

Université
de Liège



Laboratoire de Biologie Moléculaire et de
Biotechnologie Végétales

Dr. TABART Jessica

StressOx- 31 mai & 1 juin 2016

Quid des mesures *in vitro* d'évaluation de la capacité antioxydante

CREDEC
Pr Defraigne
Dr Pincemail, Pr
Sakalihassan

Département des sciences
biomédicales et
précliniques
Pr Drion

Advanced Technology
Corporation (ATC)
Dr Chiap, Ing Van Heugen, Ir
Dubrowski

Service de
Gériatrie
Pr Petermans

**Nutrition Antioxydante
& Santé**
Dr Pincemail

Nutrition,
environnement et santé
Pr Guillaume avec la
collaboration du Pr Albert

UNILAB
Pr Charlier, Pr Cavalier,
Pr Le Goff

Service de Nutrition et de
Diabétologie
Pr Scheen et Pr Paquot

Unité de Biotechnologie des
Plantes de l'Université de Liège
et CEDEVIT
Pr Dommes, Dr Kevers, Dr Tabart

ANTIOXIDANTS

Enzymatic antioxidants

Primary Enzymes
SOD, catalase, glutathione peroxidase

Secondary Enzymes
glutathione reductase, glucose 6-phosphate dehydrogenase

Non-enzymatic Antioxidants

Minerals
Zinc, Selenium

Vitamins
Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin K

Carotenoids
β-carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin

Organosulfur compounds
allium, allyl sulfide, indoles

Low Molecular Weight Antioxidants
glutathione, uric acid

Antioxidant cofactors
Coenzyme Q₁₀

Polyphenols

Flavonoids

Flavonols
quercetin, kaempferol

Flavanols
catechin, EGCG

Flavanones
hesperitin

Isoflavanoids
genistein

Anthocyanidins
cyanidin, pelargonidin

Flavones
chrysin

Phenolic acids

Hydroxy-cinnamic acids
ferulic, p-Coumaric

Hydroxy-benzoic acids
gallic acid, ellagic acid

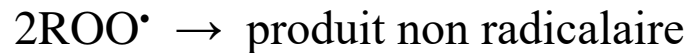
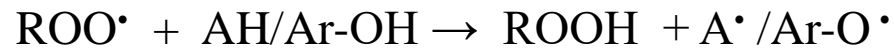
Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

- Un grand nombre d'essais pour détecter la AC (antioxydant capacity)
- Basées sur 2 types de mécanismes:

1. Transfert d'H (HAT)=

Inhibition d'un radical libre par le transfert d'un hydrogène

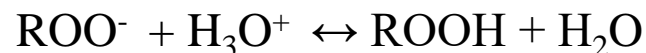
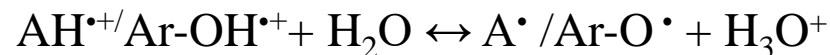
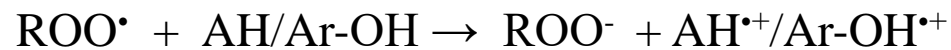
Réactions rapides et dépendantes du pH et du solvant



2. Transfert d'e⁻ (SET)=

Réduction par transfert d'électron

Réactions lentes et dépendantes du pH, sensibilité aux contaminations



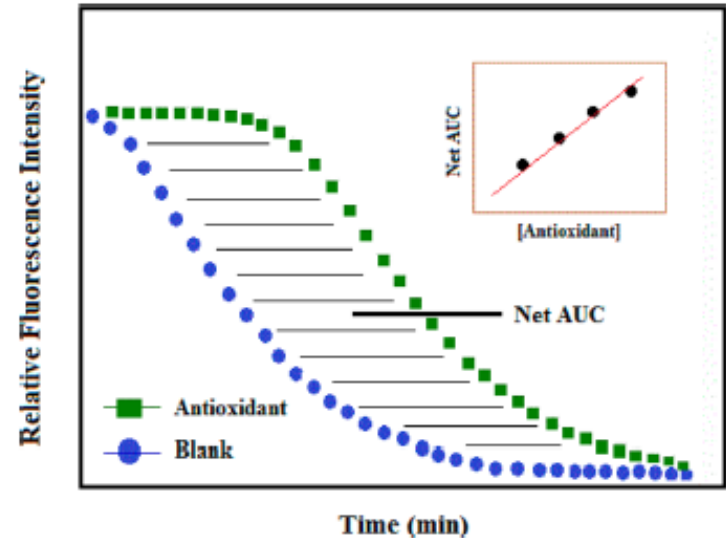
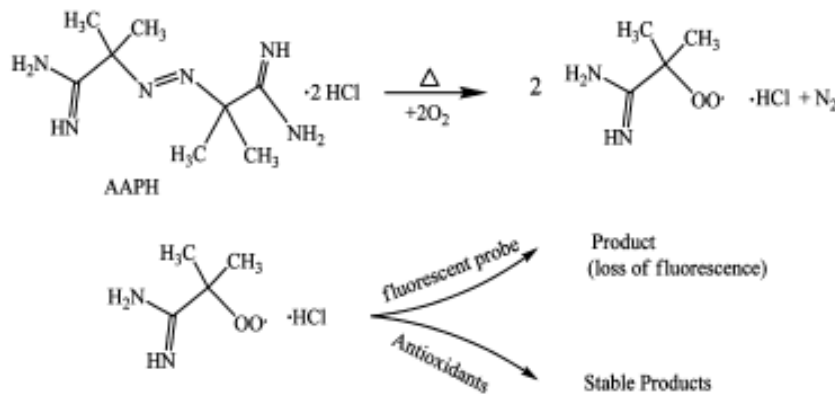
Les résultats sont les mêmes-Cinétiques différentes

Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

Les méthodes basées sur le HAT

ORAC: « Oxygen Radical Absorbance Capacity »

- Mesure l'inhibition du radical peroxy



Sondes utilisées: B-phycoérythrine, fluorescéine et dichlorofluorescéine

Désavantage

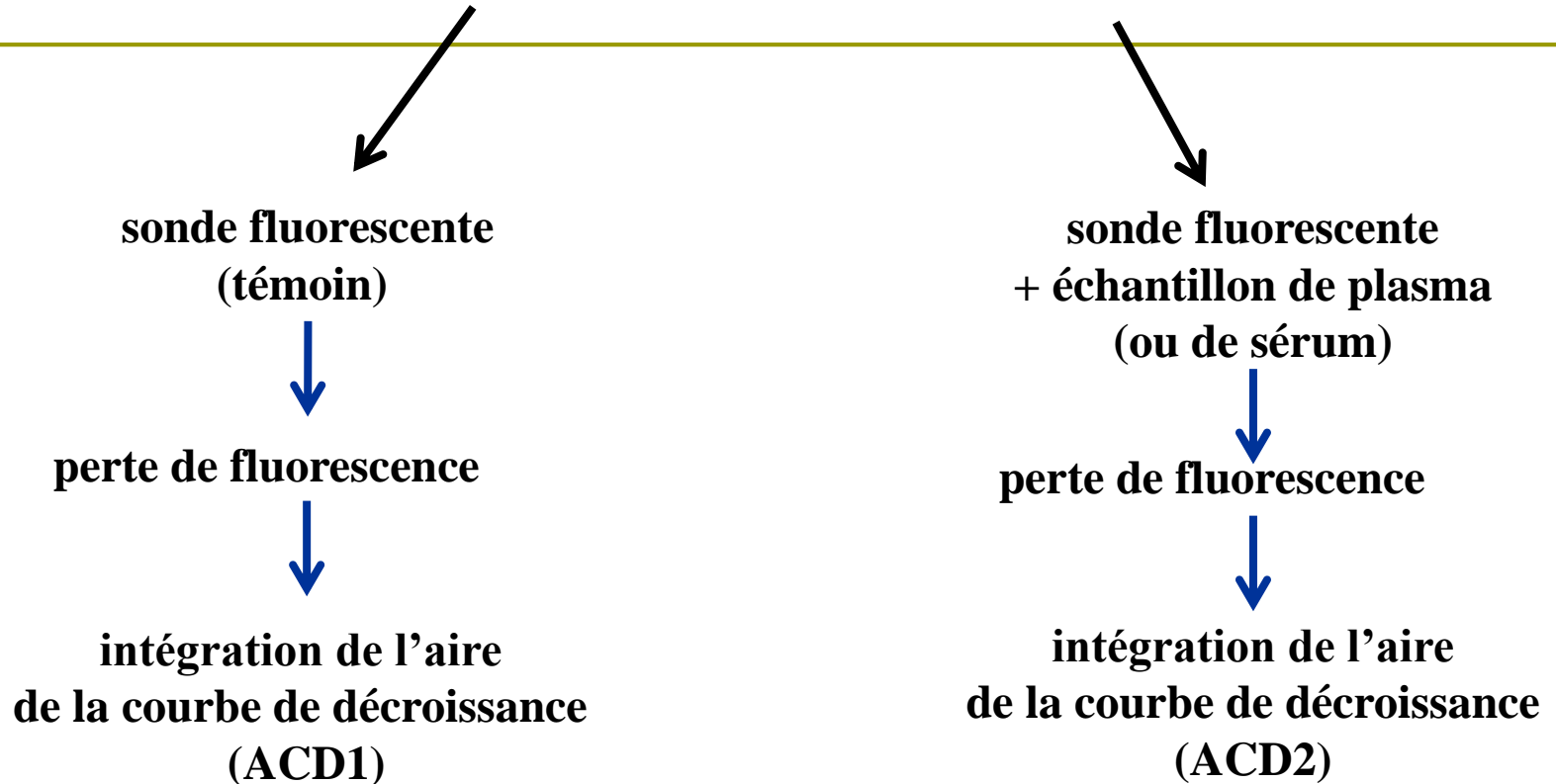
- régulation de la Température à 37°C

Avantages

- source contrôlable de ROO[•] ou autres
- AO hydro et lipophiles
- automatisé

HAT

Radicaux peroxyes hydrophiles (ORAC_h) ou lipophiles (ORAC_l)



capacité antioxydante du plasma = ACD2 – ACD1

ORAC US database 2010:

