



Utilisation de la résonance paramagnétique électronique pour l'étude de la réactivité des radicaux libres générés lors de l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique par la lipoxxygenase

Stéphanie Brandicourt

► To cite this version:

Stéphanie Brandicourt. Utilisation de la résonance paramagnétique électronique pour l'étude de la réactivité des radicaux libres générés lors de l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique par la lipoxxygenase. Alimentation et Nutrition. 2013. dumas-01157702

HAL Id: dumas-01157702

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01157702>

Submitted on 28 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS

PARIS

MEMOIRE

Présenté en vue d'obtenir

le DIPLOME d'INGENIEUR C.N.A.M.

SPECIALITE : INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE

Par

Stéphanie BRANDICOURT

**UTILISATION DE LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE POUR L'ETUDE DE LA
REACTIVITE DES RADICAUX LIBRES GENERES LORS DE L'OXYDATION ENZYMATIQUE DE
L'ACIDE LINOLEIQUE PAR LA LIPOXYGENASE**

Soutenu le 24 juin 2013

JURY

PRESIDENT : M. Jacques NICOLAS, Professeur Emérite, C.N.A.M. PARIS

**MEMBRES : Mme Aline BOUSSARD, Ingénieur d'études, C.N.A.M., PARIS
Mme Sylvie DAVIDOU, Maître de conférences, C.N.A.M., PARIS
Mme Wafa GUIGA, Maître de conférences, C.N.A.M., PARIS
Mme Marie-Noëlle MAILLARD, Professeure, AgroParisTech, MASSY
Mme Anne-Marie RIQUET, Chargée de recherches, I.N.R.A., MASSY**

REMERCIEMENTS

Ces présents travaux ont été réalisés au sein de l'UMR Ingénierie Procédés Aliments 1145 (AgroParisTech-CNAM-INRA) avec le laboratoire de Biochimie Industrielle et Agro-Alimentaire du Conservatoire National des Arts et Métiers à Paris, et le laboratoire d'AgroParisTech à Massy à la salle d'analyse RPE. Ce stage a été réalisé dans le cadre de l'AIC-RPE portant sur l'étude de l'oxydation des lipides alimentaires par une approche innovante utilisant la Résonance Paramagnétique Electronique.

J'adresse de sincères remerciements à Mme Anne-Marie RIQUET, chargée de recherche à l'INRA, pour son enthousiasme, ses conseils avisés, ses encouragements et ses félicitations. Sa curiosité incessante en sciences et sa grande écoute font d'elle une personne auprès de qui il est très agréable et très enrichissant de travailler.

Un grand merci à Mme Aline BOUSSARD, ingénieur d'études au C.N.A.M., pour ses encouragements, ses remarques toujours très pertinentes, sa disponibilité. Même débordée, la formation des étudiants et la transmission de son savoir passe toujours avant tout, c'est remarquable.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à M. Jacques NICOLAS, professeur Emérite au C.N.A.M., qui est un puits de connaissances ! Merci pour sa sympathie, son humour et son optimisme qui était parfois bien nécessaire ! Ses qualités pédagogiques et scientifiques sont immenses.

Durant mon stage, ces trois personnes m'ont particulièrement bien encadrée, aussi bien pendant les expérimentations que pendant la rédaction de mon mémoire. Merci pour leur grande disponibilité, leur gentillesse, leurs conseils et la transmission de leur passion. J'ai vraiment pris grand plaisir à travailler avec eux, nos réunions étaient toujours très enrichissantes, la transmission des connaissances passant des uns aux autres.

Je remercie les membres du jury, Mme Sylvie DAVIDOU et Mme Wafa GUIGA, maîtres de conférences au C.N.A.M. de PARIS, Mme Marie-Noëlle MAILLARD, professeure à AgroParisTech de Massy, Mme Aline BOUSSARD, Mme Anne-Marie RIQUET et M. Jacques NICOLAS pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je souhaiterais également adresser ma gratitude aux maîtres de conférences du C.N.A.M. de Paris, Mme Sylvie DAVIDOU, Mme Rebeca GARCIA, Mme Wafa GUIGA, Mme Marion POMMET et M. Jacques NICOLAS, sans lesquels je ne serais pas arrivée là !

Je tiens également à remercier l'équipe du laboratoire I.A.A. du C.N.A.M., avec laquelle j'ai passé de bons moments, et l'équipe I2MC d'AgroParisTech de Massy. Merci à Cédric PLESSIS pour m'avoir aidée à mettre en place mon système d'expérimentations, et à Flavien LECOURTIER pour avoir égayé certaines de mes journées et pour m'avoir aidée à de nombreuses reprises ! Je remercie également Nina pour nos pauses café, un super instant de détente qui nous a beaucoup aidées !

Mes remerciements s'adressent aussi à mes anciens collègues de l'hôpital Saint Antoine, qui m'ont toujours soutenue dans cette aventure des cours du soir au C.N.A.M. et qui ne m'ont pas oubliée ! Leurs encouragements réguliers me font chaud au cœur.

Mes remerciements vont également à ma famille pour leur soutien, leurs encouragements. Un merci particulier à Bader pour m'avoir épaulée, soutenue et pour son réconfort quotidien.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	10
I. TRAVAUX ANTERIEURS.....	13
I.1. OXYDATION DES LIPIDES.....	13
I.1.1 MECANISME DE L'OXYDATION DES LIPIDES.....	13
I.1.2 VOIE ENZYMATIQUE D'OXYDATION DES LIPIDES.....	16
I.1.3 METHODES DE SUIVI DE L'OXYDATION DES LIPIDES.....	19
I.1.3.1 Mesure de la consommation des substrats d'oxydation.....	21
I.1.3.2 Mesure des peroxydes formés.....	22
I.1.3.3 Mesure des produits de décomposition des peroxydes.....	26
I.1.3.3.1 Dosage des composés volatils.....	26
I.1.3.3.2 Dosage des composés carbonylés.....	27
I.1.3.3.3 Dosage des composés polaires.....	30
I.1.4 INCONVENIENTS DES METHODES DE SUIVI DE L'OXYDATION DES LIPIDES.....	30
I.1.4.1 Mesure de la consommation des substrats d'oxydation.....	30
I.1.4.2 Mesure des peroxydes formés.....	31
I.1.4.3 Mesure des produits de décomposition des peroxydes.....	32
I.2 APPORTS DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE.....	33
I.2.1 PRINCIPE DE LA RPE.....	33
I.2.2 CONDITIONS DE DETECTION DES RADICAUX LIPIDIQUES PAR RPE.....	35
I.2.3 DETECTION DIRECTE DES RADICAUX.....	36
I.2.4 SPIN TRAPPING.....	36
I.2.5 SPIN SCAVENGING.....	40
I.2.6 APPLICATIONS INDUSTRIELLES.....	42
I.3 CONCLUSION.....	43
II. MATERIELS ET METHODES.....	45
II.1 MATERIELS.....	45
II.1.1 EQUIPEMENT.....	45
II.1.2 LES PRODUITS.....	45
II.1.3 LES LIPOXYGENASES.....	45
II.1.4 L'ACIDE LINOLEIQUE.....	45
II.1.5 LES HYDROPEROXYDES.....	45
II.1.6 LES PIEGEURS DE SPIN.....	46
II.1.7 LES SOLUTIONS TAMPON.....	46
II.1.8 LA SOLUTION DE TWEEN 20.....	46
II.1.9 SUBSTRAT « RAPPORT MOLAIRE 4 » ou RM4.....	46
II.1.10 LES ANTIOXYDANTS.....	47
II.2 DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....	47
II.2.1 POLAROGRAPHIE.....	47
II.2.2 SONDE FLUORESCENTE.....	48
II.3 SUIVI DE LA FORMATION DES ADDUITS POBN PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV.....	49
II.4 SUIVI DES ESPECES RADICALAIRES PAR RPE.....	49
II.4.1 ESSAIS AVEC LE POBN COMME PIEGEUR DE SPIN.....	49
II.4.1.1 En présence d'oxygène.....	49
II.4.1.2 En absence d'oxygène.....	50
II.4.2 ESSAIS AVEC LE TEMPOL COMME PIEGEUR DE SPIN.....	50
II.4.2.1 Préparation de la gamme d'étalonnage.....	50
II.4.2.2 En présence d'oxygène.....	50
II.4.2.3 En absence d'oxygène.....	51

III. RESULTATS.....	52
III.1 EXPERIMENTATIONS AVEC LE POBN (<i>SPIN TRAPPING</i>).....	52
III.1.1 REACTIVITE DES RADICAUX GENERES EN PHASE AEROBIE.....	55
III.1.1.1 Etude par spectroscopie UV.....	55
III.1.1.2 Etude par spectroscopie de RPE.....	61
III.1.1.2.1 Effet de l'éthanol sur la production d'adduits.....	61
III.1.1.2.2 Cinétique d'apparition des adduits.....	62
III.1.1.2.3 Effet de la quantité de lipoxygénase sur la production des adduits.....	63
III.1.1.2.4 Effet de la durée de la phase aérobie sur la production des adduits.....	64
III.1.2 REACTIVITE DES RADICAUX GENERES EN PHASE ANAEROBIE.....	67
III.1.2.1 Etude par spectroscopie UV.....	67
III.1.2.1.1 Effet de la durée de la phase aérobie sur la consommation du POBN.....	67
III.1.2.1.2 Dégradation de l'activité enzymatique pendant la phase aérobie.....	70
III.1.2.1.3 Effet de la teneur en POBN.....	71
III.1.2.1.4 Effet de la dilution du milieu.....	72
III.1.2.2 Etude par spectroscopie de RPE.....	73
III.2 EXPERIMENTATIONS AVEC LE TEMPOL (<i>SPIN SCAVENGING</i>).....	76
III.2.1 PROPRIETES DU TEMPOL.....	76
III.2.2 REACTION ANAEROBIE.....	79
III.2.2.1 Lipoxygénase de soja à pH 9.....	79
III.2.2.1.1 Effet de la quantité d'enzyme sur la vitesse de la réaction.....	79
III.2.2.1.2 Effet des concentrations en substrats sur la vitesse de la réaction.....	81
III.2.2.1.3 Stœchiométrie de la réaction.....	87
III.2.2.1.4 Effet de composés antioxydants phénoliques.....	94
III.2.2.2 Lipoxygénases à pH 6,5.....	99
III.2.2.2.1 Effet de la quantité d'enzyme sur la vitesse de la réaction...100	
III.2.2.2.2 Effet des concentrations en substrats sur la vitesse de la réaction.....103	
III.2.2.2.3 Effet de l'ajout d'un composé antioxydant phénolique : le BHT.....104	
III.2.3 REACTION AEROBIE.....	105
III.2.3.1 Lipoxygénase de soja à pH 9.....	105
III.2.3.1.1 Effet de la quantité d'enzyme sur la consommation du TEMPOL en milieu aérobie.....106	
III.2.3.1.2 Effet de la quantité d'enzyme sur la consommation d'oxygène en milieu aérobie.....109	
III.2.3.1.3 Effet des concentrations en substrat (acide linoléique et oxygène.....110	
III.2.3.1.4 Effet de l'ajout d'éthanol.....115	
III.2.3.1.5 Effet de l'ajout de BHT.....116	
III.2.3.2 Lipoxygénases à pH 6,5.....	117
CONCLUSION.....	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	124
ANNEXE.....	131

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général de l'oxydation des lipides. D'après CHEFTEL <i>et al.</i> (2003).	15
Figure 2 : Schéma réactionnel de la lipoxigénase de soja dans des conditions aérobie et anaérobie à pH 9. D'après DE GROOT <i>et al.</i> (1975).	18
Figure 3 : Consommation en O ₂ des lipides purs et cinétique d'apparition et de disparition de composés au cours de la réaction d'oxydation des lipides (BAUER <i>et al.</i> , 2010).	19
Figure 4 : Chromatogramme des substances volatiles d'une huile de soja après un stockage pendant 8 jours à 60 °C (a) comparé à celui de l'huile fraîche (b) (BAUER <i>et al.</i> , 2010).	27
Figure 5 : Evolution du profil de l'odeur au cours de l'oxydation de l'huile (VILLIERE <i>et al.</i> , 2006).	29
Figure 6 : Effet d'un champ magnétique sur un niveau d'énergie (COLLIN, 2008).	34
Figure 7 : Spectre d'absorption (A) et dérivée première (B).	34
Figure 8 : Spectre RPE du radical TEMPO et structure chimique du radical TEMPO.	35
Figure 9 : Composé nitroso et formation d'un adduit de spin à partir d'un composé nitroso (exemple du 2-méthyl-2-nitroso-propane).	37
Figure 10 : Composé nitronne et formation d'un adduit de spin à partir d'un composé nitronne (exemple du PBN).	38
Figure 11 : Molécule de PBN (A) et exemple de spectre RPE d'un adduit de spin PBN (B).	38
Figure 12 : Détermination de la phase de latence. C'est la période de temps avant laquelle il y a une brutale augmentation du signal (d'après PAPADIMITRIOU <i>et al.</i> , 2006).	39
Figure 13 : Piégeage d'un radical lipidique R [•] par le DPPH (composé radicalaire stable) avec formation d'une espèce non paramagnétique.	41
Figure 14 : Cinétique de disparition d'un radical stable en présence de deux antioxydants différents (1 et 2) (d'après ROHN et KROH, 2005).	42
Figure 15 : Spectre du POBN (50 µM) en solution dans le tampon borate pH 9.	54
Figure 16 : Evolution du spectre UV pendant les dix premières min. de l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique en absence de POBN ou en présence de 50 µM de POBN.	56
Figure 17 : Evolutions de l'oxygène et des absorbances à 234, 285 et 330 nm pendant l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique en présence de POBN suivies en polarographie et en spectrophotométrie.	57
Figure 18. : Effet de la présence de POBN (50 µM) sur la vitesse maximale d'augmentation de l'absorbance à 285 nm.	59
Figure 19 : Vitesse maximale de diminution de l'absorbance à 330 nm en fonction de la vitesse maximale d'augmentation de l'absorbance à 285 nm en présence de POBN (50 µM).	60
Figure 20 : Evolution des espèces paramagnétiques après 5 min d'agitation.	62
Figure 21 : Influence de la quantité de LOX ajoutée sur l'évolution des espèces paramagnétiques.	64
Figure 22 : Influence du temps d'agitation sur l'évolution des espèces paramagnétiques.	65
Figure 23 : Evolution des absorbances à 285 nm et 330 nm lors de la réaction anaérobie en milieu dilué.	68
Figure 24 : Evolution des absorbances à 285 nm et 330 nm lors de la réaction anaérobie en milieu dilué.	69

Figure 25 : Evolution de l'absorbance à 285 nm pendant la phase anaérobie en fonction de la quantité de LOX soja ajoutée au début de cette phase.	70
Figure 26 : Influence de la quantité de LOX soja ajoutée sur la vitesse maximale d'augmentation de l'absorbance à 285 nm pendant la réaction anaérobie.	71
Figure 27 : Spectres UV du milieu réactionnel après 0, 4, 6, 8, 10, 12 et 15 min. de réaction en milieu concentré.	72
Figure 28 : Evolution des espèces paramagnétiques issues de la réaction anaérobie catalysée par la lipoxygénase de soja.	74
Figure 29 : Evolution des espèces paramagnétiques issues de la réaction anaérobie catalysée par la LOX soja.	74
Figure 30 : Spectre du TEMPOL (0,3 mM) en tampon borate pH 9.	77
Figure 31 : Courbe d'étalonnage du TEMPOL dans du tampon borate pH 9.	78
Figure 32 : Influence de la quantité d'enzyme sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction anaérobie de la LOX soja à pH 9.	80
Figure 33 : Vitesse maximale de la réaction anaérobie à pH 9 en fonction de la quantité de LOX soja introduite.	81
Figure 34 : Influence de la concentration en 13-LOOH ajouté sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction anaérobie de la LOX soja à pH 9.	82
Figure 35 : Représentation en double inverse des vitesses initiales des réactions en fonction des concentrations en LOOH à différentes concentrations en LH.	84
Figure 36 : Schéma réactionnel du mécanisme séquentiel au hasard.	85
Figure 37 : Graphes secondaires donnant $1 / V_{\text{mapp}}$ (Δ) d'une part et la pente ($\diamond$) d'autre part en fonction de l'inverse de la concentration en acide linoléique (LH).	86
Figure 38 : Influence de la concentration en 13-LOOH ajouté sur la consommation du TEMPOL présent en excès pendant la réaction anaérobie de la LOX soja à pH 9.	89
Figure 39 : Effet de la concentration en 13-LOOH ajoutée sur la concentration résiduelle en TEMPOL en fin de réaction anaérobie.	90
Figure 40 : Influence de la concentration en acide linoléique ajouté sur la consommation du TEMPOL présent en excès pendant la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9. ...	91
Figure 41 : Effet de la concentration en acide linoléique ajoutée sur la concentration résiduelle en TEMPOL en fin de réaction anaérobie.	92
Figure 42 : Mécanisme réactionnel de la lipoxygénase de soja d'après DE GROOT et <i>al.</i> (1975).	93
Figure 43 : Influence de l'ajout de BHT sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.	95
Figure 44 : Inverse de la vitesse maximale de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9 en fonction de l'inverse de la concentration en hydroperoxyde en absence ou en présence de BHT.	96
Figure 45 : Effet de la teneur en BHT sur la valeur du K_{mapp}	97
Figure 46 : Vitesses maximales de la réaction anaérobie avec un substrat « RM4 » à pH 6,5 en fonction de différentes quantités de LOX introduites exprimées par la vitesse mesurée en milieu aérobie à pH 6,5 en absence de TEMPOL.	101
Figure 47 : Suivi de la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.	106

Figure 48 : Effet de la quantité d'enzyme sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.	107
Figure 49 : (A) Effet de la quantité d'enzyme sur l'inverse de la durée de la première phase de la réaction aérobie et (B) sur la vitesse de la consommation du TEMPOL dans la deuxième phase de la réaction aérobie ($\diamond$) et dans la réaction anaérobie (Δ) de la lipoxygénase de soja à pH 9.	108
Figure 50 : Effet de la quantité de lipoxygénase de soja sur la consommation d'oxygène à pH 9.	109
Figure 51 : Relation entre la quantité de lipoxygénase de soja et la vitesse maximale de consommation d'oxygène à pH 9.	110
Figure 52 : Influence de la concentration en acide linoléique ajouté sur la consommation de l'oxygène pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.	111
Figure 53 : Représentation en double inverse des vitesses instantanées des réactions en fonction des concentrations en acide linoléique à différentes concentrations en oxygène.	112
Figure 54 : Mécanisme aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.	112
Figure 55 : Graphes secondaires donnant $1 / V_{\text{mapp}}$ (Δ) d'une part et la pente ($\diamond$) d'autre part en fonction de l'inverse de la concentration en oxygène.	113
Figure 56 : Influence de la concentration en acide linoléique ajouté sur la consommation de l'oxygène pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.	115
Figure 57 : Effet de l'ajout de BHT sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.	116
Figure 58 : Suivi de la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie des lipoxygénases de blé, fève et soja à pH 6,5 et de la lipoxygénase de soja à pH 9.	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractère organoleptique et seuil de perception des principaux aldéhydes formés par l'oxydation des lipides (BAUER <i>et al.</i> , 2010).	29
Tableau II : Influence de l'ajout de POBN sur l'activité de la lipoxygénase de soja à pH 9.	54
Tableau III : Influence de la teneur en LH, de la quantité de LOX soja et de la présence de POBN sur la durée de la phase aérobie et les vitesses maximales d'augmentation de l'absorbance à 285 nm et de diminution de l'absorbance à 330 nm.....	58
Tableau IV : Calculs théoriques de formation des hydroperoxydes.	66
Tableau V : Paramètres cinétiques de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja en solution dans un tampon borate à pH 9.	86
Tableau VI : Constante d'inhibition apparente de différents composés phénoliques vis-à-vis de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9 en présence d'acide linoléique 1 mM.	98
Tableau VII : Activité aérobie à pH 6,5 des lipoxygénases de soja, blé et fève.	100
Tableau VIII : pH optimum de la réaction aérobie et pourcentage de chaque hydroperoxyde produit en présence d'oxygène par les lipoxygénases de soja, fève et blé (NICOLAS et DRAPRON, 1981).	102
Tableau IX : Paramètres cinétiques de la réaction anaérobie des lipoxygénases de soja et de fève à pH 6,5.	103
Tableau X : Comparaison des vitesses des réactions aérobie (mesure expérimentale) et anaérobie (calculées à partir des paramètres du Tableau IX) des lipoxygénases du soja à pH 6,5 et 9 et de la fève à pH 6,5.	104
Tableau XI : Constante d'inhibition apparente du BHT vis-à-vis de la réaction anaérobie des lipoxygénases de soja à pH 6,5 et à 9 et de la fève à pH 6,5 en présence d'acide linoléique 1 mM.	104
Tableau XII : Effet de la quantité d'enzyme sur la durée de la première phase et sur la vitesse de consommation du TEMPOL pendant la deuxième phase.	107
Tableau XIII : Paramètres cinétiques de la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja en solution dans un tampon borate à pH 9.	114
Tableau XIV : Relations entre les vitesses de consommation d'oxygène v_{O_2} (réaction aérobie) et les vitesses de consommation du TEMPOL v_{TEMPOL} pendant la réaction anaérobie et pendant la réaction aérobie (deuxième phase) pour les lipoxygénases de soja, blé et fève à pH 6,5 et pour la lipoxygénase de soja à pH 9.	119

LISTE DES ABREVIATIONS

AAPH	Dihydrochlorure de 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
AOM	<i>Active Oxygen Method</i>
BHT	2,6 di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxytoluène
BMPO	5- <i>tert</i> -butoxycarbonyl 5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde
B-PE	B-Phycoérythrine
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DMPO	5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde
DPPH	1,1-diphényl-2-pyrril-hydrazil
DPPP	Diphényl-1-pyrénylphosphine
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
EMPO	5-éthoxycarbonyl-5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPLC/DAD	Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV à barrette de diode
HPLC/MS	Chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse
IP	Indice de peroxyde (ou POV : <i>peroxide value</i>)
MDA	Acide malondialdéhyde
NO [•]	Radical nitroxy
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i> (capacité d'absorption des radicaux oxygénés)
OSI	<i>Oil stability index</i>
PBN	α-phényl-N- <i>tert</i> -butylnitrone
POBN	α-(4-pyridyl-1-oxyde)-N- <i>tert</i> -butylnitrone
L [•]	Radical alkyle
LH	Acide linoléique
LO [•]	Radical oxyle
LOO [•]	Radical peroxy
LOOH	Hydroperoxyde
LOX	Lipoxygénase
RPE	Résonance paramagnétique électronique
TBA	Acide thiobarbiturique
TBArs	<i>Thiobarbituric acid-reactive substances</i> (substances réagissant avec le TBA)
TEMPO	2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl
UA	Unité d'absorbance
UA-RPE	Unité arbitraire de RPE
UV	Ultraviolet

INTRODUCTION

Les lipides sont présents dans la plupart des aliments, à des taux très variables allant de 1 à 2 % pour des farines à quasiment 100 % pour les huiles. Seuls quelques changements mineurs dans ces fractions lipidiques peuvent affecter la valeur nutritionnelle, les propriétés sensorielles et fonctionnelles des produits alimentaires.

Les lipides présents dans les aliments sont plutôt instables à la chaleur et supportent mal le stockage à température ambiante, ou à des températures plus basses, dans la mesure où ils s'oxydent facilement.

La dégradation des lipides par l'oxygène moléculaire est une cause majeure de la détérioration des aliments pendant le stockage. L'oxydation des lipides pose un problème particulier dans les aliments à longue conservation comme les aliments déshydratés et surgelés. Les industriels doivent donc comprendre ce phénomène pour mieux le maîtriser car les consommateurs sont de plus en plus exigeants et réclament des produits frais, sains et à longue durée de conservation.

L'oxydation se traduit par une perte de la valeur nutritionnelle et par la détérioration des qualités sensorielles. C'est ce qu'on appelle le rancissement. La première manifestation de la dégradation oxydative est souvent la dénaturation de l'arôme. C'est le cas des jus d'agrumes ou des boissons contenant des huiles essentielles d'agrumes qui perdent leur goût en raison de l'oxydation du limonène et du citral (SCHIEBERLE *et al.*, 1989). Les produits d'oxydation font partie de l'arôme désirable de la viande fraîchement cuite mais le goût de rance développé pendant le stockage de viandes précuites est dû principalement à ces mêmes produits issus de l'oxydation, en quantité plus grande. La progression typique de l'oxydation est la perte de fraîcheur, l'apparition d'un goût de carton, puis le développement de la flaveur rance (KANNER, 1994).

