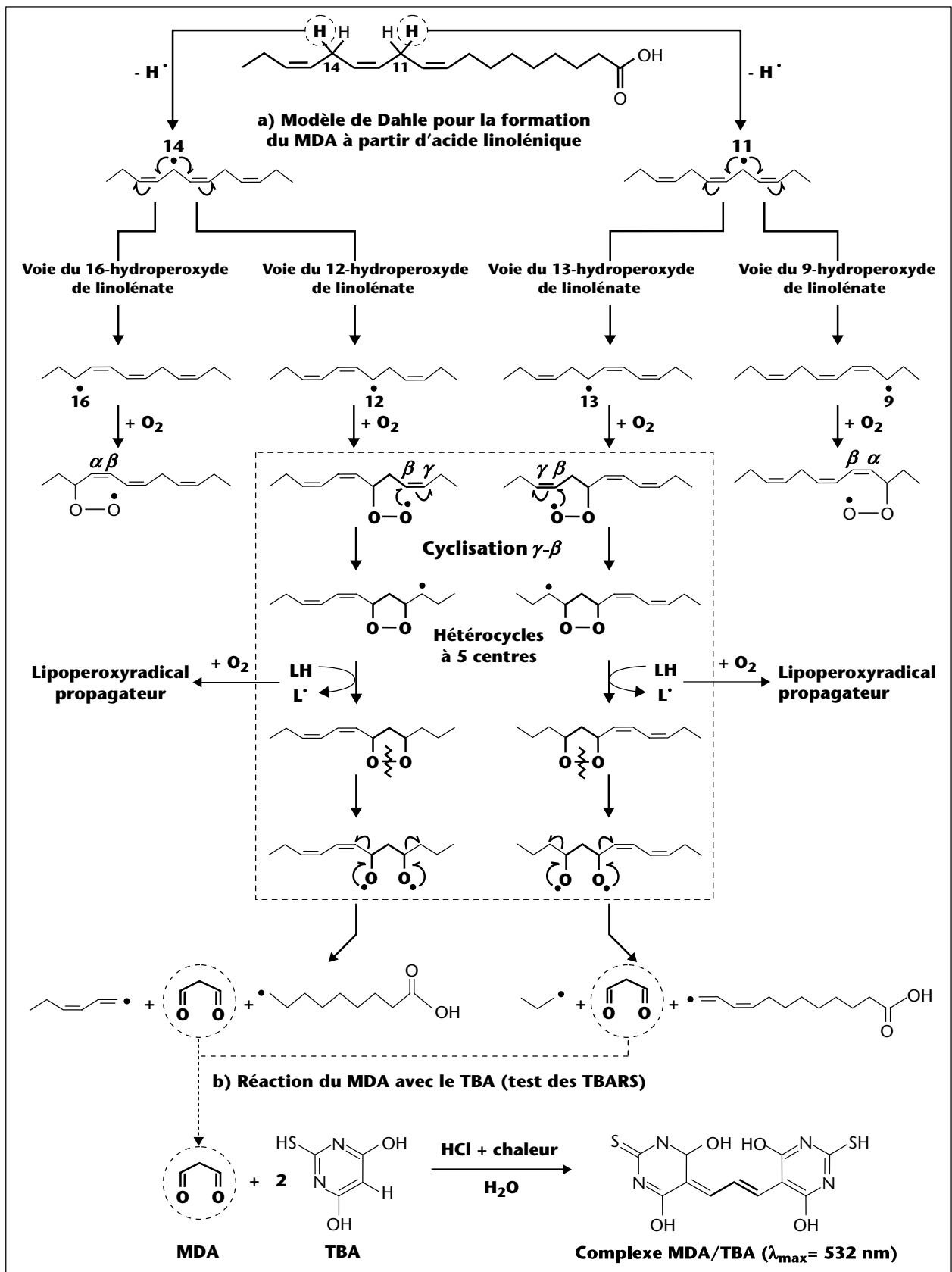


Figure 10. Formation du malondialdéhyde (MDA) à partir d'acide linoléique (A), et formation d'un chromophore entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (B) (adapté en partie d'après la référence [90]).