David B. Haytowitz and Seema Bhagwat, Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center (BHNRC), Agricultural Research Service (ARS), U.S. Department of Agriculture (USDA)

Comparaison de la valeur ORAC des mêmes aliments calculée par deux laboratoires différents

Description	Ou et al 2002	Wu et al 2004
	$\mu\text{mol TE}/100 \text{ g FW}$	$\mu\text{mol TE}/100 \text{ g FW}$
Betterave	1368	2774
Oignon rouge	1759	1146
Epinard	1520	2840
Brocoli	1169	1590
Poivron vert	816	558
Carotte	878	1215
Tomate	342	337

Valeur ORAC
!!!Utilisation « marketing »!!!

Techniques de dosages *in vitro* :

Les méthodes basées sur le HAT

Croton: β -caroten bleaching by LOO^\bullet

Les caroténoïdes blanchissent par oxydation et ce blanchiment est atténué en présence d'antioxydants

TRAP:

Mesure le taux d' O_2 consommé lors de la réaction entre un ROO^\bullet généré par l'AAPH et une sonde cible en présence (ou non) d'AO

TOSC: Total Oxidant Scavenging Capacity

Permet de quantifier l'effet d'un AO spécifiquement vis-à-vis de 3 radicaux (hydroxyl, peroxy et peroxy-nitrite) en se basant sur l'émission d'éthylène

Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

Les méthodes basées sur le SET

Folin-Ciocalteu AOC: Total Phenolic Assay

- Réduction, en milieu alcalin, du Mo (VI) en Mo (V) due à la présence d'AO
- Apparition d'une coloration bleue (750 nm)
- Méthode colorimétrique basée sur la norme ISO 14502-1

Avantages

- bonne corrélation avec ORAC
- simple, sensibles et précise

Désavantages

- interférences avec Fe⁺⁺, amines,
- réaction lente à pH acide
- détecte plus que les AO
- surestimation des données

Techniques de dosages *in vitro* :

Les méthodes basées sur le SET

FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power

Mesure le pouvoir de réduction des AO dans le plasma ou extraits végétaux

Mesure la réduction du Fe (III)-TPTZ en Fe (II) (bleu, 593 nm)

CUPRAC: Copper Reduction Assay

Variante du FRAP (Fe -> Cu)

Mesure du taux de Cu (I) par ajout d'un détecteur dans le milieu réactionnel:

(bathocuproine)₂ – Cu(I) = chromophore Abs à 490 nm

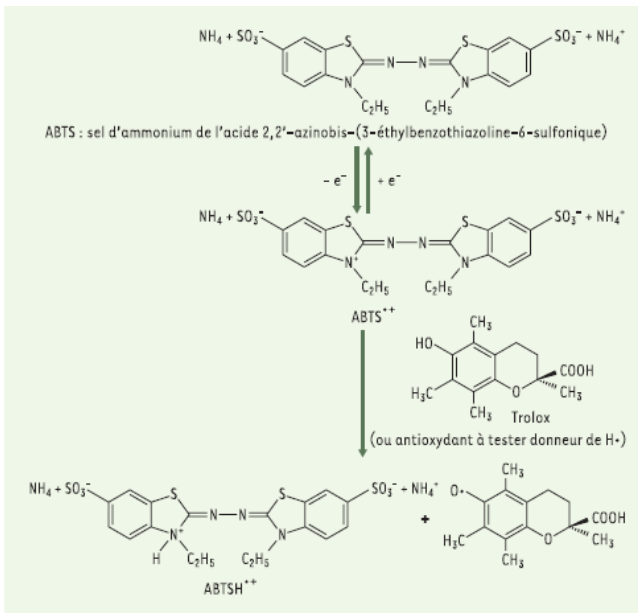
(néocuproine)₂ – Cu(I) = chromophore Abs à 450 nm

Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

Les méthodes basées sur le SET et le HAT

TEAC: Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

- Détermination de l'effet des AO sur le temps de vie de l'anion $ABTS^{\bullet+}$
- L'ABTS est oxydé par un ROO^{\bullet} ou persulfate de K $\Rightarrow ABTS^{\bullet+}$ (Bleu)



$ABTS^{\bullet+}$ (Bleu) + AO \Rightarrow Décoloration

Avantages

- détecte AO Hydro ou Lipophiles
- simple
- étude du pH sur les AO
- automatisation