Le développement du rancissement et d'autres mauvais goûts est la manifestation la plus connue de l'oxydation lipidique. Les produits primaires de l'oxydation, les hydroperoxydes, n'ont ni odeur ni goût, ce sont les produits secondaires résultant de leur décomposition qui sont responsables de la perception du rance. Les produits secondaires ont normalement un seuil de détection très bas, c'est-à-dire qu'à des concentrations très faibles ils peuvent donner un mauvais goût ou une mauvaise odeur à un aliment. Le niveau auquel un aliment est sensoriellement rance varie considérablement : on perçoit les mauvais goûts dans les aliments fades comme les produits laitiers, mais la saveur plus prononcée d'autres aliments peut masquer les défauts de goût, ce qui est le cas par exemple des boissons chocolatées maltées.

Une oxydation de seulement 0,0001 % d'une graisse contenue dans un aliment peut être suffisante pour que ce dernier soit rance.

L'oxydation affecte aussi la couleur. Beaucoup de pigments, comme par exemple les caroténoïdes, sont oxydés par les peroxydes qui se forment pendant l'oxydation des lipides (FINLEY *et al.*, 1986). L'oxydation diminue aussi la valeur nutritionnelle des aliments. Ces pertes concernent les acides gras essentiels (acide linoléique, acide linolénique...) et certaines vitamines (de type tocophérols (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C), rétinol (vitamine A)...). Les vitamines A, C et E sont aussi des antioxydants : en présence de lipides, elles sont préférentiellement oxydées ce qui épargne les lipides. Cela prolonge la période d'induction avant l'apparition de l'odeur rance d'une huile et augmente la durée de conservation d'un aliment. Cette activité antioxydante est désirable mais elle provoque leur destruction et donc conduit à une diminution de la valeur nutritionnelle.

La stabilité oxydative d'un aliment ne dépend donc pas seulement de sa composition en acides gras, mais aussi de sa teneur naturelle en antioxydants. La quasi-totalité des huiles, graisses et produits alimentaires contient des antioxydants naturels. Ces derniers incluent la vitamine E, les polyphénols et en particulier les flavonoïdes ainsi que certains produits issus de la réaction de Maillard. En général, les huiles végétales contiennent une quantité de tocophérols non négligeable. Si elles sont traitées et conservées correctement, elles peuvent être considérées comme stabilisées de façon optimale. A l'opposé, les graisses animales et les huiles d'animaux marins ne contiennent que peu d'antioxydants dont la teneur est fonction de l'alimentation de l'animal. Pour un même degré d'insaturation, ces matières grasses sont moins stables que l'équivalent végétal. C'est pourquoi on les protège par addition d'antioxydants, ce qui augmente considérablement leur stabilité.

L'oxydation des lipides est donc un phénomène important à comprendre, à connaître et à maîtriser car elle a des impacts nutritionnels, organoleptiques, sanitaires (les composés secondaires peuvent développer des effets cytotoxiques, mutagènes et cancérigènes) et économiques (pertes de valeur marchande) (RAHMANI M., 2007). De nombreuses méthodes de mesure sont aujourd'hui disponibles pour suivre l'avancement des réactions d'oxydation des lipides. En revanche, même si les principaux mécanismes mis en jeu lors de l'oxydation sont relativement bien connus, il est quasiment impossible de prédire l'avancement de ces réactions en cas de changement d'un ou de plusieurs facteurs (concentration initiale en réactifs, température, présence d'inducteurs de l'oxydation...). Disposer d'outils prédictifs serait une solution efficace pour gérer l'évolution et la stabilité des aliments.

Dans ce contexte, l'objet de notre travail est d'une part de développer une méthodologie permettant l'identification, la quantification et la mesure de la réactivité des intermédiaires clés (radicaux) impliqués dans l'oxydation des lipides, et d'autre part d'acquérir une meilleure connaissance des réactions de co-oxydation de composés réducteurs (composés phénoliques) afin de proposer des solutions fiables pour maîtriser et / ou améliorer la qualité des aliments. Pour avancer dans cette connaissance, nous avons étudié par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) les espèces radicalaires générées lors de l'oxydation d'un acide gras polyinsaturé (l'acide linoléique) par la lipoxygénase (E.C.1.13.11.12). Plusieurs raisons expliquent le choix de cette enzyme comme catalyseur de l'oxydation : elle permet de former des radicaux libres à une vitesse mesurable et ajustable à température normale, elle permet l'étude de la réactivité des radicaux dans un environnement qui peut être aisément modifié, notamment en ce qui concerne la disponibilité en oxygène et la nature des composants susceptibles d'être co-oxydés. De plus, l'action de cette enzyme a de nombreuses répercussions en panification en raison des réactions d'oxydation couplées impliquant notamment les pigments caroténoïdes et les composés phénoliques et thiols qu'elle induit au cours des pétrissages des pâtes de farine de blé (NICOLAS et DRAPRON, 1983 ; BRIJS *et al.*, 2010).

L'ensemble de ce travail est présenté en trois chapitres. Le premier vise à établir l'état de l'art sur ce sujet : après un bref rappel sur les mécanismes de l'oxydation lipidique, un tour d'horizon sur les méthodes couramment employées pour mesurer cette oxydation sera réalisé avant de présenter l'apport possible de la résonance paramagnétique électronique dans ce domaine.

Le deuxième chapitre est consacré aux matériels et méthodes utilisés. La description du dispositif expérimental y est établie ainsi que les méthodes retenues pour suivre la formation des radicaux formés durant l'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase.

Enfin, le troisième chapitre rassemble les résultats des expérimentations et leurs analyses. Ce chapitre est séparé en deux parties selon le piègeur de radicaux utilisé. Dans chaque partie les résultats sont regroupés en fonction des conditions opératoires des réactions d'oxydation, à savoir réactions en présence ou non d'oxygène.

I. TRAVAUX ANTERIEURS

I.1 OXYDATION DES LIPIDES

I.1.2 MECANISMES DE L'OXYDATION DES LIPIDES

Les réactions d'oxydation des lipides entraînent la formation de composés volatils d'odeur désagréable. Les principaux substrats de l'oxydation sont les acides gras insaturés; ils s'oxydent en général plus vite à l'état libre que lorsqu'ils sont engagés dans les triacylglycérols ou les phospholipides. De plus, la vitesse d'oxydation augmente avec le degré d'insaturation. En dessous de 60 °C, les acides gras saturés ne s'oxydent pas alors que les polyinsaturés peuvent s'oxyder même à l'état congelé. D'autres substrats non saturés peuvent subir des réactions d'oxydation comme les vitamines A et E, les pigments caroténoïdes et certains hydrocarbures présents dans les huiles (ALAIS *et al.*, 2008).

On distingue dans l'oxydation des lipides trois types de réactions (réactions en chaîne) :

➤ Les réactions d'initiation

Ces réactions conduisent à la formation de radicaux libres (arrachement d'un hydrogène) ou d'alkyls lipidiques ($R^\bullet$) à partir d'acides gras non saturés. Cette formation directe de radicaux libres est favorisée par des températures élevées mais surtout par la lumière et par les traces de certains métaux (catalyseurs métalliques). Il s'agit de l'initiation primaire :

- catalyse par les métaux : $RH + M^{(n+1)+} \rightarrow R^\bullet + H^+ + M^{n+}$
- catalyse par des photosensibilisateurs : $^3O_2 \rightarrow ^1O_2$

La conversion de l'oxygène triplet en oxygène singulet se fait par les photons (hv) en présence d'un photosensibilisateur X tel que des composés hématiniques (chlorophylle, hémoglobine...) et des flavines (riboflavine). L'oxygène singulet 1O_2 peut agir très rapidement sur les acides gras polyinsaturés contrairement à l'oxygène triplet 3O_2 . Puis:



- catalyse par la lipoxygénase : $RH + ^3O_2 \rightarrow ROOH$

En fait, le procédé majeur d'initiation se fait via la scission des hydroperoxydes ROOH. Il s'agit de l'initiation secondaire :

- mécanisme monomoléculaire : $ROOH \rightarrow RO^\bullet + HO^\bullet$
- mécanisme bimoléculaire : $2 ROOH \rightarrow ROO^\bullet + RO^\bullet + H_2O$ (plus probable)
- intervention des métaux :
 $ROOH + M^{(n+1)+} \rightarrow ROO^\bullet + H^+ + M^{n+}$
 $ROOH + M^{n+} \rightarrow RO^\bullet + OH^- + M^{(n+1)+}$

La scission des hydroperoxydes catalysée par les ions métalliques est la principale source de radicaux libres.

➤ **Les réactions de propagation**

Ces réactions constituent l'étape d'oxydation des lipides insaturés par l'oxygène gazeux. Elles se caractérisent par une accumulation de peroxydes et font apparaître et disparaître un nombre équivalent de formes radicalaires. Les radicaux libres lipidiques sont très réactifs et peuvent entrer dans des réactions de propagation soit en extrayant un atome d'hydrogène d'une autre molécule lipidique, soit en incorporant une molécule d'oxygène à l'état triplet :



En présence d'oxygène, la réaction (2) est très rapide par rapport aux réactions (1) et (3). Par conséquent, la concentration en $ROO^{\bullet}$ sera bien plus forte que celle de $R^{\bullet}$ dans les milieux alimentaires où la teneur en oxygène n'est pas nulle.

La réaction (3) est également rapide : les hydroperoxydes $ROOH$ ainsi formés vont pouvoir participer à la phase d'initiation secondaire vue précédemment.

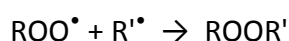
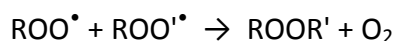
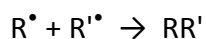
Le bilan des réactions (2) et (3) montrent bien que le nombre de radicaux libres reste constant et que le nombre de peroxydes augmente. La propagation correspond donc à une peroxydation des lipides. De plus, cette réaction est autocatalytique.

Dans le cas de lipides purs, l'intervention d'un radical libre peut provoquer la formation de 10 à 100 molécules de peroxydes (ALAIS *et al.*, 2008).

L'énergie d'activation de ces réactions est très faible.

➤ **Les réactions de terminaison**

Au cours de ces réactions, les radicaux libres s'associent pour donner des composés non radicalaires très divers. Cela débute en même temps que les réactions d'initiation et de propagation, lorsque la teneur en radicaux libres devient importante. Ces réactions de terminaison aboutissent à la formation de cétones, d'alcools, d'hydrocarbures polymérisés, d'éthers et de peroxydes internes (la formation de ces derniers est favorisée par de fortes teneurs en oxygène) :



Les hydroperoxydes se décomposent spontanément autour de 160 °C ce qui génère de fortes concentrations en radicaux libres : cela favorise les réactions de terminaison (formation de polymères).

La Figure 1 présente un récapitulatif des mécanismes d'oxydation des lipides.

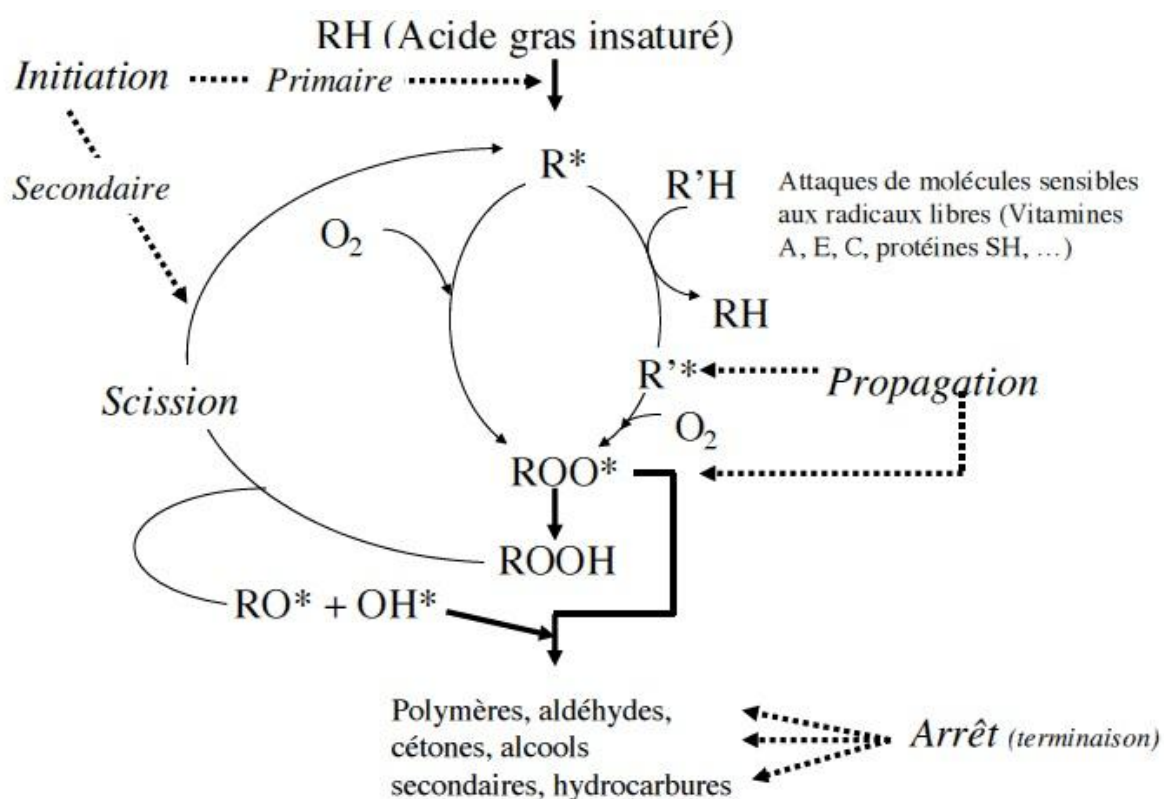


Figure 1 : Schéma général de l'oxydation des lipides. D'après CHEFTEL *et al.* (2003).

Les aldéhydes et les cétones de faible masse moléculaire produits sont responsables de l'odeur rance : c'est la première altération qui se manifeste d'autant que certains d'entre eux, comme l'hexanal par exemple, sont perçus à de très faibles concentrations, de l'ordre du microgramme par litre. Par ailleurs, les composés carbonylés peuvent réagir avec les protéines ou plus généralement favoriser le brunissement non enzymatique. La présence de lipides peut aussi provoquer l'oxydation secondaire de divers arômes.

Différents facteurs peuvent influencer l'oxydation des lipides. Au stade initial, une réduction de la pression d'oxygène freine l'oxydation. Au contraire, la présence d'agents pro-oxydants comme les métaux, l'hémoglobine, la chlorophylle, les lipoxygénases l'accélère. L'activité de l'eau joue également un rôle (d'elle dépend l'action catalytique des métaux, ainsi que la nature et le degré de dispersion des lipides).

Les aliments peuvent contenir des antioxydants. HALLIWELL (1990) définit les antioxydants comme "toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat".

Parmi les antioxydants naturels, on peut citer le tocophérol, l'acide ascorbique, certains acides aminés et protéines, certaines substances susceptibles de complexer les métaux. Classiquement, les antioxydants sont classés en deux groupes suivant le mécanisme impliqué :

- les antioxydants primaires (type I). Il s'agit de composés capables d'interrompre la réaction en chaîne en piégeant les radicaux libres (*chain breaking compounds*). Ils sont capables de bloquer le processus radicalaire en transformant les radicaux libres en composés non radicalaires tout en donnant eux-mêmes des formes plus stables.

- les antioxydants secondaires (type II ou préventifs). Ce sont des composés qui diminuent la vitesse d'initiation par différents mécanismes. En fait il s'agit de tous les composés qui retardent l'oxydation des lipides par d'autres mécanismes que la rupture de la chaîne d'autoxydation par piégeage des radicaux libres. Ils peuvent agir par des mécanismes très divers :

- agents séquestrant des catalyseurs métalliques
- piégeurs d'oxygène
- produits décomposant les hydroperoxydes en espèces non radicalaires
- absorbeurs de radiations UV
- désactivateur d'oxygène singulet

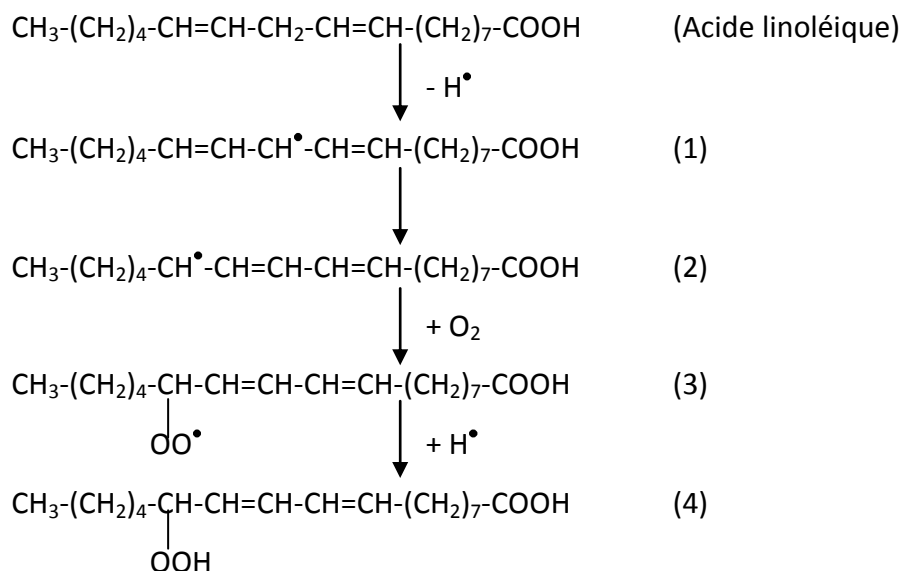
Tout antioxydant peut devenir pro-oxydant. Par exemple, l'acide ascorbique a un effet pro-oxydant en présence de fer. L' α -tocophérol est, quant à lui, pro-oxydant à fortes concentrations. Les flavonoïdes comme la quercétine ou la myricétine peuvent également présenter des propriétés pro-oxydantes (CILLARD *et al.*, 2006).

1.1.2 VOIE ENZYMATIQUE D'OXYDATION DES LIPIDES

L'oxydation des lipides peut être catalysée, comme vu précédemment, par la lipoxygénase. De nombreuses revues bibliographiques ont été consacrées aussi bien aux propriétés de cette enzyme qu'à ses effets en technologie alimentaire notamment dans le domaine céréalier (DRAPRON et UZZAN, 1968 ; VELDINK *et al.*, 1977 et 1998 ; NICOLAS et DRAPRON, 1981 et 1983 ; WHITAKER, 1991 ; GARDNER, 1988 ; ROBINSON *et al.*, 1995 ; BAYSAL et DEMIRDOVEN, 2007).

La lipoxygénase (LOX) ou linoléate-oxygène oxydoréductase (EC 1.13.11.12), protéine à fer non hémunique, catalyse l'oxydation, par l'oxygène moléculaire, des acides gras polyinsaturés possédant le système de doubles liaisons non conjuguées cis-cis, 1-4 pentadiène avec le groupement méthylène intermédiaire en position ω 8, dans le cas de l'acide linoléique.

Les différentes étapes de la réaction aérobie catalysée par la lipoxygénase sont schématisées de façon simplifiée ci-dessous :



La première étape correspond à l'élimination d'un radical hydrogène sur le carbone en position $\omega 8$ (1). Elle est suivie de la migration de l'une des doubles liaisons conduisant à la formation de doubles liaisons conjuguées cis-trans (2). Un biradical oxygène se fixe ensuite sur le carbone situé en $\omega 6$ ou $\omega 10$ (3). La fixation d'un radical hydrogène va finalement conduire à un hydroperoxyde (4). Les hydroperoxydes possèdent un maximum d'absorbance à 234 nm. Ce schéma réactionnel correspond à un mécanisme séquentiel ordonné dans lequel l'acide gras se fixe d'abord pour former un complexe enzyme-acide gras qui fixe ensuite l'oxygène pour donner un complexe ternaire enzyme-acide gras-oxygène qui libère dans la dernière étape l'hydroperoxyde (ROBINSON *et al.*, 1995). En milieu modèle, l'oxydation de l'acide linoléique conduit à la formation de 9 et / ou 13 hydroperoxydes en proportions variables selon le pH de la réaction et les origines de la lipoxygénase (NICOLAS et DRAPRON, 1981).

Par ailleurs, GARSSSEN *et al.* (1971) ont mis en évidence l'existence d'une réaction anaérobie catalysée par la lipoxygénase de soja (forme L_1 dont l'optimum d'activité est à pH 9). Cette enzyme, en absence d'oxygène, est capable d'oxyder l'acide linoléique en utilisant l'hydroperoxyde comme substrat oxydant. DE GROOT *et al.* (1975) ont proposé un schéma global des réactions aérobie et anaérobie catalysées par la lipoxygénase de soja (Figure 2). Ce schéma permet de rendre compte du rôle du fer dans la catalyse enzymatique, d'expliquer l'existence d'une phase de latence au début de la réaction aérobie tout en explicitant la nature des produits secondaires issus de la réaction anaérobie (oxodiènes, dimères, époxy-acides, pentane,...). Après passage de l'enzyme de l'état ferreux (enzyme native) à l'état ferrique (enzyme active) en présence d'hydroperoxydes, la lipoxygénase peut agir en présence

d'oxygène ou en absence d'oxygène. La réaction aérobie conduit à la formation d'hydroperoxydes à partir d'acide linoléique et d'oxygène alors que la réaction anaérobie en absence d'oxygène conduit à l'apparition de radicaux $L^\bullet$ à partir de l'acide linoléique et de radicaux $LO^\bullet$ à partir des hydroperoxydes (par scission de la fonction peroxyde). Ce sont ces radicaux qui mènent, par des réactions non enzymatiques, à la formation de produits secondaires tels que les dimères, les oxodiènes (produits absorbant à 285 nm), les époxyacides et le pentane (Figure 2). Par la suite, d'autres auteurs ont mis en évidence que les autres isoformes de lipoxygénase de soja mais aussi celles issues d'autres végétaux étaient capables de catalyser la réaction anaérobie (NICOLAS *et al.*, 1974 ; PATTEE *et al.*, 1974 ; SANDERS *et al.*, 1975 ; SINGLETON *et al.*, 1976).

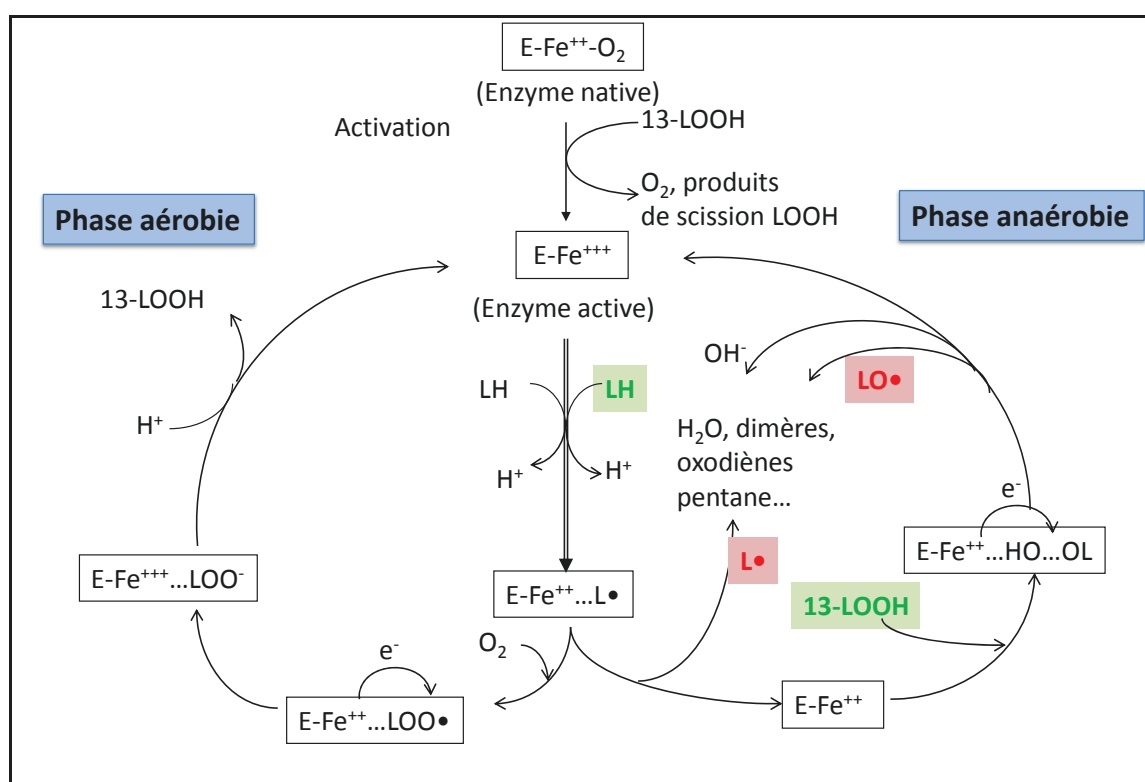


Figure 2 : Schéma réactionnel de la lipoxygénase de soja dans des conditions aérobie et anaérobie à pH 9. D'après DE GROOT *et al.* (1975).