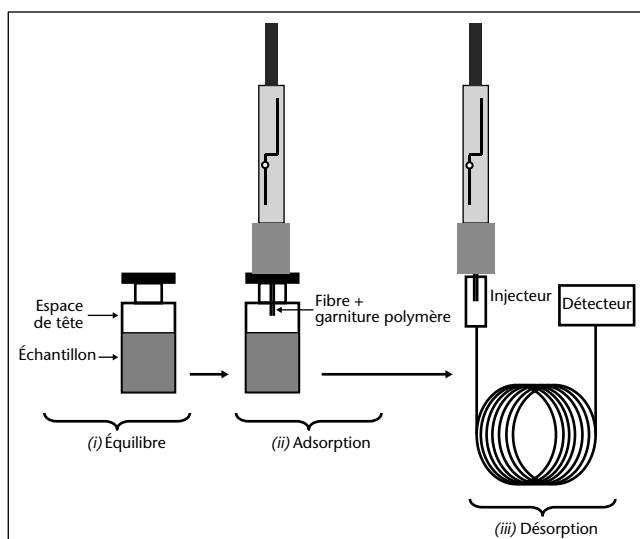


Figure 11. Procédé de microextraction en phase solide.

méthode sont d'une part de ne pas nécessiter de solvant d'extraction, et d'autre part d'être peu coûteuse, facile d'utilisation et automatisable. Cependant, la SHS ne permet de quantifier qu'une fraction des composés d'intérêt. En effet, puisque l'équilibre s'établit entre les volatils présents dans l'espace de tête et ceux restant dans l'échantillon, les quantités de composés récupérées demeurent faibles, ce qui limite la technique en terme de sensibilité. L'élévation de la température d'extraction pourrait certes accroître les quantités recueillies, mais la température doit être maintenue le plus bas possible afin de minimiser la génération de nouveaux produits d'oxydation et/ou la dégradation thermique des marqueurs de l'oxydation.

À l'opposé de la SHS qui est fondée sur l'établissement d'un équilibre de partage des volatils entre l'échantillon et l'espace de tête, l'espace de tête dynamique (DHS) empêche l'établissement de cet état d'équilibre. Ainsi, en DHS, l'échantillon est continuellement purgé par un gaz inerte qui extrait les composés volatils. L'effluent gazeux passe ensuite au travers d'un piège constitué d'un polymère poreux, lequel retient les analytes volatils. Parmi les pièges disponibles, le Tenax[®], capable d'adsorber un grand nombre de volatils, reste le plus employé. Puisque les volatils sont constamment évacués puis piégés, la concentration des composés injectés en CPG est importante. Plusieurs études ont démontré l'efficacité du couplage DHS-CPG pour évaluer le statut oxydatif de différentes viandes [98-100]. Malgré sa sensibilité, la méthode DHS souffre du fait que le profil de concentration des composés volatils peut varier en fonction de la disponibilité de l'oxygène dans le flacon. D'autre part, l'instrumentation est complexe et coûteuse, ce qui multiplie par voie de conséquence les sources d'erreurs. De surcroît, la DHS requiert environ 15 minutes de travail par échantillon que la SHS [101].

La SPME est une méthode d'extraction gaz-solide sans solvant, utilisant les propriétés adsorbantes d'une garniture polymérique déposée à l'intérieur d'une fibre que l'on met en contact avec l'espace de tête. Cette méthode comporte trois étapes (figure 11) : (i) la phase d'équilibre dans laquelle les composés volatils migrent de l'échantillon à l'espace de tête jusqu'à atteindre l'équilibre, (ii) la phase d'adsorption, qui consiste en un équilibre de partage des composés volatils entre la fibre et l'espace de tête et (iii) la phase de désorption thermique, pour laquelle la fibre est introduite dans un injecteur CPG. Les analytes sont alors rapidement désorbés pour pénétrer dans la colonne. De nombreuses études ont utilisé la SPME-CPG pour évaluer l'oxydation lipidique en présence ou en absence d'antioxydants dans des produits carnés [102-105] ou dans des

émulsions d'huiles végétales [106]. La SPME est résolument une méthode d'avenir, offrant à l'analyste une grande facilité d'utilisation, d'autant plus qu'il est possible d'automatiser l'extraction. En revanche, l'inconvénient majeur concerne la relative rapidité de la détérioration de la fibre, ce qui nécessite des études de répétabilité à long terme. Notons que ces fibres sont rarement utilisables au-delà de 50 extractions et qu'elles peuvent générer des pollutions par des alkylcyclosiloxanes (détectables en spectrométrie de masse pour les fragments 73, 77 et 147 m/z).