Désavantage

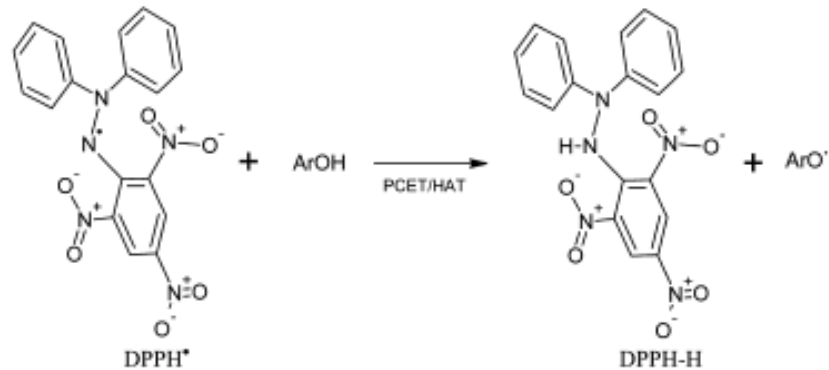
- variabilité en fct du pH, de la lumière et de la T°

Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

Les méthodes basées sur le SET et le HAT

DPPH:

- DPPH• = radical stable de couleur mauve
- Basée sur l'aptitude des AO à réduire le DPPH•
- Mesure de la décoloration à 520 nm du DPPH par ajout d'AO



Avantages

- appareillage simple
- simple et rapide
- étude du pH sur les AO
- automatisation

Désavantage

- interférence avec les contaminants

Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

Problèmes de standardisation inter-labo:

➤ Au niveau des protocols

- Instrument
- standard
- Concentration réactifs
-

➤ Au niveau de la préparation des échantillons

➤ Au niveau des standards utilisés:

➤ exemples:

Phénols totaux: Ac. Chlorogénique ou Ac. Gallique

ORAC: Trolox mais peu réactionnel

Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

Problèmes de standardisation inter-labo:

➤ Au niveau des protocols

➤ Au niveau de la préparation des échantillons

➤ Au niveau des standards utilisés:

➤ exemples:

Phénols totaux: Ac. Chlorogénique ou Ac. Gallique

ORAC: Trolox mais peu réactionnel

La capacité antioxydante totale d'un aliment dépend fortement de la préparation de l'échantillon.



Morceau de pomme frais ou conservé
au froid (-20 ou -80°C)

extraction

- quantité d'échantillon (1 à 10 g)
- composition du solvant *
- volume du solvant (2 à 100 mL)
- température d'extraction (4,25,50, 70°C)
- temps d'extraction (20,40,60 minutes)
- nombre d'extractions (1 à 3)

Surnageant

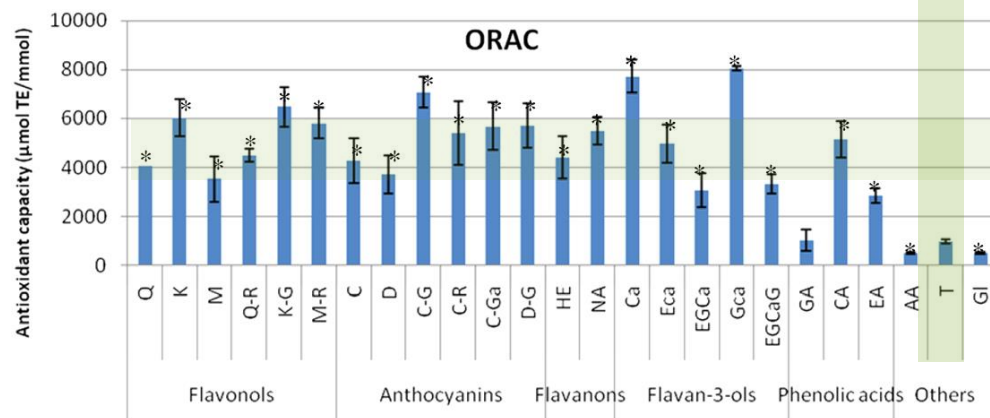
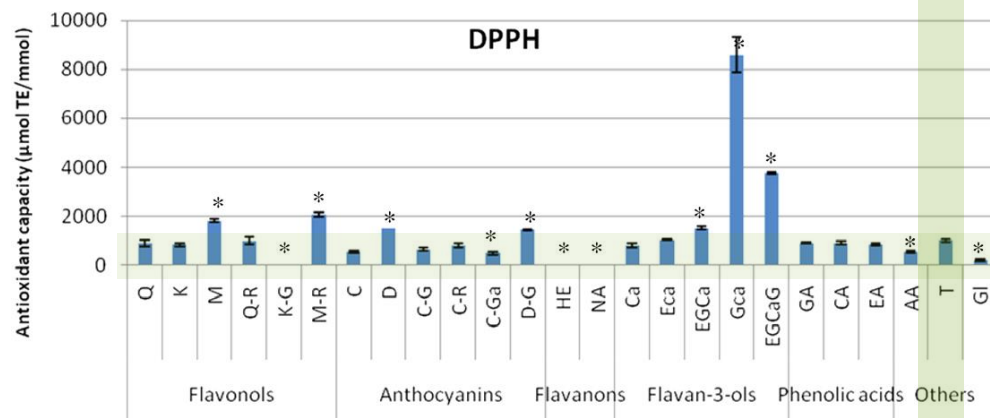
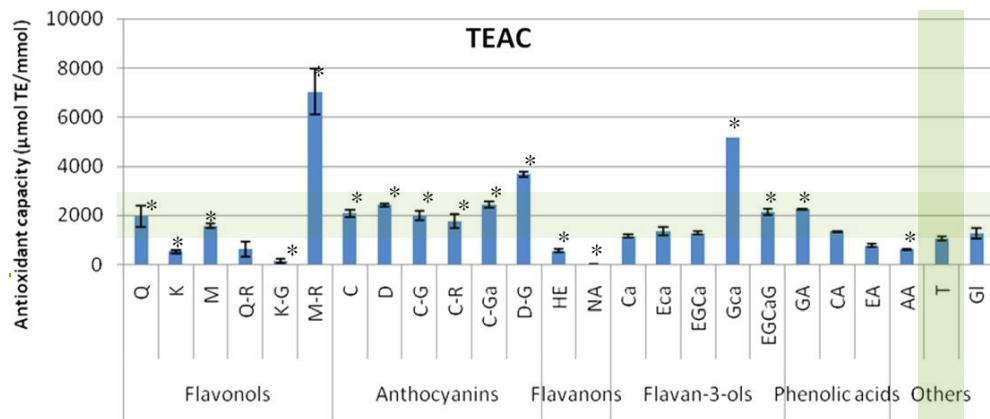
* acetone/water/acetic acid (70/28/2, v/v/v),
acetone/water/acetic acid (70/29.5/0.5, v/v/v),
acetone/water/acetic acid (70/29.8/0.2, v/v/v),
methanol/water (50/50, v/v),
methanol/water/acetic acid (50/49.5/0.5, v/v/v),
methanol/acetic acid (99.5/0.5, v/v)