En technologie céréalière et notamment dans le domaine de la panification, la lipoxygénase a de nombreuses répercussions (NICOLAS et DRAPRON, 1983 ; CASEY, 1997). Ainsi, durant le pétrissage, elle provoque l'oxydation des acides gras polyinsaturés, la décoloration des pigments caroténoïdes (ce qui conduit à un pain avec une mie blanche), la libération de lipides liés et la modification des propriétés rhéologiques de la pâte augmentant leur tolérance au surpétrissage et leur temps de relaxation pour aboutir à une augmentation du volume du pain (DANIELS *et al.*, 1968 ; MANN et MORRISON, 1975 ; FRAZIER, 1979 ; HOSENEY *et al.*, 1980 ; FAUBION et HOSENEY, 1981 ; GROSCH, 1986). L'effet améliorant de la

lipoxygénase pendant le pétrissage pourrait être dû à l'oxydation des fonctions thiols accessibles des protéines du gluten par les lipides oxydés enzymatiquement (GRAVELAND *et al.*, 1978 ; AVRAM *et al.*, 2003). Enfin, la lipoxygénase est susceptible de modifier l'arôme du pain par la formation d'aldéhydes volatils au cours de la cuisson issus de la dégradation thermique des hydroperoxydes formés pendant le pétrissage (DRAPRON et BEAUX, 1969 ; LUNING et ROOZEN, 1991 ; ADOO *et al.*, 1993).

I.1.3 METHODES DE SUIVI DE L'OXYDATION DES LIPIDES

Le rancissement est un phénomène d'oxydation des acides gras conduisant dans une première phase à des peroxydes (produits intermédiaires inodores) puis dans une deuxième phase à des produits de dégradation odorants (aldéhydes, cétones...) qui rendent les matières grasses impropres à la consommation.

La consommation d'oxygène des lipides purs et la formation des peroxydes, polymères et aldéhydes en fonction du temps permet d'apprécier les différentes étapes du processus de rancissement (Figure 3).

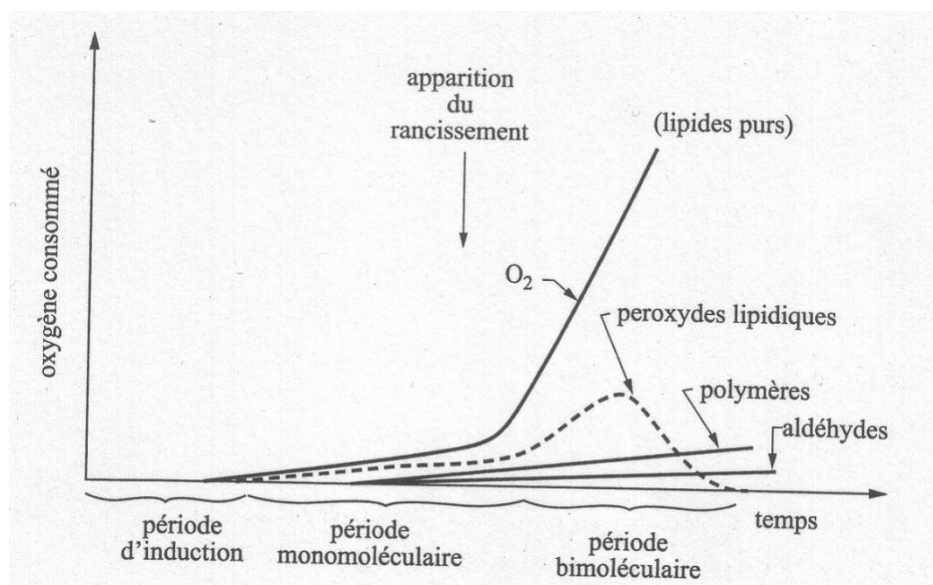


Figure 3 : Consommation en O₂ des lipides purs et cinétique d'apparition et de disparition de composés au cours de la réaction d'oxydation des lipides (BAUER *et al.*, 2010).

On observe une période d'induction pendant laquelle l'oxydation se déroule lentement suivie d'une accélération brutale de l'oxydation des lipides avec, dans un premier temps, une accumulation de peroxydes qui seront ensuite décomposés en petites molécules volatiles, ou condensés sous forme de polymères. L'apparition du rancissement intervient généralement en fin de période d'induction.

Déterminer le niveau d'oxydation ou la susceptibilité à l'oxydation d'un aliment lipidique n'est pas toujours aisé car les corrélations entre la concentration en indicateurs de l'oxydation et la détérioration organoleptique ou la durée de conservation d'un aliment ne sont pas toujours satisfaisantes. Les méthodes développées sont basées soit sur la mesure d'un ou d'une classe de produits issus de l'oxydation des lipides ce qui donne une indication du niveau d'oxydation à un instant donné, soit sur la mesure de la durée de la phase d'induction.

La durée de la phase d'induction correspond à la résistance à l'oxydation ou à la susceptibilité à l'oxydation d'un aliment. Elle s'évalue généralement par le temps nécessaire à partir duquel la vitesse d'oxydation augmente rapidement ou apparaît une flaveur rance.

Bien que les tests de résistance à l'oxydation pratiqués dans des conditions aussi proches que possibles des conditions de stockage des aliments soient les plus informatifs sur la stabilité d'un aliment, ils n'en demeurent pas moins inadaptés d'un point de vue pratique. Ainsi, la susceptibilité d'un aliment à l'oxydation est estimée par des tests d'oxydation accélérée dans des conditions standardisées. Le chauffage est souvent utilisé pour accélérer l'oxydation des lipides. Ces méthodes présentent un certain nombre d'inconvénients car la vitesse d'oxydation dépend de la concentration en oxygène dont la solubilité décroît avec l'élévation de température. De plus, les traitements thermiques peuvent entraîner la destruction d'antioxydants ou leur volatilisation et accélérer les réactions de polymérisation, de cyclisation ou de scission.

Il existe de nombreuses techniques d'évaluation de l'oxydation parmi lesquelles on retrouve notamment :

La consommation de substrat

- le suivi de la consommation d'oxygène
- le suivi de la disparition des acides gras

L'apparition des produits primaires de l'oxydation

- l'évaluation des radicaux libres
- le suivi de l'apparition des diènes conjugués
- le dosage du taux de peroxydes

L'apparition des produits secondaires de l'oxydation

- le dosage des composés carbonylés
- le dosage des composés volatils comme l'hexanal

Dans la plupart des études, les auteurs ne se limitent pas à une seule analyse mais en réalisent plusieurs en parallèle. En effet, selon le degré de l'avancement de la réaction d'oxydation, le taux des différents composés sera variable (Figure 3) et les risques de mauvaises

interprétations seront alors possibles (cas des peroxydes lipidiques, par exemple, qui voient leur taux augmenter puis diminuer).

Les méthodes mises en œuvre pour évaluer le niveau et la susceptibilité à l'oxydation des lipides peuvent donc être classées en trois groupes selon le principe d'analyse mis en jeu :

I.1.3.1 Mesure de la consommation des substrats d'oxydation

L'oxygène

Il est possible de mesurer l'accroissement de poids de la matière grasse sous l'effet de la fixation de l'oxygène (méthode gravimétrique) ou la chute de pression engendrée par la consommation d'oxygène (méthode polarographique). Des sondes à oxygène sont également employées, utilisant une mesure d'émission de fluorescence qui diminue en présence d'oxygène. Il est également possible de mesurer la durée de la phase d'induction par l'étude cinétique de la consommation d'oxygène : il y a une brutale augmentation de la consommation d'oxygène après la phase d'induction.

Les acides gras insaturés

Il s'agit ici de mesurer la disparition d'acides gras insaturés tels que l'acide linoléique ou l'acide linolénique. Cette mesure peut se faire par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après méthylation des acides gras (acides gras dosés sous forme d'esters méthyliques) (JEANTET *et al.*, 2006). Cette détermination par CPG se fait généralement selon la méthode normalisée AFNOR ISO 15304:2002 (2002).

BRAND-WILLIAMS *et al.* (1997) ont suivi de cette manière la disparition des acides gras durant l'oxydation de produits à base d'amidon de maïs, d'eau et de graisse de poule et contenant différents antioxydants. L'oxydation de ces produits est accélérée par un chauffage à 40 °C. La matière grasse est ensuite extraite au chloroforme puis méthanolysée afin d'hydrolyser les triglycérides et estérifier les acides gras libérés pour les analyser par CPG. Il a ainsi été montré que le taux de plusieurs acides gras a diminué au cours du temps (donc au cours de l'oxydation), essentiellement l'acide linoléique. La présence d'antioxydants diminue l'oxydation des acides gras, donc diminue la vitesse de leur disparition.

Cette méthode a également été utilisée par BONNELY (2000) qui a suivi la disparition de l'acide linoléique au cours de l'oxydation d'une mayonnaise, en présence ou en absence d'antioxydants. L'accélération du processus d'oxydation s'est faite en plaçant les mayonnaises à 30 °C pendant 220 jours à l'abri de la lumière et en récipient ouvert. L'extraction de la matière grasse a été réalisée par une congélation à - 20 °C pendant 22 heures suivie d'une

centrifugation qui permet de séparer l'huile de la phase aqueuse. Après méthanolysation des triglycérides, l'acide linoléique résiduel a été dosé par CPG.

I.1.3.2 Mesure des peroxydes formes

- **Mesure des diènes conjugués par spectrophotométrie UV**

Au cours de l'oxydation, les doubles liaisons des acides gras insaturés passent de la position cis-cis penta-diénique à la position de diènes conjugués. Ces diènes conjugués ont des propriétés spectrales avec un maximum d'absorption à 234 nm. C'est pourquoi cette mesure a été retenue dans la norme AFNOR NF EN ISO 3656 (2011). Ainsi, toute matrice contenant des acides gras polyinsaturés peut être analysée par cette méthode.

Dans cet esprit, QUILES *et al.* (2002) ont étudié l'oxydation de trois huiles comestibles durant la cuisson de pommes de terre par friture. L'évolution de ces huiles a été suivie en fonction du temps de cuisson. Pour toutes les huiles, il a été observé une augmentation des diènes conjugués au cours du temps (plus le temps de cuisson augmente, plus il y a de diènes conjugués). Une bonne corrélation a été observée avec l'évolution des composés polaires.

BONDET *et al.* (2000) ont étudié l'oxydation de l'acide linoléique. Cette oxydation est initiée ici par du fer ferreux dans un milieu tamponné à pH 6,4 et en présence de Tween 20. A 30 °C, le fer ferreux peut réagir avec des traces d'hydroperoxydes induisant ainsi la formation de radicaux alkoxyls. Ces radicaux entraînent alors une oxydation en chaîne génératrice de radicaux libres. Le suivi de l'oxydation de l'acide linoléique est réalisé en mesurant la production de diènes conjugués à 234 nm : l'absorbance augmente bien au cours du temps. Il est possible ainsi de voir l'action d'antioxydants primaires et secondaires (ralentissement de la production de diènes).

Un autre exemple de l'utilisation de cette méthode est fourni avec LIEGEOIS *et al.* (2000) qui ont suivi l'oxydation de l'acide linoléique émulsionné par du Tween 20 dans un tampon phosphate lors d'une initiation par du dihydrochlorure de 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) (AAPH) à 37 °C. La formation des diènes conjugués est suivie par spectrophotométrie à 234 nm. On peut alors définir un temps de latence qui correspond à l'intersection des droites définissant la phase d'initiation et celle de propagation. En présence d'antioxydants, ce temps de latence est proportionnel à la concentration en antioxydants dans le milieu réactionnel. Les faibles écart-types obtenus montrent une bonne répétabilité de ce test.

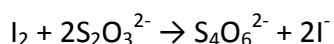
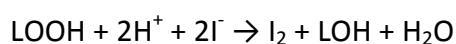
Différentes études portent sur des émulsions, de type eau dans huile ou huile dans l'eau. Ainsi, SCHWARTZ *et al.* (2000) évaluent le pouvoir antioxydant de molécules pures dans un système émulsionné eau dans huile (30/70 ; v/v) obtenu par mélange à l'ultraturax à 60 °C

avant un stockage à 37 °C à l'abri de la lumière pendant 6 semaines. L'état d'oxydation est suivi par deux méthodes complémentaires : un dosage des diènes conjugués et une mesure de la production d'hexanal (composé secondaire volatil de l'oxydation lipidique). En présence d'antioxydant, le processus d'oxydation est ralenti, ceci se traduit par une diminution de la quantité de diènes conjugués et d'hexanal produits. Il existe une corrélation entre ces deux dosages, bien que deux stades différents de l'oxydation soient ici considérés. Les écarts-types obtenus sont très faibles et montrent une bonne répétabilité de ces méthodes de dosage (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Le dosage des diènes conjugués est sensible, rapide et permet d'évaluer le pouvoir antioxydant de molécules.

- **Mesure de l'indice de peroxyde (IP)**

La mesure de l'indice de peroxyde est déterminée de façon systématique en contrôle qualité pour évaluer la qualité des huiles. Le dosage des hydroperoxydes fournit une estimation globale de l'état d'oxydation des lipides, surtout dans la phase primaire d'oxydation.

Il existe une norme, la norme AOCS Cd 8b-90 (1997), qui permet de déterminer cet indice de peroxyde (ou POV : *peroxide value*). Cela consiste à doser, par du thiosulfate de sodium, l'iode I_2 formé lors de l'oxydation de l'iodure de potassium par l'oxygène actif des peroxydes. La quantité d'iode formée est proportionnelle à celle des peroxydes présents (WANASUNDARA *et al.*, 1995) :



L'indice de peroxyde est alors défini comme étant la quantité d'oxygène actif contenue dans 1 g de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. L'indice de peroxyde s'exprime souvent en mg d'oxygène actif par kg de matière grasse. Cet indice permet le dosage des hydroperoxydes issus de l'oxydation de tous les acides gras insaturés, quelque soit leur nombre d'insaturations. Il atteint un maximum durant la phase de propagation puis diminue lors de la phase de terminaison pendant laquelle la vitesse de décomposition des hydroperoxydes est plus rapide que celle de leur formation.

Une valeur élevée de l'indice de peroxyde est le signe d'un début du processus irréversible de rancissement (IP > 15 meq d'oxygène actif / kg d'huile vierge (norme du Codex Alimentarius)). La sensibilité à l'oxydation d'une matière grasse peut être connue en observant l'augmentation de son indice de peroxyde après un chauffage de 48 heures à 50 °C dans l'obscurité. Cette sensibilité à l'oxydation est souvent le reflet de l'absence ou de la présence d'antioxydants (BAUER *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la mesure de la période d'induction (laps de temps avant le début de l'apparition des peroxydes) donne une idée de la stabilité à l'oxydation de la matière grasse. Cette période est estimée en mesurant le temps nécessaire pour que, dans certaines conditions, l'indice de peroxyde atteigne une valeur élevée (par exemple IP > 15 meq d'oxygène actif / kg d'huile). La sensibilité à l'oxydation et la période d'induction sont des mesures très semblables qui permettent d'apprécier l'aptitude à la conservation d'une matière grasse non encore altérée.

La mesure de l'indice de peroxyde est largement employée dans la littérature. BASAGA *et al.* (1997) ont évalué l'efficacité antioxydante de molécules pures et d'un extrait de romarin dans des huiles dépourvues de tocophérols. Le processus d'oxydation est accéléré en plaçant l'huile dans une étuve pendant 4 jours à 30 °C. La présence de molécules antioxydantes dans l'huile va ralentir le processus d'oxydation en piégeant les radicaux peroxydes $\text{LOO}^\bullet$ pour les transformer en hydroperoxydes LOOH . Il est alors possible de suivre l'oxydation lipidique en mesurant périodiquement le taux de peroxydes des huiles.

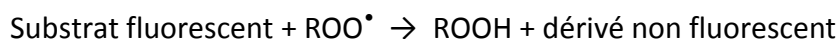
Cette mesure est possible dans les matrices alimentaires. HARTVIGSEN *et al.* (2000) ont suivi l'oxydation de mayonnaises contenant ou non des antioxydants par une évaluation de la quantité d'hydroperoxydes. Ces mayonnaises ont été placées pendant 4 semaines à 20 °C et à l'obscurité. L'extraction de l'huile est effectuée par congélation-centrifugation puis la mesure des hydroperoxydes est réalisée. Deux méthodes sont utilisées : la méthode iodométrique normalisée décrite ci-dessus et une méthode fluorimétrique. Cette dernière a été mise au point par AKASAKA *et al.* (2000) et permet, avec une meilleure sensibilité, un suivi plus spécifique des hydroperoxydes. Ces derniers sont séparés de l'huile par chromatographie liquide haute performance d'exclusion puis une solution de diphényl-1-pyrénylphosphine (DPPP) est introduite dans la phase éluante en sortie de colonne. Le DPPP s'oxyde alors en présence des hydroperoxydes. Sa forme oxydée fluoresce à 380 nm ($\lambda_{\text{excitation}} = 352 \text{ nm}$). La teneur en peroxydes est exprimée en meq d'hydroperoxydes par kg d'huile en comparant l'aire du pic majoritaire à celui d'un standard externe injecté à une concentration connue. La présence de molécules antioxydantes dans les mayonnaises permet de ralentir le processus d'oxydation et ainsi de limiter la quantité d'hydroperoxydes présents dans celle-ci (HARTVIGSEN *et al.*, 2000). Les écarts-types intra-essais obtenus par cette méthode fluorimétrique sont faibles. De plus, cette technique, très sensible puisqu'elle permet la détection de quelques picomoles d'hydroperoxydes, est corrélée au dosage iodométrique de l'indice de peroxyde.

Le test de Swift ou AOM (*Active Oxygen Method*) utilise le dosage de peroxydes. Dans ce test normalisé (AOCS Cd 12-57, 1981), de l'air ou de l'oxygène purifié est mis à barboter dans un échantillon lipidique maintenu pendant la durée de l'expérience à 97,8 °C. Le dosage des peroxydes (IP) est effectué à intervalles réguliers et la susceptibilité à l'oxydation des lipides est exprimée par le temps nécessaire à un indice de peroxyde d'arriver à 100 meq d'oxygène actif / kg de matière grasse. Cette méthode est dévolue à l'analyse des huiles ou des graisses, elle convient pour le contrôle d'une fabrication.

Dans le test de Swift modifié (Afnor), le flux de gaz barbote dans une solution de rouge crésol, qui vire au jaune au contact de produits volatils libérés (ROLLAND, 2004).

- **Mesure de radicaux libres par la méthode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)**

Cette technique permet de déterminer la capacité anti-radicalaire de substances par un suivi de l'oxydation d'une protéine fluorescente (perte de fluorescence de la fluorescéine). Cette méthode suit la peroxydation d'un aliment provoquée par le radical AAPH (dihydrochlorure de 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)) à 37 °C. Les radicaux formés réagissent ensuite avec un substrat fluorescent (la fluorescéine), entraînant alors une co-oxydation de ce dernier et la formation d'un dérivé dépourvu de fluorescence (DELANGE *et al.*, 1989) :



La fluorescéine réagit plus lentement avec les radicaux libres que la plupart des antioxydants naturels, ce qui permet d'évaluer la stabilité à l'oxydation radicalaire d'un aliment. Elle s'exprime par l'aire nette sous la courbe représentant l'intensité de fluorescence à 515 nm en réponse à une excitation à 493 nm en fonction du temps.

Différents substrats peuvent être utilisés. DELANGE *et al.* (1989) ont suivi l'oxydation de B-Phycoérythrine (B-PE) initiée par de l'AAPH ($\lambda_{\text{excitation}} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 565 \text{ nm}$). Dans leur étude, ils montrent que la présence de protéines du plasma modifie l'oxydation de la B-PE, toutefois de façon négligeable par rapport à l'effet des antioxydants.

Par la suite, de nombreux auteurs ont modifié cette méthode afin de l'adapter à leurs conditions d'étude. Cependant, HUANG *et al.* (2002) ont montré que la fluorescence émise par la fluorescéine était plus stable que celle de la B-PE qui peut subir une perte de 50 % en 35 min et en absence d'AAPH. De plus, B-PE se lie de façon non spécifique à certains composés comme les flavonoïdes, faussant ainsi la valeur de la capacité antioxydante de ces composés. Ces auteurs ont alors mesuré la capacité antioxydante par le biais d'une oxydation de la fluorescéine initiée par la thermo-décomposition à 37 °C d'AAPH. Le suivi de la fluorescence

émise est réalisé à 530 nm ($\lambda_{\text{excitation}} = 425 \text{ nm}$). La diminution de la fluorescence est ralentie par la présence d'antioxydant pur, et ce, proportionnellement à leur capacité antioxydante. Une bonne reproductibilité inter-essais a été constatée.

Cette technique et celles qui en sont dérivées sont simples à mettre en œuvre, répétables et sensibles.

- **Chromatographie en phase liquide haute performance**

Un système chromatographique couplé à un détecteur à barrette de diodes permet de séparer et de quantifier les produits d'oxydation de l'acide linoléique (hydroperoxydes et oxodiènes). A chaque instant, les spectres des molécules détectées peuvent être effectués entre 200 et 500 nm et les surface des pics peuvent être relevés à 234 et à 285 nm afin de suivre l'apparition des hydroperoxydes et des oxodiènes. Cette technique peut être couplée à la spectrométrie de masse pour identifier toutes les molécules détectées (QUIAN *et al.*, 2003 ; SHAN *et al.*, 2009).

I.1.3.3 Mesure des produits de décomposition des peroxydes

I.1.3.3.1 Dosage des composés volatils

- **Rancimat ou méthode OSI (*Oil Stability Index*)**

Il s'agit d'un test instrumental automatisé mesurant la conductivité d'acide de faible poids moléculaire, par exemple l'acide formique, produit durant l'autoxydation d'une matière grasse placée sous bullage d'air ou d'oxygène et à une température supérieure à 100 °C. Les composés volatils générés par l'oxydation sont recueillis dans un récipient contenant de l'eau distillée. L'augmentation de la conductivité de l'eau représente la sensibilité à l'oxydation de l'échantillon (ROLLAND, 2004). C'est un test sur le vieillissement de produits alimentaires qui permet d'avoir une indication rapide sur l'efficacité d'un antioxydant dans un produit donné (méthode standardisée AOCS Cd 12b-92, 1992). Cette méthode est très employée dans les industries des huiles et des matières grasses.

- **Chromatographie en phase gazeuse**

Cette méthode permet d'analyser les produits de dégradation des peroxydes. Leur présence traduit un stade déjà avancé de l'oxydation. L'analyse des composés volatils par CPG est bien corrélée à l'apparition de la flaveur rance. Cette méthode permet également de fournir des informations utiles sur l'origine des composés volatils. La CPG permet de déterminer et de

quantifier les produits responsables de l'altération organoleptique observée, notamment les aldéhydes (Figure 4).