En conclusion, chaque méthode d'extraction possède ses propres limites, bien que la SPME gagne de plus en plus d'adeptes en raison de sa facilité d'utilisation.

Conclusion

Le problème de l'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante a été présenté dans cette revue, au regard du contexte et des mécanismes d'antioxydation. Nous avons vu que la complexité et la diversité des systèmes d'étude ont conduit au développement d'une multitude de tests, aucun d'entre eux ne présentant malheureusement le caractère universel espéré. Cela a naturellement conduit les chercheurs à adopter une approche réductionniste, consistant à décomposer cette complexité en ses différentes parties et à les étudier indépendamment, notamment par l'intermédiaire de différentes stratégies de mesure.

La stratégie de mesure cinétique basée sur la disparition du substrat est davantage adaptée à l'établissement du degré d'oxydation en (i) système modèle ou en (ii) système biologique ou biomimétique préalablement marqué par une sonde fluorescente. Les substrats oxydables utilisés dans ce type de tests présentent en majorité une structure polyénique conjuguée qui leur confère des propriétés d'absorption et/ou de fluorescence dans le spectre UV-VIS, et permet de suivre leur dégradation oxydative. Pour cela, la fluorimétrie constitue la méthode de choix car plus sensible et spécifique que la spectrophotométrie d'absorption, et d'autre part, moins sujette aux interférences de toutes natures. Notons cependant que la fluorimétrie demeure moins répandue que la spectrophotométrie d'absorption qui équipe pratiquement tous les laboratoires de recherche. Enfin, la cytométrie de flux est un outil précieux pour renseigner au niveau de la cellule individualisée. En définitive, le principal avantage de ces méthodes est qu'elles mesurent la disparition d'un substrat unique et non la formation d'une multitude de produits d'oxydation, ce qui permet de renseigner sur l'état d'oxydation de manière directe et non biaisée.

Les méthodes fondées sur la mesure cinétique de l'apparition des produits d'oxydation semblent quant à elles adaptées à l'évaluation de l'oxydation sur tous types de systèmes lipidiques. Ces méthodes sont toutefois limitées par l'absence de marqueur universel de l'oxydation. De ce fait, il est indispensable d'évaluer à la fois les produits d'oxydation primaire et secondaire pour obtenir une vision de l'oxydation aussi complète et fidèle que possible. Ainsi, dans certains cas, l'ajout d'antioxydants peut conduire à un accroissement de la teneur en produits d'oxydation primaire par stabilisation d'un lipoperoxyradical en hydroperoxyde lipidique. En corollaire, la teneur en produits d'oxydation secondaire diminue. Si l'analyste mesure uniquement les produits d'oxydation primaire, il conclut à un effet pro-oxydant, bien que la molécule testée ait agi en tant qu'antioxydant. De la même manière, certains agents pro-oxydants comme les métaux de transition peuvent accélérer la cinétique de décomposition des hydroperoxydes en composés d'oxydation secondaire. Dans ce cas, si les hydroperoxydes sont les seuls composés d'oxydation mesurés, un extrait biologique ou végétal présentant une teneur élevée en fer, pourrait apparaître comme antioxydant alors qu'il amène en réalité la réaction d'oxydation à des stades plus avancés.

Il ressort en définitive qu'aucune de ces deux stratégies (disparition du substrat et apparition de produits d'oxydation) ne prend l'avantage sur

l'autre, d'un point de vue général, puisqu'elles mesurent des facettes différentes mais complémentaires de l'oxydation.

Remerciements. Luis Javier López-Giraldo bénéficie du soutien du programme *Alβan*, Programme de Bourses de Haut Niveau de l'Union Européenne pour l'Amérique Latine, bourse N°E05D055786CO.