Analyse de la capacité antioxydante
immédiate ou après
congélation de l'échantillon

Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

Problèmes de standardisation inter-labo:

- Au niveau des protocols
- Au niveau de la préparation des échantillons
- Au niveau des standards utilisés:



- Trolox comme standard

- OK pour TEAC et DPPH
- KO pour ORAC

Table 1
Antioxidant activities normalised with respect to the Trolox measurement

		ABTS	DPPH	ORAC	Haemolysis	ESR	Weighted average
Flavonols	Q	1.8	0.9	4.2	1.6	16.0	0.9
	K	0.5	0.8	6.2	0.2	2.7	0.5
	M	1.5	1.8	3.6	0.9	47.1	1.1
	Q-R	0.6	1.0	4.6	1.8	5.1	0.9
	K-G	0.2	0.0	6.6	1.5	0.6	0.7
	M-R	6.6	2.0	6.0	1.8	30.9	1.3
Anthocyanins	C	2.0	0.5	4.4	1.1	6.4	0.6
	D	2.3	1.5	3.8	0.9	30.5	0.9
	C-G	1.9	0.6	7.3	1.6	2.6	0.9
	C-R	1.7	0.8	5.5	1.7	42.0	1.1
	C-Ga	2.3	0.5	5.8	2.1	17.4	1.0
	D-G	3.5	1.4	5.9	1.7	61.4	1.4
Flavanons	HE	0.5	0.0	4.5	1.4	0.4	0.5
	NA	0.0	0.0	5.6	1.6	0.2	0.6
Flavan-3-ols	Ca	1.1	0.8	7.9	1.7	15.3	1.1
	ECa	1.3	1.0	5.1	1.5	11.5	0.9
	EGCa	1.2	1.5	3.1	0.7	70.7	1.2
	GCa	4.9	8.5	8.3	1.2	232.7	4.2
	EGCaG	2.0	3.7	3.4	1.0	72.5	1.7
Phenolic acids	GA	2.1	0.9	1.0	0.7	24.9	0.6
	CA	1.3	0.9	5.3	1.2	18.4	0.9
	EA	0.7	0.8	2.9	0.2	13.5	0.5
Others	AA	0.6	0.5	0.5	0.4	4.6	0.2
	GI	1.2	0.2	0.5	0.4	0.3	0.2
Average		1.7	1.3	4.7	1.2	30.3	

Techniques d'évaluation de la CAO *in vitro*

Toutes ces techniques d'évaluation de la capacité antioxydante sont basées sur des principes chimiques propres.

Au niveau des antioxydants, ceux-ci sont d'une telle diversité que:

- Ils ne sont pas forcément détectés par toutes les techniques
- Ils n'ont pas tous la même réactivité

ORAC value:

- Que veux dire 3000 ORAC units?
- UDSA a enlevé la valeur ORAC de ces databases:

«There is no evidence that the beneficial effects of polyphenol-rich foods can be attributed to the antioxidant properties of these foods. The data for antioxidant capacity of foods generated by in vitro methods cannot be extrapolated to in vivo effects and the clinical trials to test benefits of dietary antioxidants have produced mixed results. We know now that antioxidant molecules in food have a wide range of functions, many of which are unrelated to the ability to absorb free radicals.»