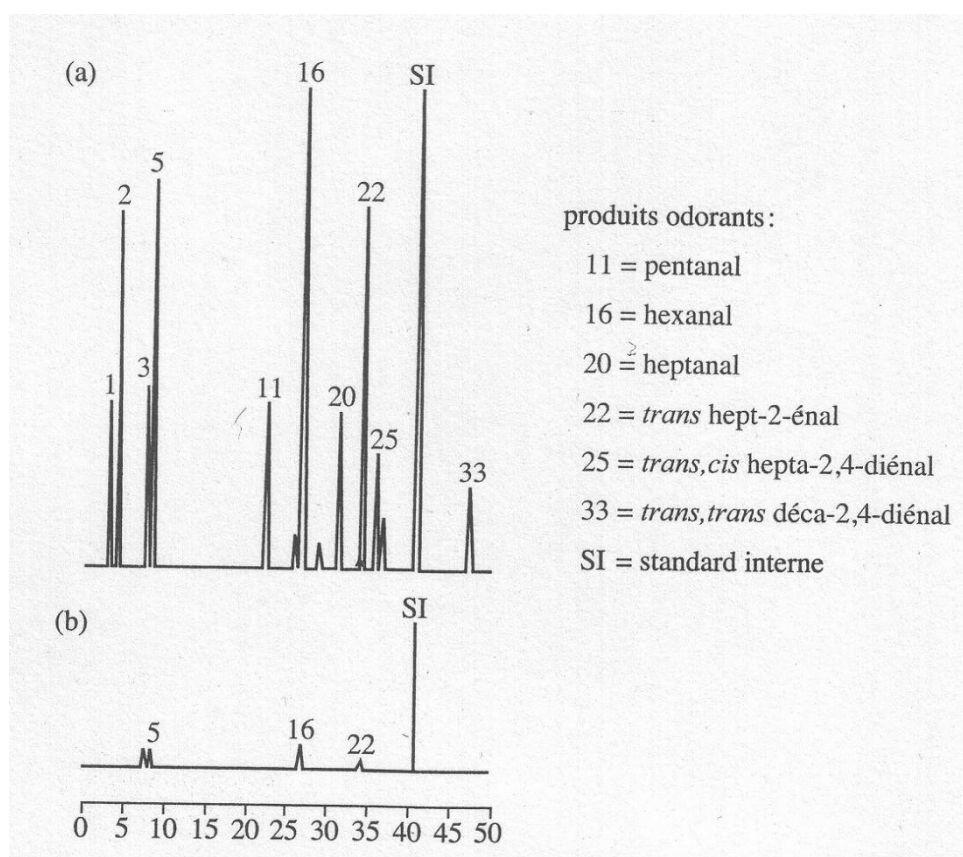


Figure 4 : Chromatogramme des substances volatiles d'une huile de soja après un stockage pendant 8 jours à 60 °C (a) comparé à celui de l'huile fraîche (b) (BAUER *et al.*, 2010).

1.1.3.3.2 Dosage des composés carbonylés

• Mesure de l'indice de *p*-anisidine

La détermination de l'indice de *p*-anisidine repose sur le principe suivant : en milieu acide acétique, la *p*-anisidine réagit avec les aldéhydes conjugués issus de l'oxydation des lipides pour former des composés jaunes qui absorbent à 350 nm. L'indice de *p*-anisidine est défini comme 100 fois l'absorbance mesurée à 350 nm d'une solution résultant de la réaction entre 1 g de lipides et 100 mL de solvants et réactifs.

Cette méthode est plus sensible dans le cas des aldéhydes insaturés par rapport aux saturés car le complexe coloré formé à partir des aldéhydes insaturés absorbe plus fortement à cette longueur d'onde.

Elle permet de doser les produits tels que des carbonyles, des 2-alkenals et des 2,4-diénals. Cet indice est bien corrélé avec la quantité de produits volatils totaux (DOLESCHALL *et al.*, 2002) et représente un indicateur fiable de rancissement oxydatif des lipides (VAN DER MERWE *et al.*, 2004). Une corrélation très significative est trouvée entre l'indice de *p*-anisidine et l'indice de peroxyde.

- **Test à l'acide thiobarbiturique**

Il s'agit d'une mesure d'un complexe coloré issu de la réaction de certains aldéhydes, en particulier l'aldéhyde malonique, et le TBA (acide thiobarbiturique). Le complexe coloré absorbe à 530 nm. L'aldéhyde malonique provient essentiellement de l'oxydation des lipides polyinsaturés.

Lors de l'oxydation secondaire, de nombreux composés carbonylés sont produits, dont l'acide malondialdéhyde (MDA), capable de se complexer en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, donnant des complexes MDA-TBA colorés et quantifiables par spectrophotométrie à 530 nm. Il existe une relation linéaire entre la concentration en MDA produit à partir du 1,1,3,3-tétraméthoxypropane (précurseur du MDA) et la valeur des TBARS (*Thiobarbituric acid-reactive substances*) obtenues à 530 nm (JEROME, 1998). Cette méthode est normalisée depuis 1997 (norme AOCS Cd 19-90) et la teneur en MDA est déterminée par l'équation suivante :

$$\text{TBARS} = \frac{(\text{Abs } 530 \text{ nm}_{\text{échantillon}} - \text{Abs } 530 \text{ nm}_{\text{témoin}})}{\text{Masse de la prise d'essai}}$$

Cette méthode a permis à BASAGA *et al.* (1997) de mettre en évidence une différence significative entre l'état d'oxydation d'huiles protégées ou non par un extrait de romarin ou de BHT (2,6 di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluène).

Cette méthode est également utilisable pour suivre l'oxydation en milieu hétérogène, par exemple dans un broyat de viande cuite (WONG *et al.*, 1995).

- **Examen organoleptique**

Les différents aldéhydes formés peuvent être simplement détectés par examen organoleptique. Leur seuil de perception et leur caractère organoleptique varient d'un aldéhyde à un autre (Tableau I).

Tableau I : Caractère organoleptique et seuil de perception des principaux aldéhydes formés par l'oxydation des lipides (BAUER *et al.*, 2010).

Composés	Caractère	Seuil dans l'huile de paraffine ($\mu\text{g} / \text{g}$)
Hexénal	frais, vert	0,6
Hepténal	frais, vert	0,04
<i>cis</i> Hex-3-éнал	haricot vert	0,09
<i>trans</i> Hex-2-éнал	vert	0,6
<i>cis</i> Hept-4-éнал	suif	0,0005
<i>trans,cis</i> Nona-2,4-diéнал	pois	0,001
<i>trans,trans</i> Nona-2,4-diéнал	concombre	0,02
<i>trans,trans</i> Déca-2,4-diéнал	friture	0,1
<i>trans,trans</i> Hepta-2,4-diéнал	noisette rance	0,055
<i>trans</i> Non-2-éнал	rance	0,1

Durant l'oxydation de l'huile de tournesol, la génération de composés volatils conduit très précocement au développement d'une odeur détectable : 1 heure d'incubation suffit pour qu'une odeur soit perçue significativement (VILLIERE *et al.*, 2006). Ensuite, plus le temps d'incubation augmente, plus le nombre de juges percevant une odeur augmente. Par une description quantitative et qualitative de l'odeur de l'huile au cours de l'oxydation, un profil sensoriel peut être établi (Figure 5).

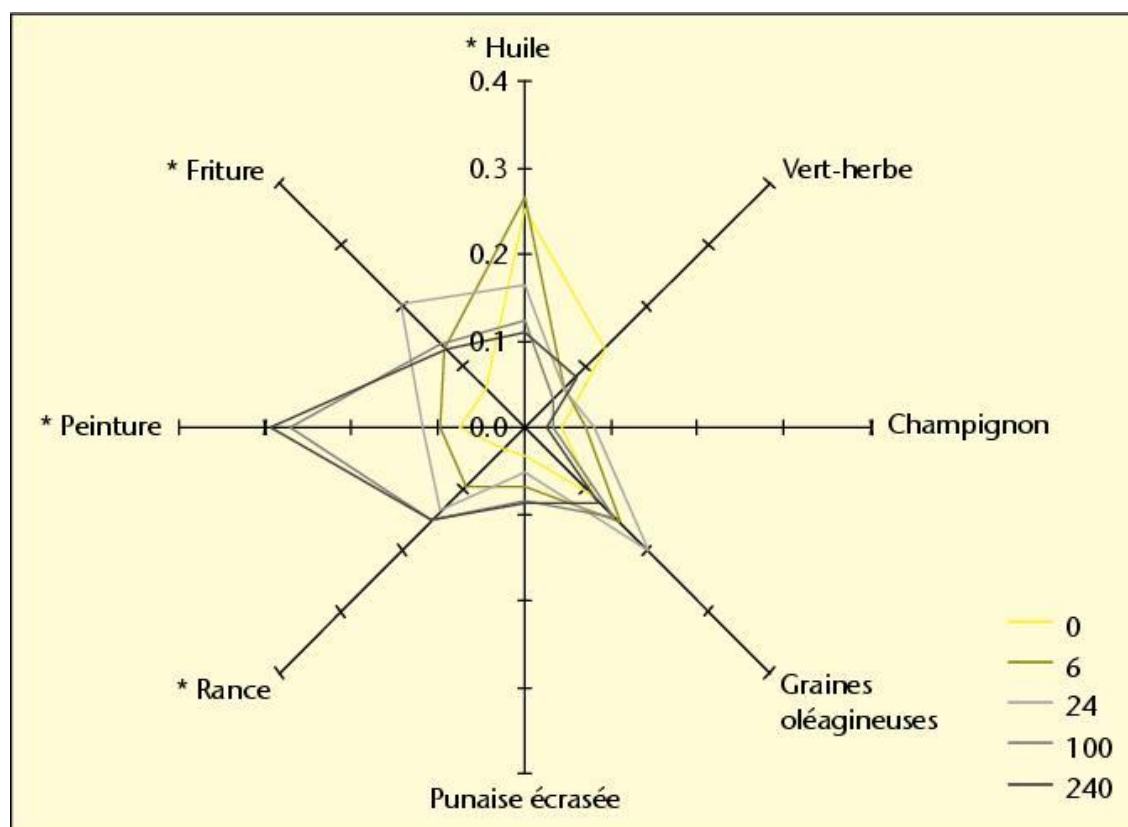


Figure 5 : Evolution du profil de l'odeur au cours de l'oxydation de l'huile (VILLIERE *et al.*, 2006).

Une évolution significative de la part relative des descripteurs rance, punaise écrasée, friture et peinture est observée sur la Figure 5. La part du descripteur huile, qui prédomine dans l'émulsion fraîche, diminue ensuite au profit du descripteur friture qui caractérise l'odeur après 24 h d'oxydation. Puis, la part du descripteur friture recule, essentiellement au profit du descripteur peinture, qui devient majoritaire après 100 h et 240 h, les profils odorants restant alors similaires. Le descripteur rance, dont la part augmente progressivement de t0 à t100 puis reste constante, n'est à aucun moment le descripteur majoritaire dans l'odeur des huiles oxydées. L'implication d'un composé dans cette odeur ne peut être reliée directement à sa quantité formée. Elle dépend à chaque instant des quantités et de la répartition de chacun des autres composés volatils en présence (VILLIERE *et al.*, 2006).

I.1.3.3.3 Dosage des composés polaires

Le dosage des composés polaires est un indicateur de la qualité des huiles de friture et donne des informations sur la teneur globale en composés néoformés qui ont une polarité plus élevée que celle des triglycérides. Le dosage de ces composés est à la base de la réglementation actuelle qui limite le taux de composés polaires à 25 %.

Le principe de la méthode officielle de dosage des composés polaires des huiles végétales (AOCS *Official method* Cd 20-91) repose sur le fractionnement des composés apolaires et polaires des huiles par chromatographie sur colonne de silice. Les composés apolaires, principalement les triglycérides non altérés, sont élués par le mélange éther de pétrole / éther éthylique (87 / 13, v / v) alors que les composés polaires restent fixés. Leur taux dans l'huile est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ de composés polaires} = \frac{\text{masse d'huile (g)} - \text{masse de la fraction apolaire (g)}}{\text{masse d'huile (g)}}$$

I.1.4 INCONVENIENTS DES METHODES DE SUIVI DE L'OXYDATION DES LIPIDES

L'oxydation des lipides peut être suivie par de nombreuses méthodes mais l'étude de ce phénomène reste très compliquée car l'oxydation des lipides donne naissance à de nombreux produits, très divers. Chaque méthode a donc ses avantages et ses limites. De plus, la plupart de ces méthodes sont des méthodes globales et donc peu spécifiques. Le mieux semble d'en utiliser plusieurs en parallèle dans toute étude d'oxydation de lipides.

I.1.4.1 Mesure de la consommation des substrats d'oxydation

Lorsque l'oxydation des lipides est suivie par l'étude cinétique de la consommation d'oxygène, les résultats sont toujours à interpréter avec prudence car dans les milieux

complexes que sont les aliments, l'oxygène intervient dans de nombreuses réactions et pas seulement pour oxyder les lipides. En outre, la production de composés volatils par décomposition des peroxydes peut fausser les mesures.

L'analyse chromatographique en acides gras des échantillons de provenance inconnue permet d'avoir des informations sur l'évolution de la composition de l'échantillon mais cette analyse est lourde et fastidieuse. Les études de BRAND-WILLIAMS *et al.* (1997), même si elles présentent de bons écarts-types, restent inappropriées aux matrices à faibles teneurs en lipides (BERSET *et al.*, 1996). De plus, l'évaluation des acides gras est peu sensible et des différences significatives du taux d'acides gras mesuré par CPG entre les produits contenant ou non des antioxydants ne sont obtenues qu'au bout de plusieurs mois. De même, du fait de la faible sensibilité du dosage par CPG de la disparition des acides gras au cours de l'oxydation, BONNELY (2000) n'a décelé aucune évolution de la teneur en acide linoléique au cours de l'étude. La mise en évidence de l'effet protecteur des antioxydants n'a donc pas été possible ici. Ce test est à ce titre peu utilisé dans les études de vieillissement décrites dans la littérature.

1.1.4.2 Mesure des peroxydes formés

Le dosage des diènes conjugués est rapide à condition que les lipides du produit à analyser aient été préalablement extraits et solubilisés dans un solvant organique. Cette méthode peut être peu spécifique et conduire parfois à des interférences avec les antioxydants (GRAY, 1978). De plus, les mesures réalisées par BONDET *et al.* (2000) ont été faites à partir de micelles très diluées permettant un degré de mobilité important des différents réactifs ce qui n'est pas le cas dans une émulsion alimentaire : il s'agit donc là d'un modèle imparfait. SCHWARTZ *et al.* (2000) ont réalisé le dosage des diènes conjugués en milieu hétérogène et ont obtenu de bonnes corrélations avec le dosage d'hexanal mais ce test reste toutefois peu spécifique (FRANKEL, 1993). BONNELY (2000) a effectué un suivi des diènes conjugués au cours de l'oxydation d'une mayonnaise. En présence d'un antioxydant, un ralentissement de la production des diènes conjugués est observé mais ce ralentissement n'est toutefois pas significatif aux concentrations d'antioxydants testées.

La mesure de l'indice de peroxyde, bien que normalisée, reste peu sensible (AKASAKA *et al.*, 2000). En outre, pour QUILES *et al.* (2002), il n'y a pas de corrélation entre le dosage des diènes conjugués et la mesure de l'indice de peroxyde. De plus, il ne renseigne pas sur la nature des hydroperoxydes et leur origine. La limite de cette mesure est que le taux de peroxydes formés est la résultante de la formation et de la décomposition des hydroperoxydes. Or les vitesses de formation et de décomposition des peroxydes ne varient pas de la même façon avec

la température : leur vitesse de formation est plus élevée que celle de leur décomposition jusqu'à 60-70 °C ; en revanche, leur décomposition devient plus rapide au-delà de cette zone de température.

La méthode titrimétrique reste très simple d'utilisation dans le cas des huiles mais beaucoup plus compliquée dans le cas des milieux émulsionnés car il est alors nécessaire de réaliser une extraction quantitative, sélective et non altérante des lipides, ce qui suppose un certain nombre de précautions pour éviter tout stress oxydatif (VILLIERE, 2005).

GUISELLI *et al.* (2000) et HUANG *et al.* (2002) ont soulevé une difficulté quant à l'obtention d'une bonne reproductibilité inter-laboratoires du test ORAC. Il a également été montré une différence de spécificité selon la nature des antioxydants. Ainsi les molécules liposolubles répondent difficilement dans ce type de test en raison du milieu tamponné utilisé (HUANG *et al.*, 2002).

Le test de Swift est adapté à l'analyse des huiles ou des graisses mais n'est pas adapté pour l'analyse des autres aliments. De plus, il convient pour le contrôle d'une fabrication mais ne renseigne pas sur la durée prévisible de conservation. Les tests à haute température comme celui-ci ne peuvent pas être valablement comparés car les mécanismes mis en jeu sont différents : la vitesse d'oxydation dépend de la concentration en oxygène dont la solubilité diminue à haute température. De plus, les réactions secondaires de polymérisation, de cyclisation ou de scission s'accroissent quand la température augmente (ROLLAND, 2004).

L'indice de *p*-anisidine, même s'il est un indicateur fiable de rancissement oxydatif des lipides, n'est comparable seulement que pour un même type d'huile, car la valeur initiale de cet indice varie selon les sources d'huile (GUILLAN *et al.*, 2002). Par exemple, les huiles riches en acides gras polyinsaturés ont une valeur élevée de l'indice même si elles sont fraîches.

1.1.4.3 Mesure des produits de décomposition des peroxydes

Les systèmes Rancimat appliquent des conditions drastiques, avec des températures supérieures à 100 °C, et conduisent souvent à la production de composés selon des mécanismes différents de ceux rencontrés dans des conditions normales de vieillissement. De plus, les hautes températures employées et le courant d'air constant appliqué au système peuvent causer la perte de composants volatils (VELASCO *et al.*, 2004).

Le test des TBARS risque de surestimer l'état d'oxydation car d'autres composés colorés peuvent interférer avec la mesure à 530 nm. Il s'agit d'une méthode simple mais qui reste peu spécifique, d'autres composés carbonylés présents dans le milieu pouvant également réagir avec le TBA (AKASAKA *et al.*, 2000).

Le dosage des composés polaires présente plusieurs inconvénients : la durée de l'extraction est longue (environ 3 heures ½ par échantillon d'huile), il utilise de grandes quantités de solvant, et il manque de précision et de répétabilité.

Un autre point important est que les phénomènes d'oxydation des lipides sont souvent très lents, pouvant se dérouler sur des mois, ce qui est incompatible avec le contrôle qualité dans le milieu industriel. C'est pour cela que de nombreuses méthodes utilisent des conditions d'oxydation forcée. Mais les résultats de ces tests accélérés sont-ils vraiment valides et extrapolables aux conditions usuelles d'utilisation et de conservation des produits ?

Par ailleurs, l'ensemble des méthodes préalablement citées sont majoritairement basées sur les composés stables formés ou consommés lors des étapes de propagation et de terminaison : acides gras, diènes conjugués, hydroperoxydes, aldéhydes, composés volatils, composés polaires, polymères... Le plus souvent, ces méthodes ne permettent pas d'accéder aux stades très précoces de l'oxydation. En effet, pratiquement aucune des méthodes décrites précédemment ne permet de suivre les radicaux libres lipidiques qui sont pourtant les intermédiaires clés dans l'oxydation des lipides. L'emploi d'une méthode directe de suivi de l'évolution de ces espèces semble indispensable pour accéder à la caractérisation de leurs réactivités dans un environnement donné. Cette caractérisation doit aboutir à la détermination des constantes cinétiques associées à ces réactions pour permettre à terme de modéliser et donc prédire le comportement des lipides vis-à-vis de l'oxydation en fonction de leur environnement y compris dans des aliments complexes. De ce point de vue, la RPE constitue une technique répondant à cet impératif.

I.2 APPORTS DE LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

I.2.1 PRINCIPE DE LA RPE

La RPE est une technique spectroscopique hertzienne qui s'applique spécifiquement aux espèces paramagnétiques, c'est-à-dire aux molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés (appelés aussi électrons célibataires) sur la couche de valence (RIEGER, 2007). Les espèces paramagnétiques sont des radicaux libres (de type aminoxyles), des métaux de transition, des molécules formées au cours de réactions d'oxydoréduction notamment. Ces molécules peuvent être détectées dans un champ magnétique extérieur H_0 en suivant les transitions entre les niveaux d'énergie correspondant aux orientations de spin de l'électron non apparié.

Du fait de la présence d'un électron non apparié, une molécule possède un moment magnétique μ dû au spin de cet électron. Cette molécule se trouve dans un certain niveau

d'énergie E_n en raison de son état électronique, rotatoire et vibratoire. Quand on place cette molécule dans un champ magnétique extérieur, le moment de spin peut prendre deux orientations possibles dans ce champ : l'une parallèle et l'autre antiparallèle. On a ainsi deux catégories de molécules : celles dont le spin est orienté parallèlement au champ et celles dont le spin est orienté en sens opposé. Ces deux catégories de molécules n'auront plus la même énergie E_n car l'énergie du moment magnétique dans le champ magnétique s'ajoute à l'énergie propre de la molécule (Figure 6). Les deux catégories de molécules auront donc pour énergie : $E_n + \mu_H$ et $E_n - \mu_H$ (l'énergie du moment magnétique est $\mu_H \cos \theta$ avec $\theta = 0$ ou π selon que le moment est dans le sens du champ ou dans le sens opposé). La même molécule pouvant appartenir à l'une ou l'autre des catégories, on peut dire que l'intervalle énergétique entre les deux niveaux est $2\mu_H$ (COLLIN, 2008).

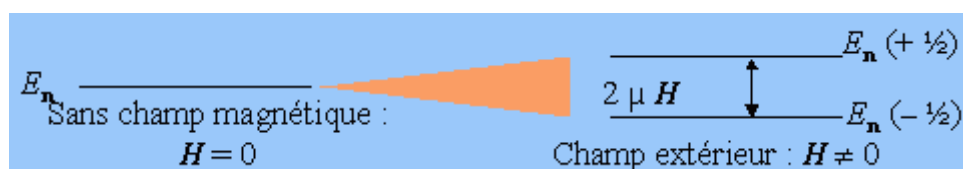


Figure 6 : Effet d'un champ magnétique sur un niveau d'énergie (COLLIN, 2008).

Lorsque l'on fournit au système un rayonnement électromagnétique $h\nu$ tel que $\Delta E = h\nu$, il absorbe de l'énergie, ce qui engendre des transitions entre les deux niveaux d'énergie et une radiation. On observe alors un spectre caractéristique des absorptions d'énergie : il s'agit du phénomène de résonance paramagnétique électronique RPE.

Les signaux d'absorption sont difficiles à analyser directement, on utilise donc les dérivées premières de ces signaux : cela facilite, par l'augmentation d'amplitude, la mesure de l'absorption (Figure 7).

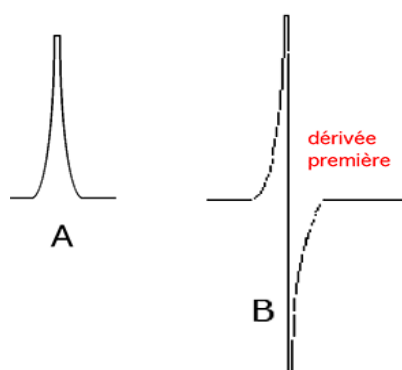


Figure 7 : Spectre d'absorption (A) et dérivée première (B).

Le signal obtenu ne correspond pas à un signal unique mais à un signal à plusieurs raies. Ceci est dû au fait que l'électron célibataire d'une substance paramagnétique est non

seulement soumis à l'interaction du champ magnétique extérieur mais également à celui du milieu qui l'entoure. L'interaction la plus importante est celle qui existe entre le spin de l'électron non apparié et celui du noyau de l'atome autour duquel il gravite. Pour chaque état de spin électronique (+ 1/2 et - 1/2), le couplage d'un électron libre avec n atomes équivalents de spin I donnera $2nI+1$ orientations possibles donc autant de niveaux d'énergie d'où un spectre d'absorption composé de $2nI+1$ raies (Figure 8).