RÉFÉRENCES

1. CILLARD J, CILLARD P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL* 2006 ; 13 : 24-9.
2. HERTOGL MGL, FESKENS EJ, HOLLMAN PC, KATAN, MB, KROMHOUT D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993 ; 342 : 1007-11.
3. FRANKEL EN, KANNER J, KINSELLA JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993 ; 341 : 454-7.
4. LAGUERRE M, LECOMTE J, VILLENEUVE P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation : existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res* 2007 ; 46 : 244-82.
5. LEGER C. Antioxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action antioxydante, interactions. *Ol Corps Gras Lipides* 2006 ; 13 : 59-69.
6. DANGLES O. Propriétés chimiques des polyphénols. In : Sarni-Manchado P, Cheyrier V, eds. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Paris : Lavoisier, 2006 : 29-54.
7. KRINSKY NI. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1998 ; 854 : 443-7.
8. DI MASCO P, DEVASAGAYAM TP, KAISER S, SIES H. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem Soc Trans* 1990 ; 18 : 1054-6.
9. BURTON GW, INGOLD KU. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*. *J Am Chem Soc* 1981 ; 103 : 6472-7.
10. NIKI E, SAITO T, KAWAKAMI A, KAMIYA Y. Inhibition of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 4177-82.
11. BELYAKOV VA, ROGINSKY VA, BORS W. Rate constants for the reaction of peroxy free radical with flavonoids and related compounds as determined by the kinetic chemiluminescence method. *J Chem Soc, Perkin Trans 2* 1995 ; 2 : 2319-26.
12. GOLUMBIC C, MATTIL HA. Antioxidants and the autoxidation of fats. XIII. The antioxygenic action of ascorbic acid in association with Tocopherols, hydroquinones and related compounds. *J Am Chem Soc* 1941 ; 63 : 1279-80.
13. TAPPEL AL. Will antioxidant nutrients slow aging process? *Geriatrics* 1968 ; 23 : 97-105.
14. JACQUES PF, HALPNER AD, BLUMBERG JB. Influence of combined antioxidant nutrient intakes on their plasma concentrations in an elderly population. *Am J Clin Nutr* 1995 ; 62 : 1228-33.
15. PACKER JE, SLATER TF, WILLSON RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979 ; 278 : 737-8.
16. NIKI E, KAWAKAMI A, YAMAMOTO Y, KAMIYA Y. Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull Chem Soc Jpn* 1985 ; 58 : 1971-5.
17. SATO K, NIKI E, SHIMASAKI H. Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch Biochem Biophys* 1990 ; 279 : 402-5.
18. COS P, YING L, CALOMME M, ET AL. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 1998 ; 61 : 71-6.
19. FOTI M, PIATTELLI M, BARATTA MT, RUBERTO G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* 1996 ; 44 : 497-501.
20. GOUPY P, DUFOUR C, LOONIS M, DANGLES O. A quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J Agric Food Chem* 2003 ; 51 : 615-22.
21. JOVANOVIC SV, STEENKEN S, HARA Y, SIMIC MG. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for the antioxidant activity? *J Chem Soc, Perkin Trans 2* 1996 ; 11 : 2497-504.
22. PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000 ; 63 : 1035-42.
23. RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996 ; 20 : 933-56.
24. VAN ACKER SABE, VAN DEN BERG DJ, TROMP MNJL, GRIFFIOEN DH, VAN DER VIJGH WJF, BAST A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996 ; 20 : 331-42.
25. CARTRON E, CARBONNEAU MA, FOURET G, DESCOMPS B, LEGER CL. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds : LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. *J Nat Prod* 2001 ; 64 : 480-6.
26. ZHU QY, HUANG Y, CHEN Z-Y. Interaction between flavonoids and α -tocopherol in human low density lipoprotein. *J Nutr Biochem* 2000 ; 11 : 14-21.
27. LUO YR, HOLMES JL. The stabilization energies of polyenyl radicals. *Chem Phys Lett* 1994 ; 228 : 329-32.
28. BURTON GW, INGOLD KU. β -Carotene : an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984 ; 224 : 569-73.
29. JØRGENSEN K, SKIBSTED LH. Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Z Lebensm Unters Forsch* 1993 ; 196 : 423-9.
30. KENNEDY TA, LIEBLER DC. Peroxyl radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 4658-63.
31. BLACK HS. Mechanisms of pro- and antioxidant. *J Nutr* 2004 ; 134 : 3169S-3170S.
32. VALGIMIGLI L, LUCARINI M, PEDULLI GF, INGOLD KU. Does β -carotene really protect vitamin E from oxidation? *J Am Chem Soc* 1997 ; 119 : 8095-6.
33. BERSET C, CUVELIER M-E. Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sci Aliments* 1996 ; 16 : 219-45.
34. WANG J, MIYAZAWA T, FUJIMOTO K. Inhibition of methyl linoleate peroxidation by maize zein in powder model system at high water activity. *Agric Biol Chem* 1991 ; 55 : 1531-6.
35. ROGINSKY V, BARSUKOVA T. Chain-breaking antioxidant capability of some beverages as determined by the Clark electrode technique. *J Med Food* 2001 ; 4 : 219-29.
36. RAMAMOORTHY R, DUTTA PK, AKBAR SA. Oxygen sensors : materials, methods, designs and applications. *J Mater Sci* 2003 ; 38 : 4271-82.
37. MARCO GL. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1968 ; 45 : 594-8.
38. MILLER HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1971 ; 48 : 91.
39. VON GADOW A, JOUBERT E, HANSMANN CF. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem* 1997 ; 45 : 632-8.