Au niveau de l'évaluation de la capacité antioxydante, il est intéressant de coupler plusieurs méthodes (divers mécanismes réactionnels).

Les statistiques peuvent également être utilisées pour mettre en relation divers résultats de techniques d'évaluation de la capacité antioxydante.

Exemple avec divers jus de cassis:

Choix du meilleur pour réaliser une étude de biodisponibilité

Juices	TEAC	ORAC	DPPH	FRAP	TP	AA	ESR
	μmole ET/L	μmole ET/L	μmole ET/L	μmole ET/L	mgEGA/L	mg/L	USOD/mL
A	155	11939	4232	6868	1207	230	50570
M	126	10862	5138	10357	1569	585	44710
Na	117	5057	3737	5327	1228	386	54140
R	160	6536	4801	8070	1193	467	33280
G	133	6753	3882	7138	1071	331	39710
J	132	8092	4597	8133	1414	549	37020
Jb	133	7665	5793	12033	2142	620	41280
S	140	12004	3892	6932	1118	293	39570
V	132	13853	3466	8351	1511	465	46430
Z	131	13053	4266	7260	2026	290	44140
Mean	136	9581	4380	8047	1448	422	43085
SD	13	3109	712	1909	374	136	6264
CV(%)	9.7	32.5	16.3	23.7	25.8	32.3	14.5

Table de corrélation

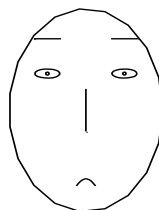
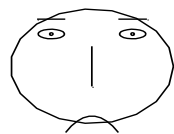
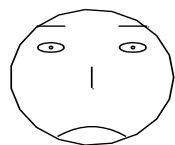
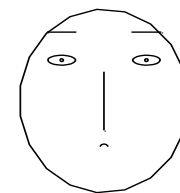
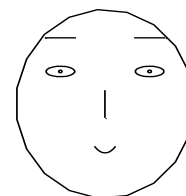
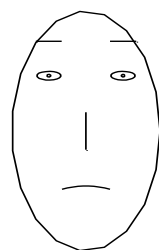
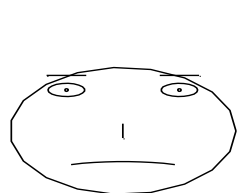
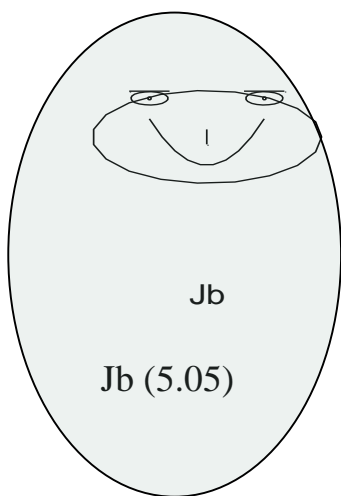
	TEAC	ORAC	DPPH	FRAP	TP	AA	ESR
TEAC	1	0.11	0.12	-0.023	-0.31	-0.28	-0.43
ORAC		1	-0.24	0.058	0.25	-0.29	0.18
DPPH			1	0.83	0.57	0.67	-0.37
FRAP				1	0.65	0.79	-0.33
TP					1	0.43	0.032
AA						1	-0.31
EPR							1

Tscore , GAS and ranking of the different juices

	TEAC	ORAC	DPPH	FRAP	TP	AA	ESR	GAS	Ranking
A	0.89	0.78	0.33	0.23	0.13	0.00	0.83	3.19	5
M	0.21	0.66	0.72	0.75	0.46	0.91	0.55	4.26	2
Na	0.00	0.00	0.12	0.00	0.15	0.40	1.00	1.67	9
R	1.00	0.17	0.57	0.41	0.11	0.61	0.00	2.87	7
G	0.38	0.19	0.18	0.27	0.00	0.26	0.31	1.59	10
J	0.35	0.35	0.49	0.42	0.32	0.82	0.18	2.93	6
Jb	0.37	0.30	1.00	1.00	1.00	1.00	0.38	5.05	1
S	0.53	0.79	0.18	0.24	0.05	0.16	0.30	2.73	8
V	0.35	1.00	0.00	0.45	0.41	0.60	0.63	3.44	3
Z	0.32	0.91	0.34	0.29	0.89	0.15	0.52	3.42	4