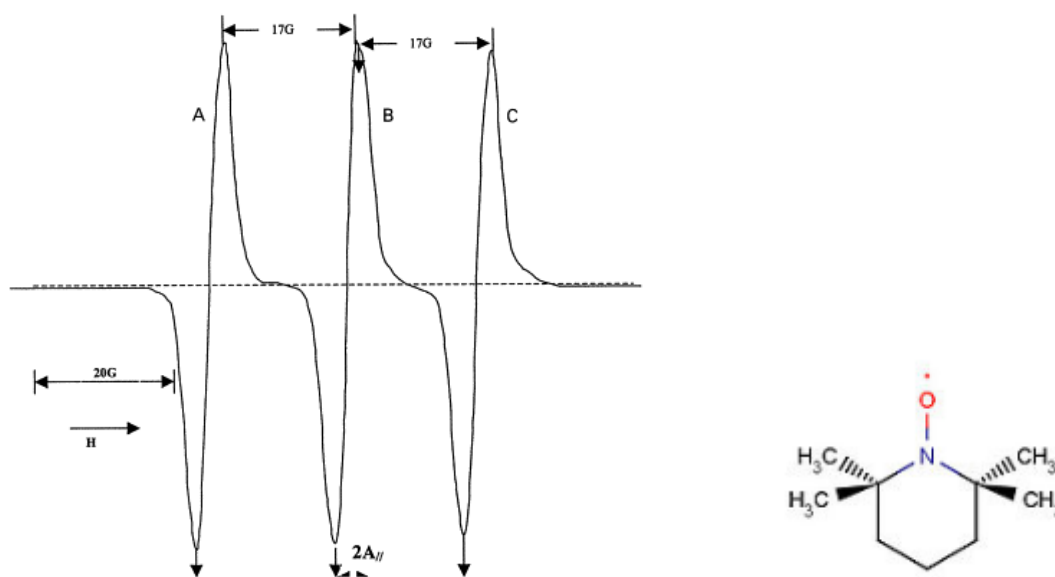


Figure 8 : Spectre RPE du radical TEMPO et structure chimique du radical TEMPO.

Un spectre de RPE est caractérisé par différents paramètres comme la largeur des raies, la distance entre les raies les plus éloignées (écart hyperfin exprimé en Gauss (G)), l'intensité des raies (ATHERTON, 1993).

Le spectre peut être obtenu de deux manières : soit le champ magnétique est maintenu constant alors que la fréquence du rayonnement électromagnétique est balayée, soit la fréquence du rayonnement électromagnétique est maintenue constante et le champ magnétique est balayé. Pour des raisons pratiques évidentes, la plupart des spectromètres RPE fonctionnent avec une fréquence du rayonnement électromagnétique fixe (9.5 GHz) et champ magnétique variable (1 000 - 10 000 Gauss).

I.2.2 CONDITIONS DE DETECTION DES RADICAUX LIPIDIQUES PAR RPE

L'utilisation de la RPE pour étudier l'oxydation des lipides est relativement récente (depuis les années 1970). La détection des espèces radicalaires lipidiques est une étape clé dans l'identification des phénomènes d'oxydation primaire. Une meilleure connaissance de la nature et de la réactivité des radicaux libres de type alkyles, peroxydes, oxydes produits au cours de l'oxydation des acides gras insaturés, et plus précisément au cours des étapes précoces de

l'oxydation, permettra de proposer des solutions fiables pour maîtriser et améliorer la stabilité oxydative des aliments. L'avantage principal de la RPE est de pouvoir être appliquée "*in situ*" dans des milieux complexes, qu'ils soient liquides ou solides, ce qui ouvre un grand champ d'application.

Dans les produits solides avec une activité de l'eau faible ou dans les produits liquides congelés à très basse température, la réactivité des espèces radicalaires est ralentie et leur durée de vie suffisamment longue pour permettre leur détection "*in situ*" sans ajout de composé exogène (méthode directe) (SEVILLA, 1990). Cependant, dans la majorité des produits liquides, le suivi par la méthode directe n'est pas possible en raison de la forte réactivité des espèces radicalaires et donc de leur durée de vie très courte. Pour pallier ce problème, il existe des méthodologies spécifiques comme le *spin trapping* et le *spin scavenging* qui font appel à des piègeurs de radicaux (méthodes indirectes).

1.2.3 DETECTION DIRECTE DES RADICAUX

La détection directe des espèces radicalaires lipidiques n'est possible qu'à très basse température. En effet, les phénomènes d'oxydation des lipides sont rapides à température ambiante ce qui rend impossible la détection des radicaux formés compte tenu de leur faible durée de vie. Cette méthode à très basse température permet d'identifier, de quantifier et de mesurer la réactivité des radicaux alkyles et peroxydes "*in situ*" mais ne renseigne pas sur la nature des espèces radicalaires constitutives de ces deux populations.

Sevilla *et al.* (1990) ont montré que la photolyse des hydroperoxydes lipidiques formés à partir de lipides polyinsaturés non purifiés à -196 °C générerait des radicaux lipidiques facilement observés par RPE.

Dans la phase initiale d'oxydation des lipides, deux sortes de radicaux différentes existent : les radicaux alkyles ($L^\bullet$) et les radicaux peroxydes ($LOO^\bullet$). Dans les produits congelés, le spectre RPE des radicaux alkyles évolue vers celui des radicaux peroxydes avec la montée en température, ce qui signifie que la formation des radicaux $LOO^\bullet$ n'est possible qu'à partir d'une température suffisamment élevée pour permettre la diffusion de l'oxygène à travers l'échantillon congelé.

1.2.4 SPIN TRAPPING

Récemment, le *spin trapping* a connu un nouveau développement grâce à l'association des techniques RPE et de chromatographie liquide haute performance, éventuellement couplée

à la spectrométrie de masse. Il est alors possible d'obtenir des informations précises sur la nature des radicaux lipidiques piégés sous forme d'adduits.

Le *spin trapping* consiste à stabiliser un composé radicalaire instable par un piègeur de spin (*spin trap*) et permet ainsi son accumulation. La détection de cette nouvelle espèce radicalaire est alors facilement réalisable par RPE (KOPANI *et al.*, 2006) et permet la détection indirecte de radicaux impliqués dans l'oxydation des lipides. Le piègeur de spin doit être choisi avec précaution pour une application réussie de la méthode, de même que les conditions de son emploi telles que la concentration, la solubilité et la compatibilité du piègeur, le pH du système, la présence potentielle d'autres agents oxydants ou réducteurs, la solubilité et la stabilité de l'adduit formé, la complexité du spectre obtenu, l'éventuelle toxicité pour les études "*in vivo*" (ROHN *et al.*, 2005).

Les piègeurs de spin couramment utilisés sont le 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde (DMPO), le 5-*tert*-butoxycarbonyl 5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde (BMPO), le 5-éthoxycarbonyl-5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde (EMPO) et l' α -phényl-N-*tert*-butylnitrone (PBN).

Dans le cas des *spin traps* de type nitroso, les adduits de spin confèrent une bonne empreinte des radicaux piégés $RL^\bullet$ car ces derniers se fixent sur l'atome d'azote : ils sont donc immédiatement adjacents au groupement nitroxyle ($NO^\bullet$) et peuvent ainsi facilement donner lieu à des constantes de couplage hyperfin supplémentaires caractéristiques de leur structure (Figure 9).

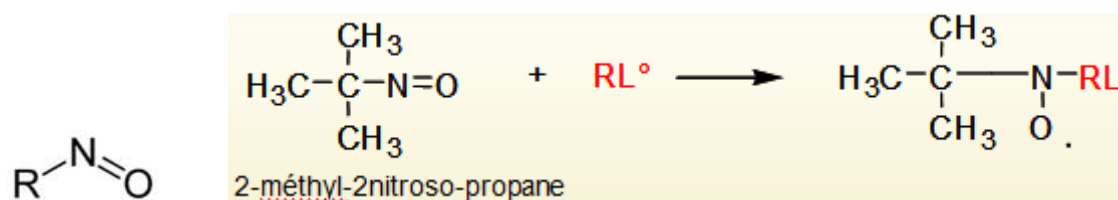


Figure 9 : Composé nitroso et formation d'un adduit de spin à partir d'un composé nitroso (exemple du 2-méthyl-2-nitroso-propane).

Cependant, ces adduits obtenus à partir d'un piègeur de type nitroso sont thermiquement et photochimiquement instables, ce qui explique que la plupart des *spin traps* utilisés font partie du groupe nitrone, plus stable mais moins spécifique que les nitroso : en effet, comme présenté sur la Figure 10, les radicaux $RL^\bullet$ se fixent sur le carbone en α du groupement nitroxyle (moins de couplage hyperfins).

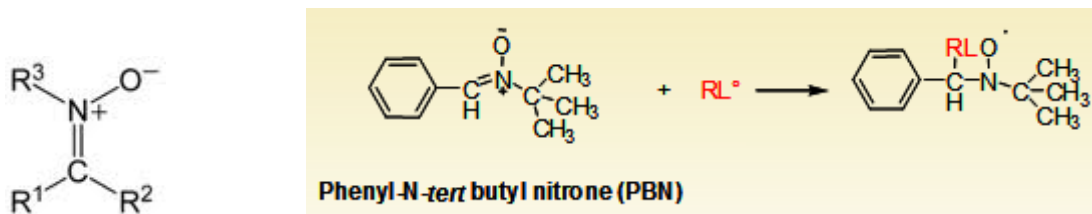


Figure 10 : Composé nitron et formation d'un adduit de spin à partir d'un composé nitron (exemple du PBN).

Parmi les nitrones, le PBN (Figure 11), est très utilisé pour la détection de radicaux lors de l'oxydation des lipides en raison de son caractère lipophile et de sa bonne réactivité (ANDERSON *et al.*, 2005 ; ROMAN *et al.*, 2012).

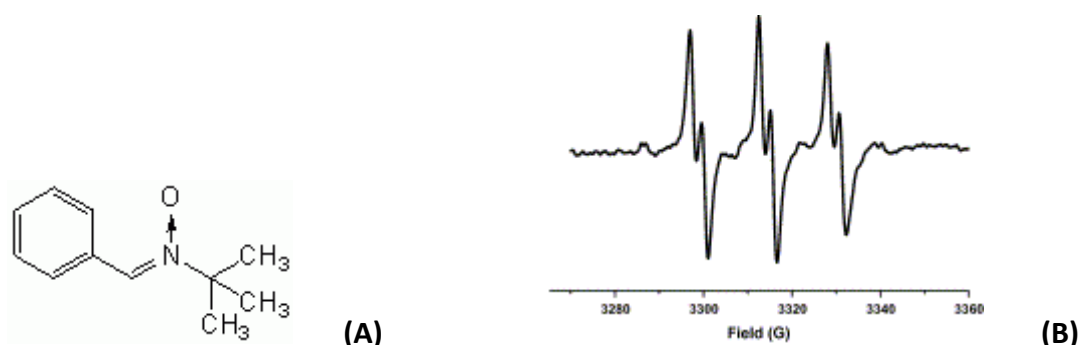


Figure 11 : Molécule de PBN (A) et exemple de spectre RPE d'un adduit de spin PBN (B).

Il faut cependant préciser que les spectres de l'adduit de spin PBN- $L-NO^\bullet$ varient peu selon la nature des radicaux ajoutés. En effet, les radicaux lipidiques piégés se fixent en α de l'atome d'azote et seul l'atome d'hydrogène peut donner une constante de couplage additionnelle à celle du $NO^\bullet$. Par conséquent, l'allure du signal des adduits de spin nitron consiste en général en un triplet de doublets quel que soit le radical $L^\bullet$. Cependant, grâce à leur bonne stabilité, les adduits de spin formés peuvent être séparés, identifiés et quantifiés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (KOSHIISHI *et al.*, 2005).

La méthode de *spin trapping* permet aussi d'évaluer l'efficacité des antioxydants par détermination de la phase de latence, "*lag time*", période pendant laquelle les antioxydants endogènes de l'huile (comme les composés phénoliques) ou ajoutés éliminent progressivement les radicaux lipidiques jusqu'à épuisement de leur capacité anti-radicalaire (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2006). Après cette phase de latence, les radicaux vont interagir avec le *spin trap* présent dans le milieu et former des adduits de spin (Figure 12).

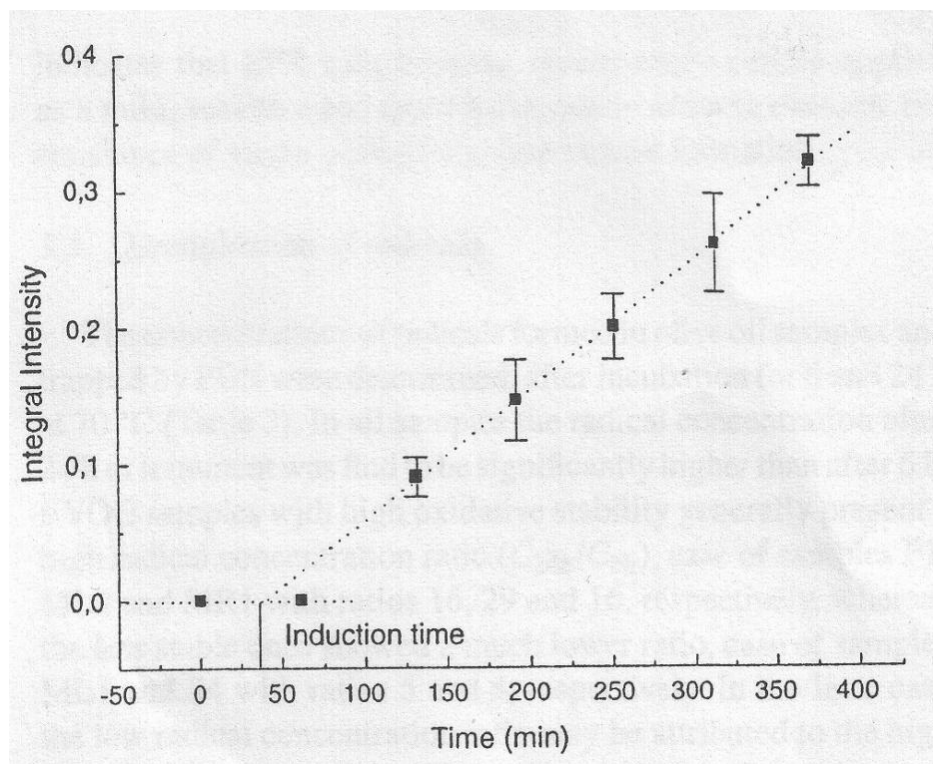


Figure 12 : Détermination de la phase de latence. C'est la période de temps avant laquelle il y a une brutale augmentation du signal (d'après PAPADIMITRIOU *et al.*, 2006).

Ainsi, le temps de latence représente la mesure de l'efficacité des antioxydants et peut-être corrélée à la stabilité des aliments pendant le stockage.

Il est très important de souligner que cette technique de piégeage est une méthode cinétique, ce qui implique que la détection de radicaux dépendra des facteurs cinétiques. Par exemple, le succès de la détection d'une espèce radicalaire repose sur un piégeage efficace ainsi que sur une stabilité suffisante de l'adduit résultant pour être détecté pendant la mesure. Un piégeage efficace signifie que la réaction entre le radical et le *spin trap* est suffisamment rapide pour empêcher le radical de participer à une réaction ultérieure. Par conséquent, les spectres observés reflètent une situation stationnaire qui dépend de la vitesse de formation et de décomposition de l'adduit de spin, ainsi que de la concurrence entre les réactions de piégeage et d'autres réactions radicalaires.

Un autre point important porte sur l'interférence potentielle du *spin trap* utilisé avec la chaîne des réactions d'oxydation, ce qui peut modifier le mécanisme et la vitesse de ces réactions. Plusieurs études indiquent que le PBN semble avoir un rôle important dans la protection des systèmes lipidiques contre l'oxydation (THOMSEN *et al.*, 2000; VELASCO *et al.*, 2005). Il interférerait avec la chaîne d'oxydation, modifiant ainsi le mécanisme et le taux de l'oxydation lipidique (VELASCO *et al.*, 2005).

VELASCO *et al.* (2005) ont étudié l'effet du PBN dans le cas d'une huile de colza (HC), d'une huile de tournesol (HT) et d'une huile de poisson (HP). Le PBN conduit à une diminution de l'indice de peroxyde. Par ailleurs, une teneur résiduelle en tocophérol significativement plus élevée est observée dans les échantillons contenant du PBN par rapport aux échantillons témoins, ce qui laisse présager d'une action antioxydante du PBN. Un effet variable du PBN est constaté en fonction de la nature de l'huile, avec une vitesse d'oxydation des huiles qui augmente selon l'ordre $HP > HT > HC$ et une diminution de la stabilité oxydative des huiles telle que $HP < HT < HC$. Ces résultats pourraient être liés à la teneur initiale en tocophérols et donc au ratio PBN / tocophérols (l'effet du PBN sur les radicaux peroxydes devient plus significatif avec la présence de quantités plus faibles de tocophérols).

Cette technique de *spin trapping* a montré de bonnes corrélations avec les analyses sensorielles (le test Rancimat) et la consommation d'oxygène (VELASCO *et al.*, 2004), la détermination du TBARS et l'indice de peroxyde (VELASCO *et al.*, 2005).

Pour résumer, la méthode de *spin trapping* couplée à la HPLC et la HPLC-MS permet d'une part d'identifier et de quantifier des espèces radicalaires mises en jeu dans les phénomènes d'oxydoréduction et d'autre part de déterminer l'activité anti-radicalaire des antioxydants. Cette méthode peut s'appliquer dans les huiles et différents aliments (viande, lait, mayonnaise, fromage...). Elle a pour inconvénient de présenter une forte dépendance aux facteurs cinétiques. De plus, l'utilisation d'un piègeur peut interférer avec la chaîne d'oxydation.

1.2.5 SPIN SCAVENGING

Comme mentionné précédemment, la plupart des radicaux impliqués dans les réactions d'oxydation ont une durée de vie très courte. Cependant, certains composés radicalaires peuvent être très stables et ceci grâce à leur structure ou conformation. Il s'agit par exemple des radicaux de type 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazil (DPPH), 2,6-di-*tert*-butyl- α -*p*-toloxyl (galvinoxyle) ou encore des radicaux de type nitroxyle tel que le 4-hydroxy-2,2,6,6-tetraméthylpipéridine-1-oxyl (TEMPO), l'acide 5-doxyl stéarique et l'acide 16-doxyl stéarique (ROHN *et al.*, 2005).

Le *spin scavenging* correspond à la réaction d'un de ces composés radicalaires stables avec des radicaux présents dans leur environnement et permet d'étudier la réactivité des radicaux (Figure 13).

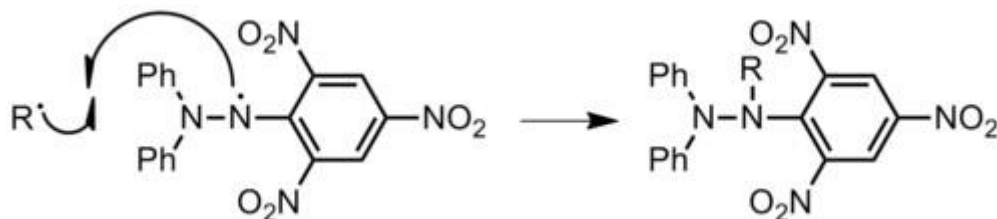
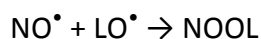
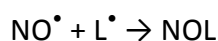


Figure 13 : Piégeage d'un radical lipidique $R^\bullet$ par le DPPH (composé radicalaire stable) avec formation d'une espèce non paramagnétique.

L'approche de cette méthode est basée sur les propriétés bien connues des radicaux synthétiques nitroxyles, qui leur permettent de réagir rapidement avec les radicaux centrés sur le carbone (constante de vitesse de l'ordre de 10^8 à $10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) pour former des produits diamagnétiques via recombinaison radical-radical. La méthode de *spin scavenging* pourrait ainsi être comparée à la phase de terminaison du phénomène d'oxydation entre les radicaux lipidiques et les radicaux nitroxyles :



La caractérisation et l'identification des produits formés sont rendues possible à l'aide de la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC / MS).

Les résultats obtenus par la méthode de *spin scavenging* sont en accord avec ceux obtenus par le *spin trapping* et ont montré que l'exposition à la lumière est un facteur plus important dans l'étape de formation des radicaux que le facteur température.

Le *spin scavenging* est également utilisé pour étudier l'activité des antioxydants. Deux paramètres différents peuvent alors être déterminés à partir de la cinétique de dégradation des radicaux nitroxyles : le potentiel antioxydant représente la vitesse de dégradation du radical. Celle-ci est déterminée par la mesure de la quantité de radical dégradé pendant la première minute de la réaction en présence d'une concentration constante en antioxydant. Le potentiel antioxydant est alors décrit comme étant un phénomène cinétique et est exprimé en μmol de radical dégradé par minute (ROHN *et al.*, 2005). La capacité antioxydante correspond à la concentration de radical consommé après un certain temps par une concentration donnée en antioxydant, par exemple à 15 minutes. Le résultat est exprimé dans ce cas en μmol de radical dégradé par μmol d'antioxydant (Figure 14).

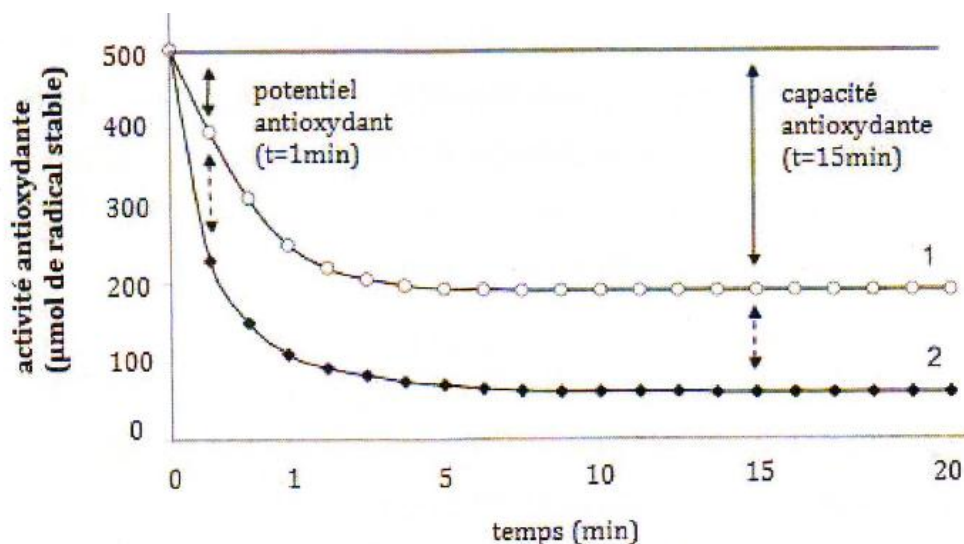


Figure 14 : Cinétique de disparition d'un radical stable en présence de deux antioxydants différents (1 et 2) (d'après ROHN et KROH, 2005).

Potentiel antioxydant exprimé en μmol de radical consommé par minute.

Capacité antioxydante exprimée en μmol de radical consommé par μmol d'antioxydant.

En résumé le *spin scavenging* permet la mesure de la réactivité des radicaux et d'évaluer la capacité anti-radicalaire des antioxydants. Il s'applique dans les huiles et différents systèmes alimentaires. Il a comme contrainte de nécessiter l'utilisation d'un radical stable de type nitroxy ($\text{NO}^\bullet$).

1.2.6 APPLICATIONS INDUSTRIELLES

L'oxydation des lipides est couramment estimée par la détection de la formation des produits d'oxydation primaires et secondaires, comme par exemple la mesure de l'indice de peroxyde ou le test TBARS. Ces dosages nécessitent de nombreuses étapes de préparation et ne détectent pas l'étape initiale de l'oxydation des lipides. C'est dans ce domaine que l'apport de la RPE est le plus intéressant. D'ores et déjà, plusieurs exemples d'utilisation de la RPE ont été proposés dans le secteur industriel pour le suivi de l'oxydation des lipides et l'évaluation de la stabilité des aliments.

En 2002, QUILES *et al.* ont utilisé la RPE afin d'étudier le rôle de la vitamine E et des composés phénoliques dans leur capacité antioxydante de différentes huiles utilisées en friture. Cette étude montre que la procédure de friture diminue bien la capacité antioxydante des huiles et que l'étude par RPE est corrélée avec le dosage des antioxydants, le dosage des composés polaires et la mesure des diènes conjugués. Dans ce cas et par rapport aux méthodes traditionnelles, la RPE est une méthode rapide et très sensible pour la détermination de la capacité antioxydante des huiles.

Le *spin trapping* a été également utilisé avec succès pour détecter la formation de radicaux libres et leur accumulation dans les toutes premières étapes de l'oxydation des lipides (KRISTENSEN *et al.*, 1999; VELASCO *et al.*, 2005). De plus, l'intensité de signal obtenu par RPE est bien corrélée avec la production d'hexanal dans la viande de poulet déshydratée et avec le degré d'oxydation de lait en poudre (NISSEN *et al.*, 2000) ce qui indique son potentiel dans l'estimation de la stabilité oxydative des aliments. La RPE a été acceptée comme une mesure rapide de la stabilité oxydative des aliments avec moins de préparation des échantillons par rapport aux anciennes méthodes.