40. MOURE A, FRANCO D, SINEIRO J, DOMÍNGUEZ H, NÚÑEZ MJ, LEMA JM. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *J Agric Food Chem* 2000 ; 48 : 3890-7.
41. KOLEVA II, VAN BEEK TA, LINSSEN JPH, DE GROOT A, EVSTATIEVA LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity : a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal* 2001 ; 13 : 8-17.
42. PRATT D, MILLER E. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogaea*). *J Am Oil Chem Soc* 1984 ; 61 : 1064-7.
43. PAREJO I, VILADOMAT F, BASTIDA J, ET AL. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci* 2003 ; 73 : 1667-81.
44. CHAILLOU LL, NAZARENO MA. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J Agric Food Chem* 2006 ; 54 : 8397-402.
45. FRANKEL EN. *Lipid oxidation*. Dundee, UK : The Oily Press, 1998.
46. KUYPERS FA, VAN DEN BERG JJM, SCHALKWIJK C, ROELOFSEN B, OP DEN KAMP JAF. Parinaric acid as a sensitive fluorescent probe for the determination of lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1987 ; 921 : 266-74.
47. VAN DEN BERG JJM, KUYPERS FA, QJU JH, ET AL. The use of cis-parinaric acid to determine lipid peroxidation in human erythrocyte membranes. Comparison of normal and sickle erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1988 ; 944 : 29-39.
48. SIMOES APCF, VAN DEN BERG JJM, ROELOFSEN B, OP DEN KAMP JAF. Lipid peroxidation in Plasmodium falciparum-parasitized human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1992 ; 298 : 651-7.
49. DE HINGH YCM, MEYER J, FISCHER JC, BERGER R, SMEITINK JAM, OP DEN KAMP JAF. Direct measurement of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biochemistry* 1995 ; 34 : 12755-60.
50. DINIS TCP, ALMEIDA LM, MADEIRA VMC. Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes : effect on functional and biophysical properties. *Arch Biochem Biophys* 1993 ; 301 : 256-64.
51. MCGUIRE SO, JAMES-KRACKE MR, SUN GY, FRITSCHKE KL. An esterification protocol for cis-parinaric acid-determined lipid peroxidation in immune cells. *Lipids* 1997 ; 32 : 219-26.
52. STEENBERGEN RGH, DRUMMEN GPC, OP DEN KAMP JAF, POST JA. The use of cis-parinaric acid to measure lipid peroxidation in cardiomyocytes during ischemia and reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1997 ; 1330 : 127-37.
53. DRUMMEN GPC, OP DEN KAMP JAF, POST JA. Validation of the peroxidative indicators, cis-parinaric acid and parinaroyl-phospholipids, in a model system and cultured cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1999 ; 1436 : 370-82.
54. RITOV VB, BANNI S, YALOWICH JC, ET AL. Non-random peroxidation of different classes of membrane phospholipids in live cells detected by metabolically integrated cis-parinaric acid. *Biochim Biophys Acta* 1996 ; 1283 : 127-40.
55. LARANJINHA JA, ALMEIDA LM, MADEIRA VM. Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins : quenching of cis-parinaric acid fluorescence. *Arch Biochem Biophys* 1992 ; 297 : 147-54.
56. TSUCHIYA M, KAGAN VE, FREISLEBEN HJ, MANABE M, PACKER L. Antioxidant activity of a-tocopherol, b-carotene, and ubiquinol in membranes : cis-parinaric acid-incorporated liposomes. *Methods Enzymol* 1994 ; 234 : 371-83.