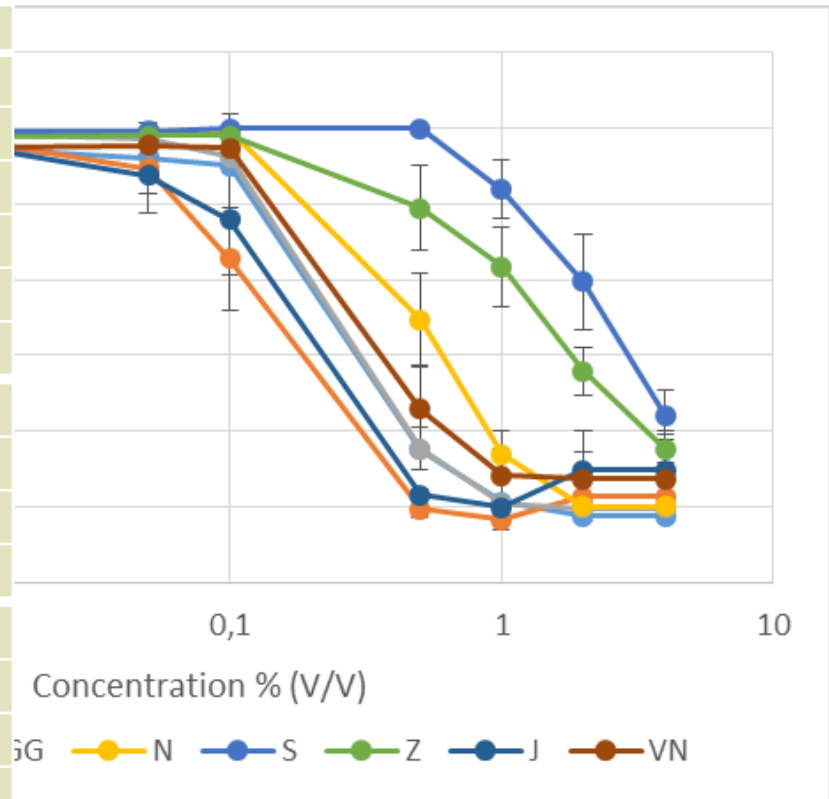
Représentation des figures de Chernoff basé sur le *Tscore*.

TEAC = longueur nez, ORAC = surface de la figure, DPPH = forme de la figure =, FRAP = les yeux, TP = sourire, AA = longueur bouche, ESR = localisation de la bouche.



Correlation entre les dosages *in vitro* et la vasorelaxation

% of vasorelaxation at concentrations	0.5%	
	8 juices	6 juices
TEAC	0.0126	0.1807
ORAC	0.1499	0.0587
DPPH	0.1896	0.1588
FRAP	0.2457	0.3088
Total phenolics	0.0114	0.0302
Ascorbic acid	0.3289	0.2011
Total Flavonols	0.1479	0.1025
Total phenolic acids	0.1283	0.0643
Total Anthocyan	0.4622	0.9209
Delphinidin rutinoside	0.4523	0.9164
Delphinidin glucoside	0.478	0.9077
Cyanidin rutinoside	0.4556	0.9286
Cyanidin glucoside	0.4646	0.9048
Peonidin Gluc.+Rut.	0.8627	0.906
Malvidin glucoside	0.7063	0.7915
Myricetin	0.0316	0.1572
Quercetin	0.3535	0.0154
Gallic acid	0.0734	0.0005



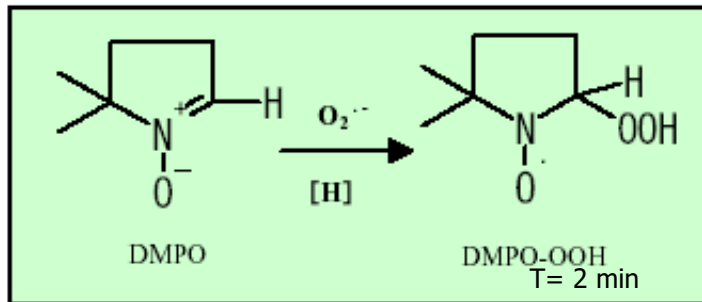
Merci de votre attention



Autre technique:

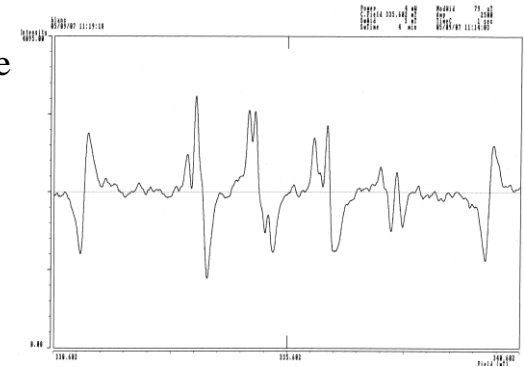
Résonance Paramagnétique Electronique:

- Technique physique basée sur la modification d'un champ magnétique en présence de substances possédant un électron célibataire.
- Des piègeurs de radicaux libres (spin trap) sont toutefois nécessaires pour augmenter le temps de demi-vie des radicaux



Xanthine/Xanthine oxydase

DMPO = spin Trap



- Avantages: Mise en évidence des effets des Aox sur un radical particulier - Précise
- Désavantages: Matériel spécialisé – Non automatisable – Sensible à la lumière et à la température