Par ailleurs, GIUFFRIDA *et al.* (2007) ont montré le potentiel de la RPE dans la détermination de la stabilité oxydative d'huiles chauffées avec ou sans antioxydants.

De très bonnes corrélations ont été trouvées quant à l'évaluation de la stabilité oxydative de onze huiles végétales différentes par la RPE et le Rancimat d'une part ($r=0,963$) et par la RPE et la DSC ($r=0,979$) d'autre part (VELASCO *et al.*, 2004). Il en est déduit que le *spin trapping* peut prédire la stabilité oxydative des huiles plus rapidement que les méthodes traditionnelles et dans des conditions d'oxydation plus douces (oxydation effectuée seulement à 60°C).

La technique de *spin trapping* est également utilisée pour examiner la stabilité oxydative du moût et de la bière (ANDERSEN *et al.*, 2000 et 2001 ; KOCHERGINSKI *et al.*, 2005).

1.3 CONCLUSION

L'oxydation des lipides peut être évaluée de plusieurs manières, par le suivi des substrats oxydables ou par celui des produits d'oxydation. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients. Il est donc important de choisir la ou les méthodes les plus adéquates selon le système que l'on étudie et l'état d'oxydation attendu. L'utilisation de plusieurs méthodes est fortement recommandée.

Parmi ces méthodes, la RPE peut s'avérer un très bon outil : elle permet d'une part la détection précoce des changements dus à l'oxydation des lipides durant le stockage et d'autre part l'évaluation des effets protecteurs des antioxydants dans les aliments. La RPE est une technique puissante pour identifier et quantifier les espèces radicalaires ainsi que pour étudier les mécanismes d'oxydation tant physico-chimiques qu'enzymatiques.

Notre objectif est alors d'obtenir une meilleure connaissance de la nature et de la cinétique de formation des radicaux libres de type alkyles ($L^\bullet$), peroxydes ($LOO^\bullet$) ou encore oxydes ($LO^\bullet$) produits au cours de l'oxydation des acides gras insaturés, et plus précisément ceux impliqués dans les étapes précoces de l'oxydation. Une enzyme est utilisée pour initier la

réaction d'oxydation des lipides et la technique du spin trapping en résonance paramagnétique électronique est appliquée pour amorcer l'étude de la réactivité des composés radicalaires formés par la lipoxygénase.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIELS

II.1.1 EQUIPEMENT

Oxymètre : KMO2 basic, IKA Werk ; sonde à oxygène : Oxygen meter, Fibox 3 LCD-trace ; spectrophotomètre Agilent Technologies 8453 ; spectromètre BRUKER EMX.

II.1.2 LES PRODUITS

L'éthanol qualité Spectronorm, l'acide borique, le tétra-borate de sodium (borax) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, le dihydrogénophosphate de sodium $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, l'hydrogénophosphate de di-sodium $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ et le Tween 20 proviennent de chez VWR (France).

II.1.3 LES LIPOXYGENASES

La lipoxygénase (LOX) de soja provient de chez Sigma Aldrich et est conservée à -20°C . La solution de LOX de soja est préparée à 4 mg/mL dans de l'eau ultrapure et est conservée en fractions de 0,2 mL à -20°C . Son activité est de 0,1 nkat / μg d'enzyme à pH 9 et de 0,02 nkat / μg d'enzyme à pH 6,5.

Les lipoxygénases de fève et de blé ne se trouvent pas dans le commerce, elles ont été purifiées précédemment, selon un protocole adapté de NICOLAS et DRAPRON (1977) pour la lipoxygénase de fève, et de NICOLAS *et al.* (1982) pour la lipoxygénase de blé. Les purifications ont été effectuées dans notre laboratoire du CNAM à partir de farine de fève et de germes de blé provenant respectivement des Moulins AIT et Soufflet. Les fractions utilisées sont conservées à -20°C . A pH 6,5, l'activité de la lipoxygénase de fève est de 50 nkat / mL d'enzyme et celle de la lipoxygénase de blé est de 200 nkat / mL d'enzyme.

II.1.4 L'ACIDE LINOLEIQUE

L'acide linoléique (LH), de pureté 99 %, provient de chez Larodan. La solution mère à 100 mM est préparée dans de l'éthanol qualité Spectronorm et est conservée en fractions de 0,1 mL sous azote à -20°C afin de limiter son oxydation.

II.1.5 LES HYDROPEROXYDES

Le 13(S)-Hydroperoxy-9(Z), 11(E)-octadecadienoic acid (LOOH) provient de chez Larodan, sa pureté est $> 98\%$. Il est fourni par fractions de 500 μL contenant 1 mg d'hydroperoxydes solubilisés dans de l'éthanol (ce qui correspond à une concentration en hydroperoxydes de 6,41 mM). Ces fractions se conservent à 4°C avant ouverture de l'ampoule puis à -20°C après ouverture.

II.1.6 LES PIEGEURS DE SPIN

➤ L' α -(4-Pyridyl *N*-oxide)-*N*-*tert*-butylnitrone (POBN) est fourni par Sigma Aldrich, sa pureté est de 99 % et son poids moléculaire de 194,29 g/mol. Les solutions mères à 100 mM ou 50 mM sont préparées dans du tampon borate pH 9 et conservées à 4 °C.

➤ Le 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL) est fourni par Fluka, sa pureté est ≥ 98 % et son poids moléculaire est de 172 g/mol. La solution mère à 10 mM est préparée dans du tampon borate pH 9 et est conservée à 4 °C.

II.1.7 LES SOLUTIONS TAMPON

➤ Le tampon borate pH 9 est préparé à partir de deux solutions : 20 % en volume d'acide borique à 0,2 M et 80 % en volume de borax à 0,05 M.

➤ Le tampon phosphate pH 6,5 est préparé à partir de 68,5 mL de dihydrogénophosphate de sodium à 0,2 M et de 31,5 mL d'hydrogénophosphate de di-sodium à 0,2 M dilués dans 200 mL d'eau ultrapure.

Ces solutions sont conservées à 4 °C.

II.1.8 LA SOLUTION DE TWEEN 20

Une solution aqueuse de Tween 20 (T₂₀) est préparée à 50 mM dans de l'eau ultrapure. Le Tween 20 est un tensio-actif qui permet de solubiliser l'acide linoléique lorsque ce dernier est utilisé à un pH inférieur à son pKa, soit 7,4.

II.1.9 SUBSTRAT « RAPPORT MOLAIRE 4 » OU RM4

La méthode de préparation de ce substrat a été développée au laboratoire par BOUSSARD *et al.* (2008). Ce substrat est utilisé pour le dosage de l'activité lipoxygénasique à des pH inférieurs à 8. Le principe est de garder un rapport molaire constant de 4 entre l'acide linoléique et le Tween 20.

Le Rapport Molaire $RM = ([LH] - CMC_{LH}) / ([T_{20}] - CMC_{T_{20}})$ avec CMC : Concentration Micellaire Critique.

A pH 6,5, $CMC_{LH} = 0,02$ mM selon VERHAGEN *et al.* (1978) et $CMC_{T_{20}} = 0,06$ mM selon la fiche technique de ALDRICH et les vérifications réalisées au sein du laboratoire.

Selon BOUSSARD *et al.* (2008), un rapport molaire de 4 entre l'acide linoléique et le Tween 20 donne des solutions de substrat pour lesquelles les activités lipoxygénasiques sont maximales aux pH inférieurs à 8.

Pour préparer 25 mL de substrat RM4 à 1 mM d'acide linoléique, il faut mélanger 0,25 mL de LH (à 0,1 M) et 0,152 mL de T₂₀ (à 50 mM) avant de compléter à 25 mL par du tampon phosphate pH 6,5.

II.1.10 LES ANTIOXYDANTS

Le 2,6-*di-tert*-butyl-4-méthylphénol (BHT) provient de chez Sigma Aldrich, sa pureté est de 99 % ; la (+)-catéchine et l'acide chlorogénique proviennent de chez Sigma Aldrich et ont des puretés > 98 % ; les α -, β -, γ - et δ -tocophérols proviennent de chez Calbiochem et leur pureté est $\geq$ 95 %.

II.2 DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

II.2.1 POLAROGRAPHIE

Un oxymètre équipé d'une électrode de Clark est relié à un appareil d'enregistrement. L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent plongeant dans un électrolyte (le chlorure de potassium). L'électrode permet de mesurer la quantité d'oxygène dans une solution introduite dans la cellule de mesure. Il sera alors possible de suivre l'évolution de la quantité d'oxygène au cours du temps dans la solution étudiée. Une mole d'oxygène oxydant une mole d'acide linoléique, cette méthode permet de déterminer directement l'activité enzymatique par la mesure de la vitesse de consommation de l'oxygène moléculaire présent dans le milieu étudié.

Le tampon borate, ou le substrat RM4, doit préalablement être saturé en air par bullage à 30 °C. Il doit être maintenu à 30 °C pendant la mesure et soumis à une agitation continue par barreau aimanté pour permettre une homogénéité du milieu réactionnel. Le suivi de la diminution de l'oxygène au cours du temps est réalisé par le programme Xplorer GLX simulator qui enregistre les mesures.

L'étalonnage de l'oxygraphe est effectué par une solution d'eau ultrapure saturée en air (soit une teneur égale à 220 μ M à 30 °C) et maintenue à 30 °C.

Après étalonnage, les mesures sont effectuées avec 1,4 mL de substrat (1 mM en acide linoléique) introduits dans la cellule de mesure. Après avoir vérifié la stabilité de la ligne de base, la réaction enzymatique est déclenchée par addition de l'enzyme et la cellule est immédiatement obturée. La pente maximale de la consommation de l'oxygène en fonction du temps est utilisée pour calculer l'activité enzymatique en nkat (nombre de moles d'oxygène consommées par seconde). Selon les besoins, les activités des préparations enzymatiques sont exprimées en nkat par unité de volume ou par unité de poids.

Chaque mesure est réalisée au moins deux fois.

II.2.2 SONDE FLUORESCENTE

Une sonde fluorescente à oxygène, sous forme de pastille, est fixée sur la paroi d'un tube Eppendorf de 2 mL à une hauteur d'environ 5 mm. La solution à étudier (1 mL) immerge cette pastille. Une source lumineuse placée à l'extérieur du tube et perpendiculaire à la sonde excite cette sonde qui passe de son état fondamental à un état excité. Un retour à l'état fondamental implique une perte d'énergie avec émission de lumière. En présence d'oxygène, une partie de l'énergie sera transférée vers l'oxygène provoquant une réduction de la quantité de lumière émise. En d'autres termes, lorsque la pression en oxygène augmente dans l'environnement de la sonde, la fluorescence de celle-ci diminue. Une quantification est possible en mesurant l'intensité de luminescence émise par la sonde excitée au cours du temps. Le signal lumineux est converti dans le transmetteur en aval et mis à disposition de l'utilisateur dans les unités connues de saturation en oxygène (pourcentage d'oxygène résiduel). Il est alors possible de mesurer les vitesses maximales de consommation de l'oxygène.

Avec la lipoxygénase de soja à pH 9, la vitesse de la consommation en oxygène a été étudiée en fonction de la quantité d'enzyme entre 2 et 12 µg d'enzyme dans 1 mL de milieu réactionnel contenant 1 mM d'acide linoléique et 0,03 mM de TEMPOL.

Le mécanisme réactionnel de l'enzyme ainsi que les constantes cinétiques ont été déterminés par cette méthode en présence de 0,03 mM de TEMPOL et des concentrations en acide linoléique variables (de 0,25 mM à 1 mM) pour 4 et 8 µg de lipoxygénase dans 1 mL de milieu réactionnel (mesures avec 5 % d'éthanol à chaque fois).

Les effets de l'ajout d'hydroperoxydes, d'éthanol et de BHT ont été étudiés en présence de 0,03 mM de TEMPOL, 1 mM d'acide linoléique et 0,4 nkat de lipoxygénase de soja pour 1 mL de milieu réactionnel (toujours à éthanol constant et ne dépassant pas 5 %).

A pH 6,5, le substrat RM4 a été utilisé avec 1 mM d'acide linoléique et 0,03 mM de TEMPOL. La consommation en oxygène a été mesurée avec 6 µg de lipoxygénase de soja ; de 3 à 20 µL de lipoxygénase de blé ; 12 et 80 µL de lipoxygénase de fève (pour 1 mL de milieu réactionnel).

II.3 SUIVI DE LA FORMATION DES ADDUITS POBN PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV

La réaction d'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase de soja dans le tampon borate à pH 9 a été suivie par spectrophotométrie entre 200 et 400 nm en présence ou non de POBN. Les concentrations en acide linoléique ont varié de 0,4 à 1 mM et celles de POBN de 0 à 0,1 mM. Les quantités d'enzyme ont varié de 0 à 200 µg dans un volume total de 2,5 mL. La réaction est suivie pendant 10 minutes avec un enregistrement de spectre réalisé toutes les 10 secondes. Les absorbances à 234, 285 et 330 nm ont été plus particulièrement extraites de ces données spectrales. Ces longueurs d'ondes sont caractéristiques des doubles liaisons conjuguées (hydroperoxydes), des oxodiènes (et du POBN modifié) et du POBN natif respectivement. Suivant les besoins, les réactions enzymatiques ont été conduites dans des milieux réactionnels saturés en air à 30 °C ou débarrassés d'oxygène soit par une réaction enzymatique préalable soit par passage d'un courant d'azote.

II.4 SUIVI DES ESPECES RADICALAIRES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)

Les paramètres du spectromètre sont les suivants : champ central de 3400 G, largeur de balayage de 120 G, fréquence de 9,56 GHz, puissance des micro-ondes de 20 mW, gain de $5,02 \cdot 10^4$, modulation de fréquence de 100 kHz, modulation d'amplitude de 1,0 G, constante de temps de 10,24 ms, temps de conversion de 5,12 ms, temps de balayage de 20,97 s, résolution de 4096 points.

L'échantillon est introduit dans une cellule plate en quartz d'un volume de 150 µL. Pour des raisons pratiques de manipulation, 1 minute environ s'écoule entre le début de la réaction que l'on souhaite suivre et le suivi par RPE des espèces radicalaires (délai de mise en cellule de RPE de la solution à étudier et de réglage de l'appareil de mesure).

Le spectre enregistré est la dérivée première de la courbe d'absorption qui représente l'énergie absorbée en fonction du champ magnétique. La quantité de radicaux est mesurée par l'intensité de la première raie du spectre. Les spectres sont analysés à l'aide du logiciel Winepr® et l'intensité maximale de la première raie est déterminée par la fonction peak peaking.

II.4.1 ESSAIS AVEC LE POBN COMME PIEGEUR DE SPIN

II.4.1.1 En présence d'oxygène.

La formation des adduits de spin est effectuée dans un milieu modèle contenant 1 mM d'acide linoléique et 50 mM de POBN dans du tampon borate pH 9. 500 µL de ce substrat sont placés au bain-marie à 30 °C, dans un tube Eppendorf, pendant 10 minutes. Il y a ensuite ajout

de 5 à 40 μg de lipoxygénase de soja (cette quantité d'enzyme est toujours apportée par un volume de 10 μL plus ou moins diluée dans de l'eau distillée de manière extemporanée). Le milieu réactionnel est agité fortement au vortex pendant 1, 3 ou 5 minutes pour assurer un apport permanent en oxygène. 150 μL d'échantillon sont alors introduits dans la cellule de mesure RPE à l'aide d'une seringue à longue aiguille, la cellule est bouchée et placée dans la cavité de mesure RPE pour analyse.

Chaque mesure est réalisée au moins deux fois (à chaque fois, 1 mL de substrat est préparé et séparé en deux fractions de 500 μL qui seront analysées dans les mêmes conditions, c'est-à-dire même quantité d'enzyme et même temps d'agitation).

II.4.1.2 En absence d'oxygène.

Le substrat est préparé dans les mêmes conditions en ajoutant 0,15 ou 0,25 mM d'hydroperoxydes puis 500 μL sont placés au bain-marie à 30 °C pendant 12 minutes avec un fin bullage d'argon (débit de 4 mL / min) dans le milieu réactionnel afin de le débarrasser de l'oxygène. Des manipulations préalables avec mesure de l'oxygène contenu dans le milieu réactionnel par la sonde à oxygène ont permis de déterminer le débit et le temps de bullage d'argon pour être en anoxie. Après les 12 minutes, 2 μg de lipoxygénase de soja sont ajoutés, le milieu est homogénéisé au vortex avant d'être introduit dans la cellule de mesure à l'aide de la seringue à longue aiguille en prenant soin de ne pas faire de bulle et d'être rapide pour éviter au possible toute rentrée d'oxygène.

II.4.2 ESSAIS AVEC LE TEMPOL COMME PIEGEUR DE SPIN

II.4.2.1 Préparation de la gamme d'étalonnage.

L'objectif est d'exprimer l'intensité spectrale en unité de concentration et non en unité arbitraire. La molécule de référence utilisée pour tracer la courbe d'étalonnage est le TEMPOL qui, par sa fonction aminoxyle, est une molécule radicalaire stable. Il s'agit donc de porter l'intensité spectrale en fonction de la concentration en TEMPOL.

La courbe d'étalonnage du TEMPOL dans du tampon borate pH 9 est effectuée en effectuant les spectres de 7 solutions de TEMPOL ayant des concentrations comprises entre 0,5 et 30 μM .

II.4.2.2 En présence d'oxygène.

La majorité des essais sont réalisés avec la lipoxygénase de soja en tampon borate pH 9. 500 μL de milieu réactionnel sont placés au bain-marie à 30 °C pendant 10 minutes. Il contient 0,03 mM de TEMPOL et, selon les expérimentations, des concentrations variables en acide

linoléique (de 0,25 à 1,25 mM), en hydroperoxydes (de 0 à 0,25 mM), en BHT (de 0 à 0,03 mM) et des quantités variables d'éthanol (1 ou 5 %) et d'enzyme (de 0 à 6 µg). Le milieu réactionnel est homogénéisé et est immédiatement placé en cellule RPE pour mesure.

A pH 6,5, utilisation du substrat RM4 contenant 0,03 mM de TEMPOL et 1 mM d'acide linoléique. La réaction est initiée par des quantités d'enzymes variables selon les expérimentations.

II.4.2.3 En absence d'oxygène.

Le mode opératoire de mise en anaérobiose et de mise en cellule de RPE pour les mesures est le même que celui décrit dans le paragraphe II.4.1.2.

Les essais sont réalisés avec 0,03 mM de TEMPOL, des concentrations variables en acide linoléique (de 0 à 1 mM), en hydroperoxydes (de 0 à 0,25 mM), en BHT (de 0 à 0,06 mM) et des quantités variables en lipoxigénase.

Certains essais sont réalisés avec 0,3 mM de TEMPOL, des concentrations en acide linoléique entre 0 et 1 mM et en hydroperoxydes entre 0 et 0,1 mM. La quantité de lipoxigénase de soja utilisée est de 20 µg.

Tous les essais sont réalisés au moins en double et avec une quantité d'éthanol constante qui ne dépasse pas 5 % en volume du milieu réactionnel.

III. RESULTATS

Notre objectif est d'évaluer les vitesses de réaction impliquant les radicaux libres de nature lipidique qui se forment pendant l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Ces espèces radicalaires sont très réactives (très instables) ce qui rend impossible leur suivi en RPE, sauf à se placer à de très basses températures. S'agissant de radicaux libres, les réactions peuvent être de deux types :

- des réactions de propagation avec des molécules non radicalaires (oxygène, composés phénoliques, thiols, caroténoïdes,...) pour donner d'autres formes radicalaires (en général plus stables) et
- des réactions de terminaison entre deux formes radicalaires pour donner des espèces non radicalaires (diminution du nombre de radicaux libres).

En utilisant des piègeurs de radicaux libres, la RPE permet de suivre spécifiquement l'évolution des formes radicalaires (paramagnétiques) dans la mesure où leurs durées de vie ne sont pas trop courtes. Les piègeurs utilisables peuvent être :

- soit des formes non radicalaires qui, en réagissant avec les radicaux libres lipidiques, vont générer des formes radicalaires plus stables (réactions de propagation), c'est le « *spin trapping* »,
- soit des formes radicalaires assez stables qui, en réagissant avec les radicaux libres lipidiques, vont donner des formes non radicalaires (réactions de terminaison), c'est le « *spin scavenging* ».

Les réactions du piègeur avec les radicaux libres lipidiques se traduisent par une augmentation de l'intensité du signal en RPE dans le premier cas et par une diminution dans le second.

III.1. EXPERIMENTATIONS AVEC LE POBN (*SPIN TRAPPING*)

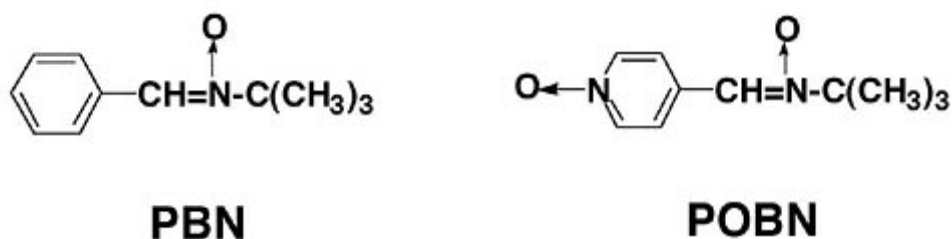
Le choix du piègeur (*spin trap*) doit être guidé par son adaptabilité aux conditions expérimentales, pH et température notamment, mais aussi par sa solubilité. Par ailleurs, les produits d'addition formés doivent être solubles et stables. Enfin, la complexité du spectre RPE obtenu tout comme la concentration en piègeur nécessaire pour avoir un piégeage convenable sont également à prendre en compte.

Les piègeurs de type nitroso provoquent la formation d'adduits ayant une bonne empreinte des radicaux piégés $L^{\bullet}$ car la fixation des radicaux a lieu sur l'atome d'azote et le

spectre RPE obtenu est alors caractéristique de la structure du radical piégé. Cependant, ces piègeurs sont thermiquement et photochimiquement instables.

C'est pour cette raison qu'il est préférable de choisir un piègeur de type nitrone, plus stable. Avec ce type de piègeur, les radicaux $L^\bullet$ se fixent sur le carbone en α du groupement nitroxy. Ceci implique que le spectre RPE obtenu n'est pas caractéristique de la nature du radical piégé. Il est alors nécessaire de réaliser un couplage RPE-HPLC pour élucider la structure des produits formés.

Parmi les nitrones, l' α -phényl-N-*tert*-butylnitron (PBN) a été utilisé avec succès par ROMAN *et al.* (2009) pour piéger les radicaux lipidiques issus de la dégradation thermique des huiles. Cependant, ce composé est très peu soluble en milieu aqueux donc difficilement utilisable dans notre cas. Nous avons alors opté pour l' α -(4-pyridyl-1-oxyde)-N-*tert*-butylnitron (POBN) dont la structure est proche de celle du PBN mais qui présente l'avantage d'être soluble dans l'eau.



Des études préliminaires ont permis de montrer que l'ajout de POBN jusqu'à 50 mM n'affecte pas l'activité enzymatique de la lipoxygénase de soja à pH 9. L'activité a été déterminée par la mesure polarographique de la consommation d'oxygène dans une solution de tampon borate à pH 9 contenant l'acide linoléique (1 mM) et la lipoxygénase de soja. Par rapport à l'activité mesurée en absence de POBN, les écarts de vitesse de consommation d'oxygène restent inférieurs à 5 % lorsque la concentration en POBN varie de 10 à 50 mM (Tableau II).

Tableau II : Influence de l'ajout de POBN sur l'activité de la lipoxygénase de soja à pH 9 (1,5 mL de tampon borate à pH 9, LH 1 mM, POBN de 0 à 50 mM, 5 μ L de LOX soja à 4 mg.mL⁻¹).

	Témoin	POBN				
	Sans POBN	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM
Activité de la LOX (nkat.mL ⁻¹)	395 $\pm$ 12	386 $\pm$ 8	389 $\pm$ 10	395 $\pm$ 9	402 $\pm$ 6	405 $\pm$ 3

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par RABII (2011) qui a également constaté l'absence d'inhibition de l'activité de la lipoxygénase de soja à pH 9 après ajout de 50 mM en POBN.