57. OSAKA K, RITOV VB, BERNARDO JF, BRANCH RA, KAGAN VE. Amphotericin B protects cis-parinaric acid against peroxy radical-induced oxidation : amphotericin B as an antioxidant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 ; 41 : 743-7.
58. LARANJINHA JA, ALMEIDA LM, MADEIRA VM. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals : antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1994 ; 48 : 487-94.
59. MORGAN CG, HUDSON B, WOLBER PK. Photochemical dimerization of parinaric acid in lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 26-30.
60. HAUGLAND RP. In : *Handbook of fluorescent probes*. Eugene, OR : Molecular Probes, Inc, 1996 : 297-8.
61. NAGUIB YMA. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. *Anal Biochem* 1998 ; 265 : 290-8.
62. MAKRIGIORGOS GM, KASSIS AI, MAHMOOD A, BUMP EA, SAVVIDES P. Novel fluorescein-based flow-cytometric method for detection of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1997 ; 22 : 93-100.
63. MAULIK G, KASSIS AI, SAVVIDES P, MAKRIGIORGOS GM. Fluoresceinated phosphoethanolamine for flow-cytometric measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1998 ; 26 : 645-53.
64. CHUNG WY, BENZIE IFF. Probe-assisted flow cytometric analysis of erythrocyte membrane response to site-specific oxidant stress. *Cytometry* 2000 ; 40 : 182-8.
65. AMER J, GOLDFARB A, FIBACH E. Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. *Cytom Part A* 2004 ; 60A : 73-80.
66. ALDINI G, YEUM K-J, RUSSELL RM, KRINSKY NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 2001 ; 31 : 1043-50.
67. DRUMMEN GPC, GADELLA BM, POST JA, BROUWERS JF. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY^{581/591}. *Free Radic Biol Med* 2004 ; 36 : 1635-44.
68. BALL BA, VO A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY^{581/591}. *J Androl* 2002 ; 23 : 259-69.
69. HUANG D, OU B, HAMPSCCH-WOODILL M, FLANAGAN JA, DEEMER EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agric Food Chem* 2002 ; 50 : 1815-21.
70. BERETTA G, ALDINI G, MAFFEI FACINO R, RUSSELL RM, KRINSKY NI, YEUM KJ. Total antioxidant performance : a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 2006 ; 354 : 290-8.
71. NAGUIB YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem* 2000 ; 48 : 1150-4.
72. LEA C. The effect of light on the oxidation of fats. *Proc Roy Soc London* 1931 ; 108 : 175-89.
73. CHAPMAN RA, MACKAY K. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *J Am Oil Chem Soc* 1949 ; 26 : 360-3.
74. MIHALJEVIC B, KATUSIN-RAZEM B, RAZEM D. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic Biol Med* 1996 ; 21 : 53-63.
75. JIANG ZY, HUNT JV, WOLFF SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in low density lipoproteins. *Anal Biochem* 1992 ; 202 : 384-9.
76. HEATH RL, TAPPEL AL. A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal Biochem* 1976 ; 76 : 184-91.
77. VAN DER, VOORT FR, ISMAIL AA, SEDMAN J. The determination of peroxide value oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 1994 ; 71 : 921-6.
78. GILLAM AE, HEILBRON IM, HILDITCH TP, MORTON RA. Spectrographic data of natural fats and their fatty acids in relation to vitamin A. *Biochem J* 1931 ; 25 : 30-8.