Test Hémolysse

- = méthode permettant de mettre en évidence la résistance des globules rouges face à un stress oxydant, en présence d'antioxydants
- AAPH à 37°C → formation de radicaux peroxy
- Mesure l'inhibition du radical peroxy



Avantages

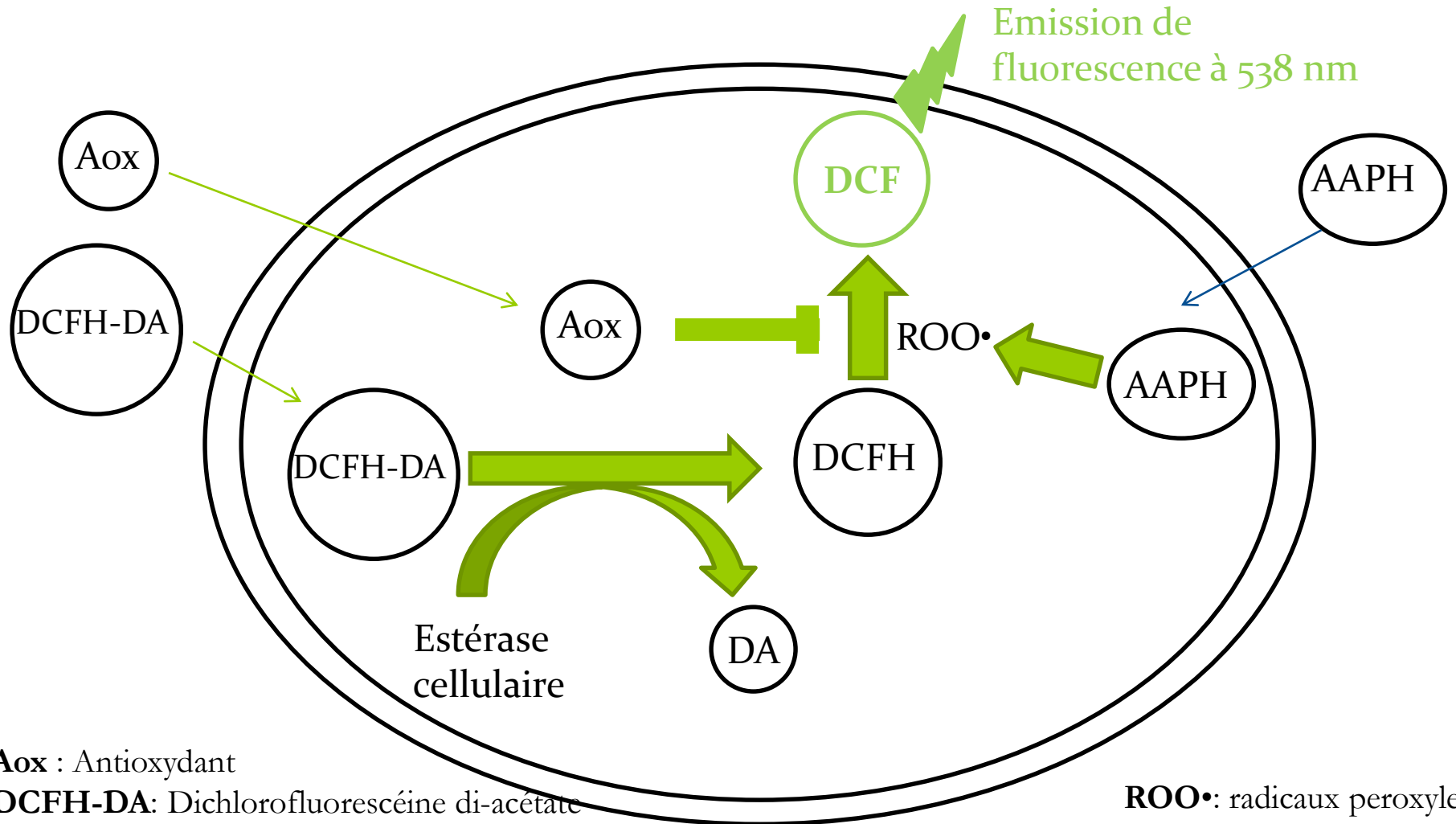
Source contrôlée de radicaux (AAPH)

Modèle cellulaire

Désavantages

- Régulation de la T°
- Pas en routine

Principe du test AAC (Activité antioxydante cellulaire)



Aox : Antioxydant

DCFH-DA: Dichlorofluoresceine di-acétate

DCFH : Dichlorofluoresceine

DA : groupement di-acétate

ROO•: radicaux peroxydes.

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

Test AAC

Avantages

- Valeurs prennent en considération:
 - Une valeur d'activité AOX
 - L'absorption des AOX par la cellule
- Pourrait être appliquée comme méthode de screening pour des études d'intervention

Désavantages

- Variabilité inter-expérimentale élevée
- Pas en routine