Par ailleurs, en solution aqueuse, le POBN présente des caractéristiques spectrales intéressantes dans l'UV (Figure 15).

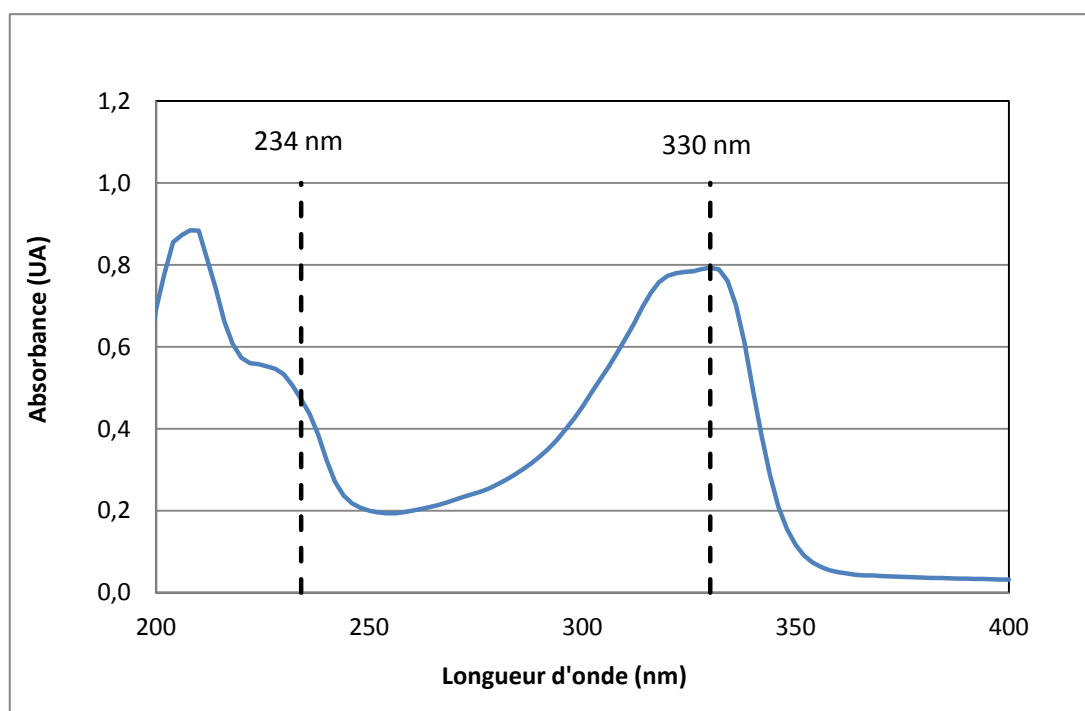


Figure 15 : Spectre du POBN (50 μ M) en solution dans le tampon borate pH 9

En effet, en raison de la présence de la double liaison -C=N- dans la chaîne latérale couplée à l'hétérocycle, un maximum d'absorption est observé à 330 nm ($\epsilon_{M330}=16000.M^{-1}.cm^{-1}$). Cette longueur d'onde est éloignée de celles correspondant aux produits d'oxydation des lipides (234 nm pour les hydroperoxydes et 285 nm pour les oxodiènes). De plus, l'addition du radical lipidique sur l'atome de carbone en α du groupement nitroxy provoque la disparition de la

double liaison $-C=N-$ ce qui modifie le spectre UV, avec une diminution de l'absorbance à 330 nm et une augmentation à 280-285 nm. Il est donc *a priori* possible de mener en parallèle une étude par spectroscopie UV (suivi de la consommation du piègeur à 330 nm) et par RPE (suivi de la formation d'adduits radicalaires).

Ainsi que cela a été indiqué dans le chapitre travaux antérieurs, en présence d'acides gras polyinsaturés, la lipoxygénase est susceptible de générer des radicaux libres lipidiques selon deux voies :

- la voie aérobie, en présence d'oxygène et
- la voie anaérobie, en présence d'hydroperoxydes et en absence d'oxygène

Dans la première voie, il se forme initialement des radicaux $L^\bullet$ et $LOO^\bullet$ alors que dans la seconde voie, les formes initiales principales sont les formes $L^\bullet$ et $LO^\bullet$.

Il est toutefois envisageable que pendant la réaction aérobie et si l'oxygène n'est pas renouvelé, la réaction anaérobie prenne de l'importance si les concentrations en substrats (acide linoléique et hydroperoxyde) sont suffisantes.

Dans la suite du mémoire, l'emploi du terme « phase aérobie » signifie que la réaction enzymatique a débuté dans un milieu réactionnel saturé en air donc dans lequel l'oxygène n'est pas initialement limitant. Cependant, dans un tel milieu, si l'oxygène n'est pas renouvelé, il est envisageable que la réaction se poursuive en « phase anaérobie ». Nos résultats seront donc présentés soit en phase aérobie (présence d'oxygène au début de la réaction enzymatique) soit en phase anaérobie (élimination de l'oxygène et ajout d'hydroperoxydes au début de la réaction enzymatique).

III.1.1. REACTIVITE DES RADICAUX GENERES EN PHASE AEROBIE

III.1.1.1. Etude par spectroscopie UV

Dans une première expérimentation d'oxydation de l'acide linoléique (0,4 mM) par la lipoxygénase de soja (10 nkat) à pH 9 en présence de POBN (50 μ M), les spectres UV entre 200 et 400 nm ont été enregistrés toutes les 10 secondes pendant 10 minutes (Figure 16b).

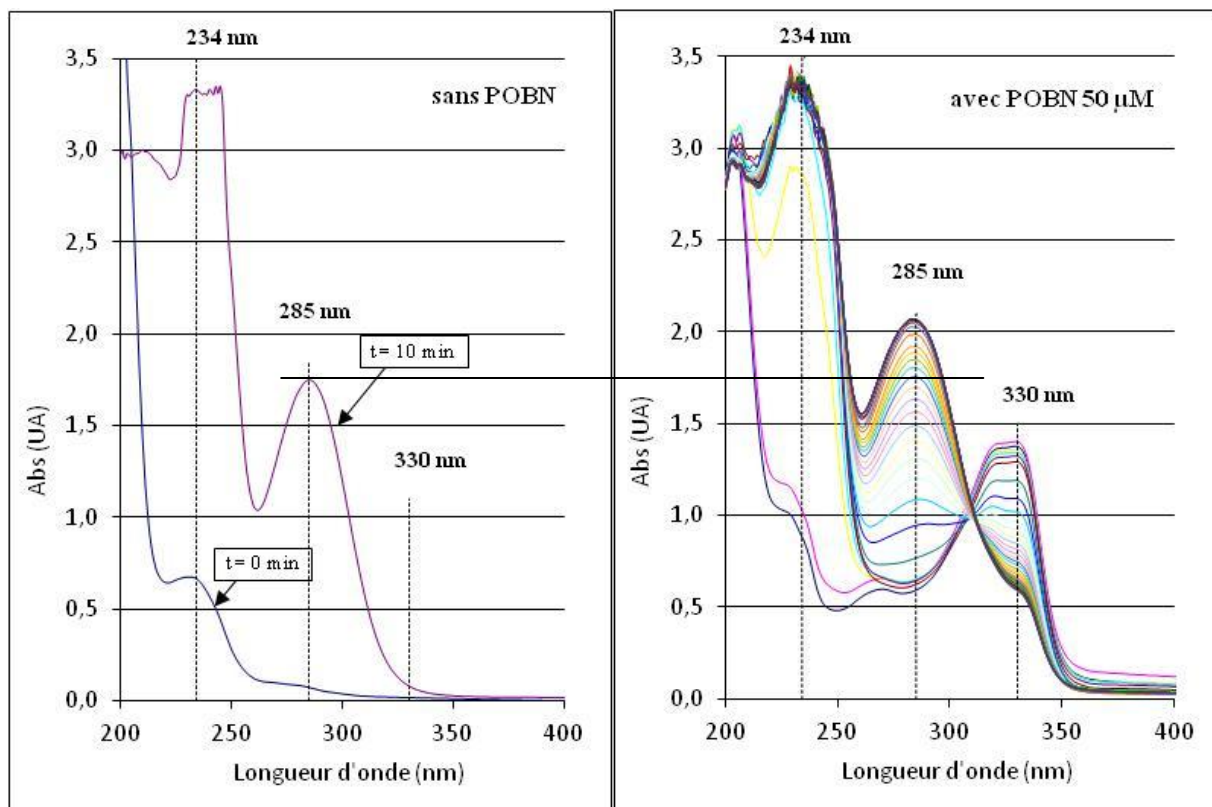


Figure 16 : Evolution du spectre UV pendant les dix premières min. de l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique en absence de POBN (à gauche) ou en présence de 50 μM de POBN (à droite).

(3 mL de tampon borate pH 9 ; 10 nkat de LOX soja ; LH 0,4 mM. Spectre enregistré toutes les 10 s. pendant 10 min.)

Lorsque l'évolution de l'absorbance est plus particulièrement suivie à 234, 285 et 330 nm, il apparaît une augmentation immédiate à 234 nm puisque celle-ci passe de 0,5 à plus de 3 en moins de 30 secondes alors que les absorbances à 285 et 330 nm sont quasi stables pendant près de 50 secondes (Figure 17).

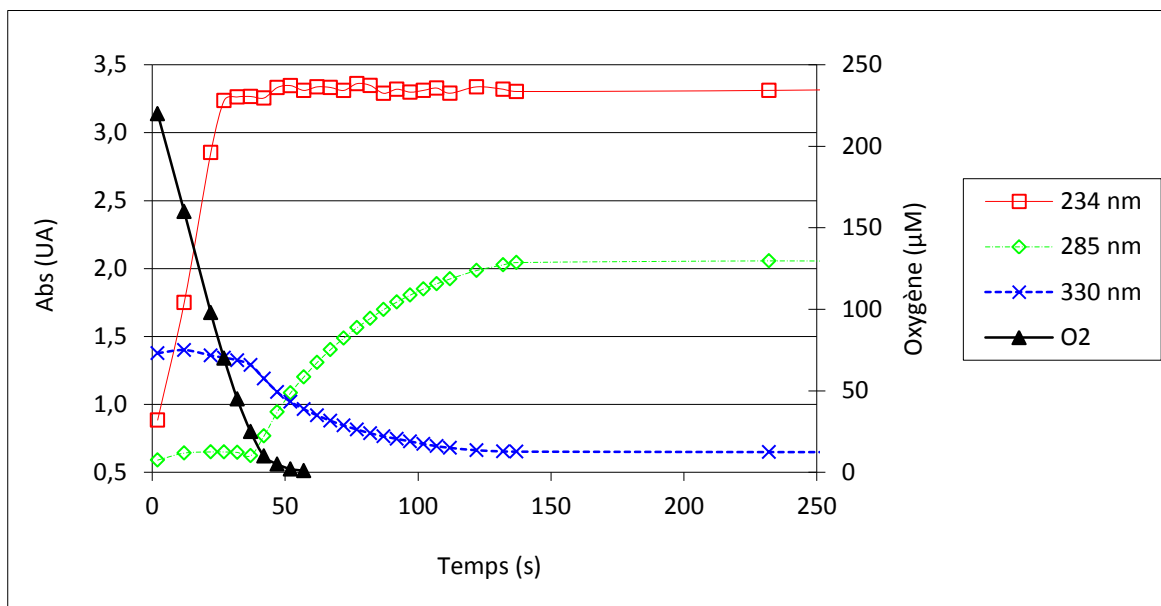


Figure 17 : Evolutions de l'oxygène et des absorbances à 234, 285 et 330 nm pendant l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique en présence de POBN suivies en polarographie et en spectrophotométrie.

(Spectrophotométrie : 10 nkat de LOX soja ; LH 0,4 mM ; POBN 50 μM dans 3 mL de tampon borate pH 9. Polarographie : volume total 1,5 mL, 5 nkat de LOX soja, concentrations en LH et en POBN identiques à la spectrophotométrie.)

Au-delà de 50 secondes, l'absorbance à 285 nm augmente nettement de 0,6 à 2 alors que celle à 330 nm diminue parallèlement de 1,4 à 0,7. Une expérience identique conduite pour suivre la consommation d'oxygène montre que l'augmentation à 285 nm et la diminution à 330 nm se produisent lorsque la teneur en oxygène devient très faible (Figure 17).

Une expérience similaire réalisée en absence de POBN (Figure 16a) montre une augmentation identique à 234 nm ainsi qu'une augmentation à 285 nm mais celle-ci est moins importante puisque la valeur maximale atteinte ne dépasse pas 1,75 au lieu de 2 en présence de POBN. Par ailleurs, en raison de l'absence de POBN, il n'y a pas d'évolution à 330 nm.

L'augmentation rapide de l'absorbance à 234 nm rend compte de la formation de diènes conjugués (hydroperoxydes) alors que celle observée plus tardivement en absence d'oxygène à 285 nm correspond à la formation d'oxodiènes (produits secondaires de l'oxydation des lipides). Ce résultat a déjà été observé par Garssen *et al.* qui, dès 1971, avaient mis en évidence l'existence d'une réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9. Ces auteurs ont proposé qu'en milieu anaérobie et en présence d'acide linoléique et d'hydroperoxydes, la lipoxygénase provoquait l'apparition d'oxodiènes et de pentane via la formation de radicaux $L^{\bullet}$ (à partir de LH) et $LO^{\bullet}$ (à partir de LOOH).

Notre expérience montre par ailleurs que la consommation de POBN mesurée par l'évolution de l'absorbance à 330 nm est faible tant que le milieu contient de l'oxygène et ne

devient notable que lorsque ce dernier a quasiment disparu. Il est probable qu'en milieu aérobie les radicaux $L^{\bullet}$ formés par la lipoxygénase réagissent préférentiellement avec l'oxygène (plutôt qu'avec le POBN) alors qu'en anaérobie, la réaction des radicaux libres d'origine lipidique sur le carbone en α de l'azote du POBN se produit. Elle provoque la disparition de la double liaison conjuguée avec l'hétérocycle et conduit logiquement à une diminution de l'absorbance à 330 nm (Figure 17). Cette perte de conjugaison de la double liaison doit tout aussi logiquement provoquer une augmentation de l'absorbance à des longueurs d'onde moins élevées dans la zone d'absorbance des oxodiènes. Ceci est en accord avec les résultats de plusieurs auteurs qui indiquent pour les adduits de POBN un maximum d'absorption se situant entre 265 et 290 nm en fonction du solvant (ORTIZ DE MONTELLANO *et al.*, 1983, ALBRO *et al.*, 1992, YU *et al.*, 2008).

Par la suite, nous avons étudié par spectrophotométrie UV les évolutions des absorbances à 234, 285 et 300 nm dans des milieux réactionnels contenant des teneurs variables en acide linoléique (entre 0,15 et 1 mM) et en lipoxygénase de soja (entre 5 et 20 nkat pour 3 mL de tampon borate à pH 9) en absence ou en présence de POBN (50 μ M). Pour chacune de ces expérimentations, nous avons déterminé la durée de la phase aérobie (estimée à partir du début de l'augmentation de l'absorbance à 285 nm), la vitesse maximale d'augmentation de l'absorbance à 285 nm et la vitesse maximale de diminution de l'absorbance à 330 nm. L'ensemble des résultats obtenus sont reportés dans le Tableau III.

Tableau III : Influence de la teneur en LH, de la quantité de LOX soja et de la présence de POBN sur la durée de la phase aérobie et les vitesses maximales d'augmentation de l'absorbance à 285 nm et de diminution de l'absorbance à 330 nm.

(3,8 mL de tampon borate pH 9 ; LH de 0,3 à 1 mM ; LOX soja de 5 à 20 nkat ; POBN 0 ou 50 μ M.)

Acide linoléique		0,3 mM			0,5 mM			0,75 mM			1 mM		
Lipoxygénase ajoutée (nkat)		5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
Durée de la phase aérobie (s)	- POBN	205	85	50	165	90	35	145	85	30	125	85	35
	+ POBN	210	85	45	165	85	35	140	85	30	125	85	30
$V_{max_{285nm}}$ (mUA.s ⁻¹)	- POBN	2,56	7,66	8	3,65	8,5	13,9	3,83	6,29	14,9	3,85	7,81	10,6
	+ POBN	2,87	7,18	9,85	3,88	7,04	17,4	3,97	7,06	16,5	4,05	7,36	13,5
$V_{max_{330nm}}$ (mUA.s ⁻¹)	+ POBN	2,12	4,91	6,24	2,52	4,5	8,24	2,63	3,29	8,9	2,57	4,96	6,65

Ce tableau montre que, pour une concentration en acide linoléique donnée, l'ajout croissant de lipoxygénase de soja provoque logiquement une diminution de la durée de la phase aérobie et un accroissement de la vitesse d'augmentation de l'absorbance à 285 nm. De même, l'accroissement de la concentration en acide linoléique diminue la durée de la phase aérobie pour 5 nkat de lipoxygénase ajoutés et est sans effet pour les activités plus élevées. Une augmentation des vitesses d'évolution de l'absorbance à 285 nm est également observée quand la concentration en acide linoléique augmente (à l'exception de la teneur la plus élevée). Quelles que soient les teneurs en acide linoléique et les quantités de lipoxygénase ajoutées, la présence de POBN ne modifie pas la durée de la phase aérobie confirmant ainsi l'absence d'effet du POBN sur la vitesse de consommation d'oxygène. Par contre, la présence de POBN provoque un accroissement moyen de 10 à 12 % de la vitesse maximale d'augmentation de l'absorbance à 285 nm ainsi que le montre la Figure 18.

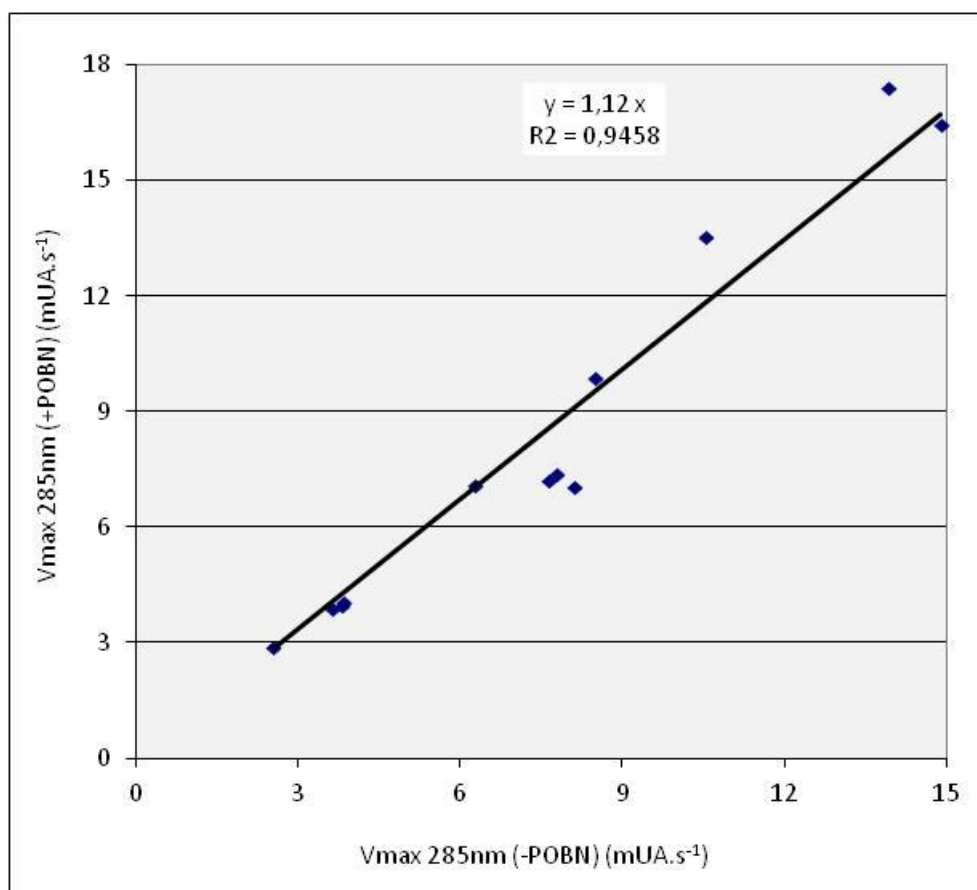


Figure 18. : Effet de la présence de POBN (50 µM) sur la vitesse maximale d'augmentation de l'absorbance à 285 nm.

(Voir conditions expérimentales dans le Tableau III.)

Cet accroissement de l'absorbance à 285 nm est probablement lié à la formation des adduits entre les radicaux libres lipidiques et le POBN.

Par ailleurs, pour l'ensemble des expérimentations en présence de POBN, lorsque la vitesse maximale de diminution de l'absorbance à 330 nm est portée en fonction de la vitesse d'augmentation de l'absorbance à 285 nm, une droite est obtenue (Figure 19).

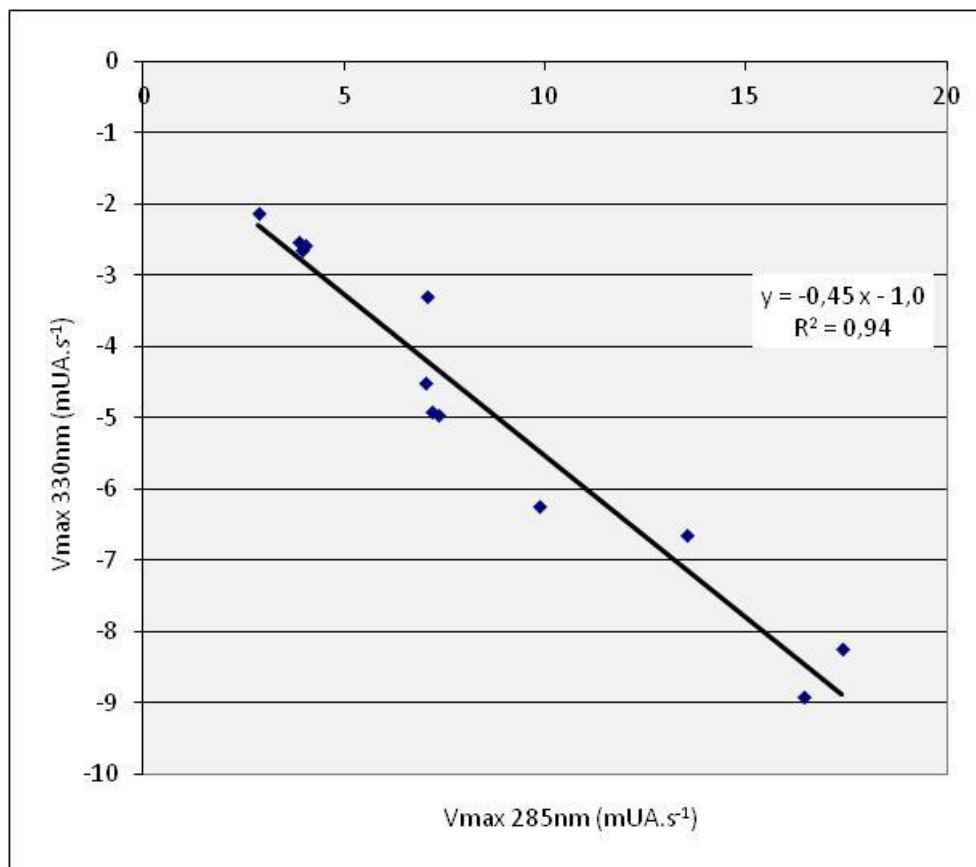


Figure 19 : Vitesse maximale de diminution de l'absorbance à 330 nm en fonction de la vitesse maximale d'augmentation de l'absorbance à 285 nm en présence de POBN (50 μ M).
(Voir conditions expérimentales dans le Tableau III.)

Ce résultat conforte l'hypothèse que la consommation du POBN (évaluée à 330 nm) est liée à l'apparition des oxodiènes et donc à la mise en place de l'anaérobiose dans le milieu expérimental. Par ailleurs, la pente de la droite est égale à 0,45 ce qui signifie que la vitesse d'augmentation de l'absorbance à 285 nm est plus de 2 fois plus élevée que la vitesse de diminution de l'absorbance à 330 nm.