79. PRYOR WA, CORNICELLI JA, DEVALL LJ, ET AL. A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J Org Chem* 1993 ; 58 : 3521-32.
80. HEINONEN IM, LEHTONEN PJ, HOPIA AI. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J Agric Food Chem* 1998 ; 46 : 25-31.
81. GORDOA JCR, RENOBALLES M, CERRO A, LABASTIDA EF, AMIANO P, DORRONSORO M. Habitual fish intake is associated with decreased LDL susceptibility to ex vivo oxidation. *Lipids* 2002 ; 37 : 333-41.
82. DEFRANCESCO F, DEFRANCESCO C, BOCCARDI A. Oxidative alteration of lipids and UV absorption. UV spectra of oxidized structures by derivative technique. *Riv Ital Sostanze Grasse* 1980 ; 57 : 85-7.
83. CORONGIU FP, MILLA A. An improved and simple method for determining diene conjugation in autoxidized fatty acids. *Chem Biol Interact* 1983 ; 44 : 289-97.
84. CORONGIU FP, BANNI S. Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods Enzymol* 1994 ; 233 : 303-10.
85. SERGENT O, MOREL I, COGREL P, ET AL. Ultraviolet and infrared spectroscopy for microdetermination of oxidized and unoxidized fatty acyl esters in cells. *Anal Biochem* 1993 ; 211 : 219-23.
86. KOHN HI, LIVERSEDGE N. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther* 1944 ; 82 : 292-300.
87. BERNHEIM F, BERNHEIM MLC, WILBUR KM. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *J Biol Chem* 1947 ; 174 : 257-64.
88. PATTON S, KURTZ GW. 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *J Dairy Sci* 1951 ; 34 : 669-74.
89. JANERO D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990 ; 9 : 515-40.
90. DAHLE LK, HILL EG, HOLMAN RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys* 1962 ; 98 : 253-61.
91. BONANOME A, BIASA F, DE LUCA M. ET AL. n-3 fatty acids do not enhance LDL susceptibility to oxidation in hypertriglycerolemic hemodialyzed subjects. *Am J Clin Nutr* 1996 ; 63 : 261-6.
92. BRUDE IR, DREVON CA, HJERMANN I, ET AL. Peroxidation of LDL from combined-hyperlipidemic male smokers supplied with omega-3 fatty acids and antioxidants. *Arterio Thromb Vasc Biol* 1997 ; 17 : 2576-88.
93. HIGDON JV, DU SH, LEE YS, WU T, WANDER RC. Supplementation of postmenopausal women with fish oil does not increase overall oxidation of LDL ex vivo compared to dietary oils rich in oleate and linoleate. *J Lipid Res* 2001 ; 42 : 407-18.
94. COMBE N. Les techniques d'analyse de l'oxydation lipidique. *Ol Corps Gras Lipides* 1996 ; 3 : 200-4.
95. VARA-UBOL S, BOWERS JA. Effect of α -tocopherol, β -carotene, and sodium triphosphate on lipid oxidation of refrigerated, cooked ground turkey and ground pork. *J Food Sci* 2001 ; 66 : 662-7.
96. FRANKEL EN, HU ML, TAPPEL AL. Rapid headspace gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples. *Lipids* 1989 ; 24 : 976-81.
97. WU Y, HAMOUZ F, SCHNEPF M. Factors affecting static HS-gas chromatographic analysis of lipid oxidation in precooked meat. *J Agric Food Chem* 1998 ; 46 : 3677-82.
98. SHAHIDI F, YUN J, RUBIN L, WOOD DF. The hexanal content as an indicator of oxidative stability and flavour acceptability in cooked ground pork. *Can Inst Food Sci Technol* 1987 ; 20 : 104-6.
99. ST ANGELO AJ, CRIPPEN KL, DUPUY HP, JAMES C. Chemical and sensory studies of antioxidant-treated beef. *J Food Sci* 1990 ; 55 : 1501-5.
100. LAI S, GRAY JJ, BOOREN AM, CRACKEL RL, GILL JL. Assessment of off-flavor development in restructured chicken nuggets using hexanal and TBARS measurements and sensory evaluation. *J Sci Food Agric* 1995 ; 67 : 447-52.
101. WARSHALL JW, WAMPLER T. Sources of error in purge and trap analysis of volatile organic compounds. *Am Lab* 1990 ; 22 : 38-43.
102. BRUNTON NP, CRONIN DA, MONAHAN FJ, DURCAN RA. Comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chem* 2000 ; 68 : 339-45.
103. DOLESCHALL F, KEMÉNY Z, RECSEG K, KOVÁRI K. A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *Eur J Lipid Sci Technol* 2002 ; 104 : 14-8.
104. GOODRIDGE CF, BEAUDRY RM, PESTKA JJ, SMITH DM. Solid-phase microextraction-gas chromatography for quantifying hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. *J Agric Food Chem* 2003 ; 51 : 4185-90.
105. BELTRAN E, PLA R, YUSTE J, MOR-MUR M. Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Sci* 2004 ; 66 : 719-25.
106. ALMAJANO MP, GORDON MH. Synergistic effect of BSA on antioxidant activities in model food emulsions. *J Am Oil Chem Soc* 2004 ; 81 : 275-80.