Nous avons également suivi la réaction avec 0,15 mM d'acide linoléique (résultats non montrés dans le Tableau III). Avec cette concentration en acide linoléique, aucune augmentation d'absorbance à 285 nm (en absence ou en présence de POBN) ni diminution d'absorbance à 330 nm (en présence de POBN) n'est observée et ce, quelle que soit la quantité d'enzyme ajoutée. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la concentration en acide linoléique (0,15 mM) est insuffisante pour que l'oxygène présent (0,22 mM) soit consommé en totalité ce qui exclut d'atteindre l'anaérobiose. Cela induit une absence de formation de

produits secondaires de l'oxydation et donc une absence d'évolution de l'absorbance à 285 nm. Parallèlement à cela, l'absorbance à 330 nm ne diminue pas ce qui montre là encore que le POBN ne forme des adduits avec les radicaux libres lipidiques avec une vitesse mesurable que si la teneur en oxygène est très faible.

En conclusion, par une technique simple et rapide, il a été possible de suivre la consommation du POBN par spectroscopie UV ce qui a permis de mettre en évidence l'importance de la teneur en oxygène dans le milieu. Nous avons ainsi montré que la réaction du POBN avec les radicaux lipidiques était fortement ralentie voire inexistante en présence d'oxygène. Il est probable que l'oxygène réagisse beaucoup plus rapidement avec les radicaux libres $L^\bullet$ formés par la lipoxygénase que le POBN. Les travaux seront donc à orienter ultérieurement vers la réaction anaérobie de la lipoxygénase.

III.1.1.2. Etude par spectroscopie de RPE

III.1.1.2.1 Effet de l'éthanol sur la production d'adduits

L'acide linoléique étant préparé en solution éthanolique, nous avons tout d'abord mesuré l'effet de l'éthanol sur le POBN. QIAN *et al.* (2003) ont en effet mis en évidence l'existence d'adduits formés entre le POBN et l'éthanol ayant servi à la préparation et au stockage de la solution d'acide linoléique. Ces adduits correspondent à la réaction du radical $\cdot C_2H_4OH$ provenant de l'oxydation de l'éthanol avec le POBN. Cela a également été montré par RABII (2011) : une solution de POBN à 50 mM a été préparée dans de l'éthanol puis une fraction a été conservée pendant trois jours à 4 °C, l'autre à la température du laboratoire (20-25 °C). Après trois jours, un spectre RPE de chaque fraction est réalisé. Pour l'échantillon conservé à 4 °C, il y a apparition d'un signal très peu intense. Pour l'échantillon conservé à 20-25 °C, il y a apparition d'un signal correspondant à un triplet de doublets avec une intensité de la première raie égale à $3,5 \cdot 10^5$ UA traduisant la présence d'adduits radicalaires entre le POBN et l'éthanol. Cette formation d'adduits serait donc éventuellement à prendre en considération lors de l'analyse des résultats de notre système d'oxydation.

Cependant, la durée de nos réactions d'oxydation est très courte par rapport aux durées de réactions étudiées ci-dessus. En outre, les proportions d'éthanol utilisées sont également bien plus faibles. Nous avons donc étudié la réactivité du POBN avec l'éthanol sur des temps plus courts et avec des quantités d'éthanol correspondant à nos réactions d'oxydation.

Pour ce faire, une solution de POBN à 100 mM dans du tampon borate pH 9 est mise en présence de 20 μ L d'éthanol pendant 10 minutes à 30 °C. Le suivi de l'éventuelle apparition

d'espèces paramagnétiques est réalisé alors pendant 30 minutes. Dans ce cas, aucun signal n'est détecté. La même expérience réalisée sur un temps plus long (6 h 30), montre l'apparition d'un signal d'intensité très peu intense.

Ainsi, pour éviter tout problème, il a été décidé que le substrat serait préparé et utilisé extemporanément.

III.1.1.2.2 Cinétique d'apparition des adduits

Une cinétique d'apparition des adduits radicalaires par piégeage des radicaux générés par la lipoxigénase de soja à pH 9 en présence d'acide linoléique (1 mM) et de POBN (50 mM) est montrée sur la Figure 20 (MKHININI, 2010).

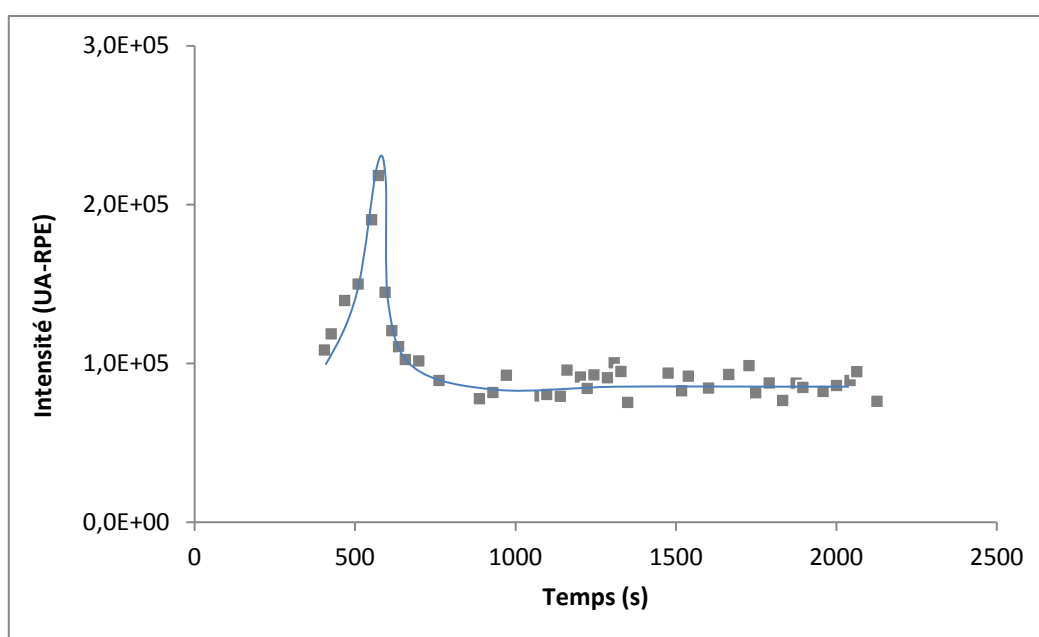


Figure 20 : Evolution des espèces paramagnétiques après 5 min d'agitation.
(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; POBN 50 mM ; 0,5 nkat de LOX soja.)

Cette évolution du signal RPE, typique de la réaction de la lipoxigénase de soja en présence de POBN, peut se découper en trois phases :

- une première phase où l'intensité du signal augmente : accroissement des formes d'adduits radicalaires
- une deuxième phase où l'intensité du signal diminue : diminution des formes d'adduits radicalaires
- une troisième phase où l'intensité du signal n'évolue pas : stabilisation des formes d'adduits radicalaires.

Entre la première et la deuxième phase, l'intensité du signal atteint un maximum qui est d'autant plus élevé que la quantité d'hydroperoxydes est élevée (RABII, 2011).

La phase qui correspond à la diminution de l'intensité du signal souligne la formation d'espèces silencieuses. En effet, en 2012, ROMAN *et al.* ont montré qu'en présence d'hydroperoxydes dans un système contenant une huile végétale et un piègeur de spin, sous l'action d'un traitement thermique, une baisse remarquable du signal RPE (et donc de la quantité d'adduits) est observée. Ceci a été expliqué par le fait que les radicaux alkoxy ($\text{LO}^\bullet$) produits par la scission des hydroperoxydes réagissent via des réactions radicalaires avec les adduits ($\text{NO}^\bullet$) pour former des espèces non paramagnétiques. Cela a été confirmé par les travaux de MKHININI *et al.* (2010) : la scission des hydroperoxydes produits par la lipoxygénase en présence d'acide linoléique et d'oxygène conduit à la formation d'acides oxodienoïques, de pentane, de dimères d'acide linoléique en faisant intervenir des radicaux alkoxy $\text{LO}^\bullet$. Le complexe qui se forme entre l'adduit de spin et le radical alkoxy $\text{LO}^\bullet$ perd ses propriétés paramagnétiques et le signal décroît. Pendant cette période, il est possible qu'il se forme encore des adduits de spin, mais en plus faibles quantités que les complexes adduit-radical alkoxy d'où la diminution de l'intensité du signal.

La réaction de piégeage par le POBN peut alors être comparée à des réactions de propagation et de terminaison, ces deux réactions ayant des vitesses égales durant la troisième phase.

RABII *et al.* (2011) ont mis en place les conditions opératoires optimales (quantité d'enzyme, quantité de substrat, et disponibilité en oxygène) pour obtenir une intensité de signal RPE la plus élevée possible pour des fins analytiques.

III.1.1.2.3 Effet de la quantité de lipoxygénase sur la production des adduits

Nous avons repris ces conditions opératoires, 1 mM d'acide linoléique, 50 mM de POBN (QIAN *et al.*, 2003), en agitant le milieu pendant un temps donné, ce qui augmente l'apport d'oxygène et permet à la lipoxygénase de produire une grande quantité d'hydroperoxydes. Lorsque la quantité d'enzyme ajoutée à 0,5 mL de milieu réactionnel est augmentée de 0,5 nkat à 1 nkat puis 4 à nkat, l'évolution de l'intensité du signal RPE est modifiée (Figure 21).

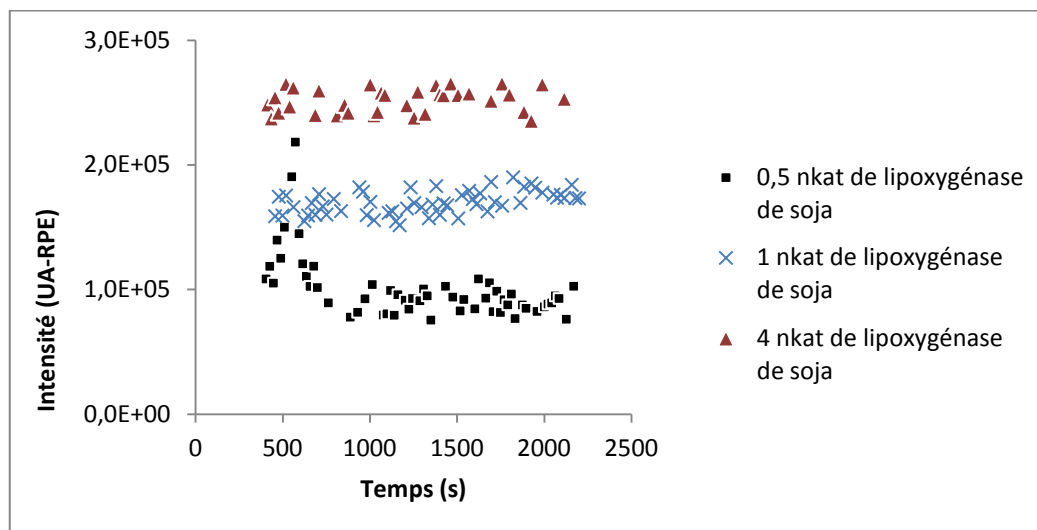


Figure 21 : Influence de la quantité de LOX ajoutée sur l'évolution des espèces paramagnétiques issues de la réaction d'oxydation après 5 min. d'agitation. (0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; POBN 50 mM. Le temps 0 correspond à l'introduction de l'enzyme dans le milieu réactionnel, avant agitation.)

Avec 0,5 nkat de lipoxigénase de soja, la cinétique d'apparition d'adduits radicalaires (Figure 21) présente les trois phases décrites précédemment. Par contre, avec 1 et 4 nkat d'enzyme, ce phénomène n'est plus observé et l'intensité du signal reste stable dans le temps. Il est vraisemblable qu'avec de fortes activités enzymatiques l'état d'équilibre est plus rapidement atteint. Cela est en accord avec les résultats de RABII (2011) qui avait montré que le temps nécessaire pour atteindre le maximum d'intensité diminue avec la quantité d'enzyme ajoutée.

La Figure 21 montre également que l'intensité du signal à l'équilibre est d'autant plus élevée que l'activité de la lipoxigénase est élevée. Cependant, ces résultats ne nous apportent pas d'information quant à la phase d'apparition des adduits radicalaires ni quant à leur nature au cours des 3 étapes.

III.1.1.2.4 Effet de la durée de la phase aérobie sur la production des adduits

L'influence du temps d'agitation sur la réponse du signal RPE a été étudiée en fixant la quantité de lipoxigénase de soja à 4 nkat (Figure 22).

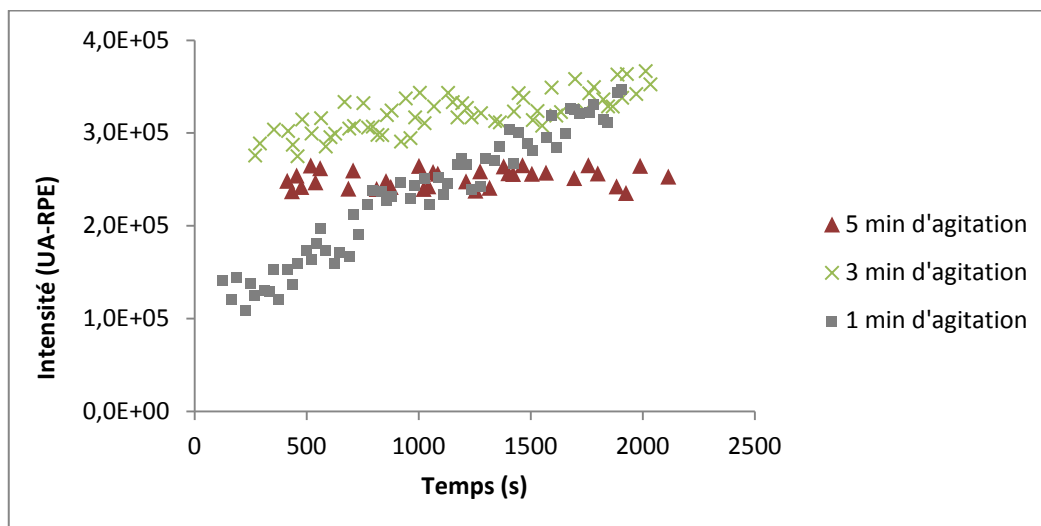


Figure 22 : Influence du temps d'agitation sur l'évolution des espèces paramagnétiques issues de la réaction d'oxydation.

(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; POBN 50 mM ; 4 nkat de LOX soja. Le temps 0 correspond à l'introduction de l'enzyme dans le milieu réactionnel, avant agitation.)

Les résultats présentés Figure 22 montrent que lorsque le milieu réactionnel est agité pendant 1 minute, l'intensité du signal RPE mesurée augmente au cours du temps pour atteindre une valeur de $3 \cdot 10^5$ UA après 30 minutes. En revanche après 3 minutes d'agitation, l'intensité du signal augmente de $3 \cdot 10^5$ UA à $3,2 \cdot 10^5$ UA pendant les 30 minutes d'enregistrement alors qu'après 5 minutes d'agitation, l'intensité du signal reste constante pendant 30 minutes à une valeur proche de $2,6 \cdot 10^5$ UA.

Des expériences réalisées dans les mêmes conditions que pour la RPE en suivant la consommation d'oxygène au cours du temps mais dans un volume réactionnel de 1 mL (donc avec 8 nkat d'enzyme) permettent de calculer la quantité théorique d'hydroperoxydes formés pendant l'agitation (en supposant que la vitesse de formation des hydroperoxydes est constante pendant l'agitation).

Le Tableau IV récapitule les quantités théoriques maximales d'hydroperoxydes formés au cours du temps. Notons ici que la quantité d'hydroperoxydes formés ne peut dépasser la quantité initiale d'acide linoléique, soit 1000 nmol formées au maximum. Par ailleurs, ces quantités sont probablement surestimées puisque le calcul suppose que la vitesse de consommation d'oxygène (donc de production d'hydroperoxydes) ne varie pas même lorsque la quantité d'oxygène disponible diminue.

Tableau IV : Calculs théoriques de formation des hydroperoxydes.

(Pendant l'agitation, il est supposé que l'oxygène reste constant à 225 nmol dans 1 mL et après l'agitation, la quantité de LOOH formés est égale à la consommation d'O₂ pendant cette période. La quantité de LH restant après agitation est égale à la quantité initiale (1000 nmol) – la quantité de LOOH formés. L'activité enzymatique ajoutée est de 8 nkat.)

Durée de l'agitation (s)	60	180	300
Quantité d'hydroperoxydes formés pendant l'agitation (nmol)	480	1440 (1000 au maximum)	2400 (1000 au maximum)
Quantité d'acide linoléique restant après agitation (nmol)	520	0	0
Consommation d'oxygène mesurée après agitation	40 % soit 90 nmol	20 % soit 45 nmol	20 % soit 45 nmol
Quantité d'hydroperoxydes formés après agitation (nmol)	90	45	45
Quantité totale d'hydroperoxydes formés (nmol)	570	1485 (1000 au maximum)	2445 (1000 au maximum)

Le Tableau IV permet pour partie d'expliquer les résultats obtenus en RPE quant à l'influence du temps d'agitation sur la formation d'adduits radicalaires :

➤ Après 1 minute d'agitation, 40 % d'oxygène sont rapidement consommés, période pendant laquelle il se forme environ 16 % des hydroperoxydes totaux : il semble alors normal que la quantité d'adduits formés continue à évoluer dans le temps.

➤ Après 3 et 5 minutes d'agitation, 20 % d'oxygène sont lentement consommés, période pendant laquelle il se forme environ 5 % des hydroperoxydes totaux : il semble alors normal que la quantité d'adduits formés pendant ce temps reste quasi stable.

Les adduits radicalaires générés semblent directement liés à la quantité d'hydroperoxydes présents dans le milieu.

Bien que réalisée dans des conditions de concentrations en POBN totalement différentes (le POBN est mille fois plus concentré), la technique de suivi des radicaux par RPE confirme les résultats obtenus précédemment par spectrophotométrie UV : la réaction du POBN avec les radicaux lipidiques se produit essentiellement pendant la phase anaérobie. Ceci nous a conduit à étudier les réactions entre acide linoléique et hydroperoxyde catalysées par la lipoxygénase de soja en présence de POBN et en absence d'oxygène (en phase anaérobie).

III.1.2 REACTIVITE DES RADICAUX GENERES EN PHASE ANAEROBIE

Dans ce type de réaction, l'oxygène est initialement limitant, le milieu réactionnel est désaéré avant ajout de la lipoxigénase. Il faut donc soit produire au préalable des hydroperoxydes en aérobie, soit ajouter des hydroperoxydes avant l'apport d'enzyme.

III.1.2.1 Etudes par spectroscopie UV

Pour des raisons pratiques, les réactions sont débutées en présence d'air afin de produire des hydroperoxydes puis le milieu est placé en anaérobiose.

III.1.2.1.1. Effet de la durée de la phase aérobie sur la consommation du POBN

Dans une première série d'expérimentations en présence de POBN (0,25 mM) et d'acide linoléique (2 mM), les hydroperoxydes sont produits enzymatiquement (10 nkat de lipoxigénase de soja ajoutés dans un volume total de 2,5 mL de tampon borate à pH 9) dans un milieu concentré fortement agité pour maintenir une quantité d'oxygène suffisante. Les durées d'agitation (phase aérobie) ont été fixées à 2, 3, 4 et 6 minutes pour générer des quantités variables d'hydroperoxydes. A la fin de la phase aérobie, 0,5 mL du milieu concentré sont prélevés et ajoutés à 2 mL de tampon borate (préalablement désoxygéné par un barbotage d'azote). Après mélange le milieu dilué est immédiatement placé dans la cuve du spectrophotomètre et un spectre (entre 190 et 500 nm) est réalisé toutes les 10 secondes pendant 10 minutes. Les évolutions de l'absorbance à 285 et 330 nm pendant les 10 minutes de phase anaérobiose sont données dans la Figure 23.

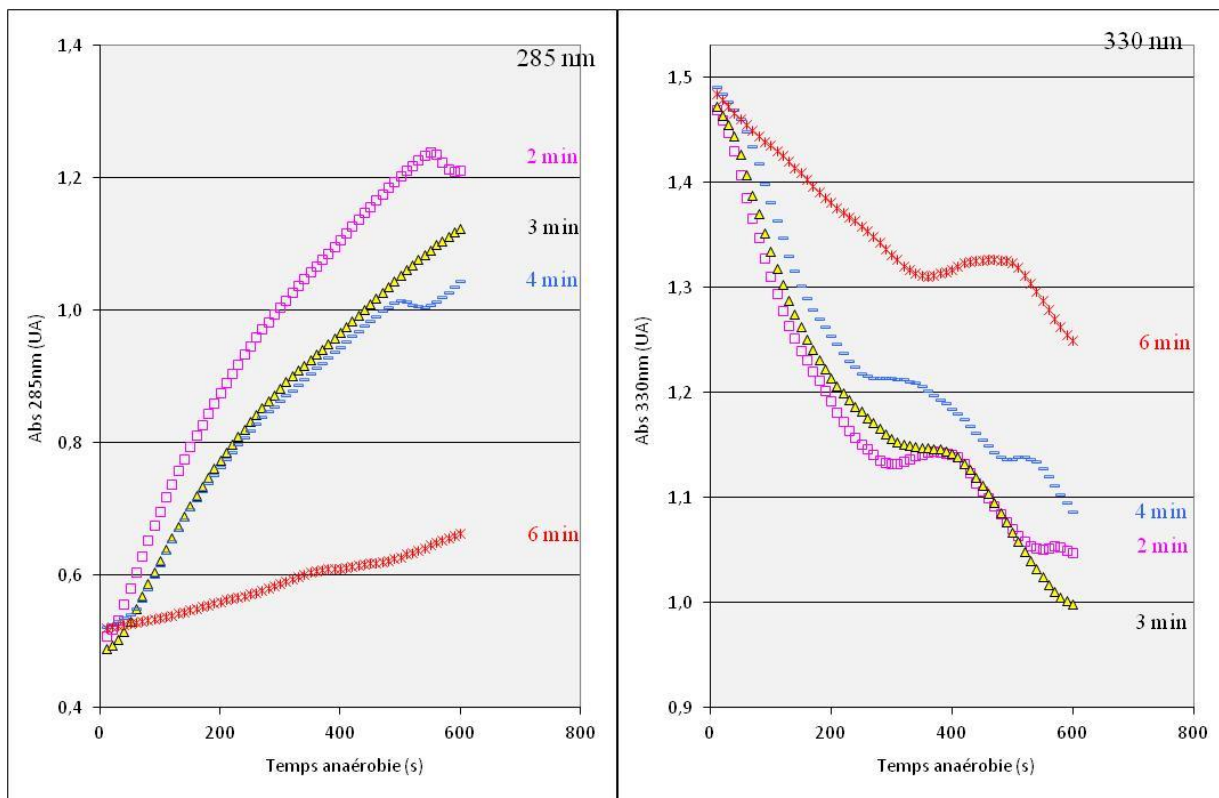


Figure 23 : Evolution des absorbances à 285 nm et 330 nm lors de la réaction anaérobie en milieu dilué.

(Milieu concentré : 2,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 2 mM ; POBN 0,25 mM ; 10 nkat LOX soja. Réaction aérobie en milieu concentré (entre 2 et 6 min.) avant réaction anaérobie en milieu dilué.)

Pendant la phase anaérobie, les augmentations à 285 nm et les diminutions à 330 nm les plus importantes sont observées après 2 et 3 minutes de réaction aérobie. Pour des durées plus longues d'aérobiose, les évolutions sont moins marquées surtout après 6 minutes. Deux explications sont possibles :

- au-delà de 3 minutes, la teneur en acide linoléique résiduel serait trop faible et celle en hydroperoxydes trop forte pour que la réaction anaérobie soit maximale (rapport défavorable des concentrations des deux substrats)
- au-delà de 3 minutes, la perte de l'activité de la lipoxygénase pendant la phase aérobie deviendrait trop importante ce qui ralentirait la réaction anaérobie.

Cependant, nous pouvons conclure que la durée de la phase aérobie a un effet notable sur l'évolution de l'absorbance à 330 nm pendant la phase anaérobie. L'effet est maximal après 3 minutes de réaction aérobie ce qui va dans le sens d'un ratio optimal acide linoléique / hydroperoxydes pour amorcer la phase anaérobie.

Une seconde série d'expérimentations a été réalisée dans des conditions identiques mais en doublant la concentration initiale en acide linoléique (4 mM). Les évolutions de

l'absorbance à 285 et 330 nm pendant les 10 minutes de phase anaérobie sont données dans la Figure 24.

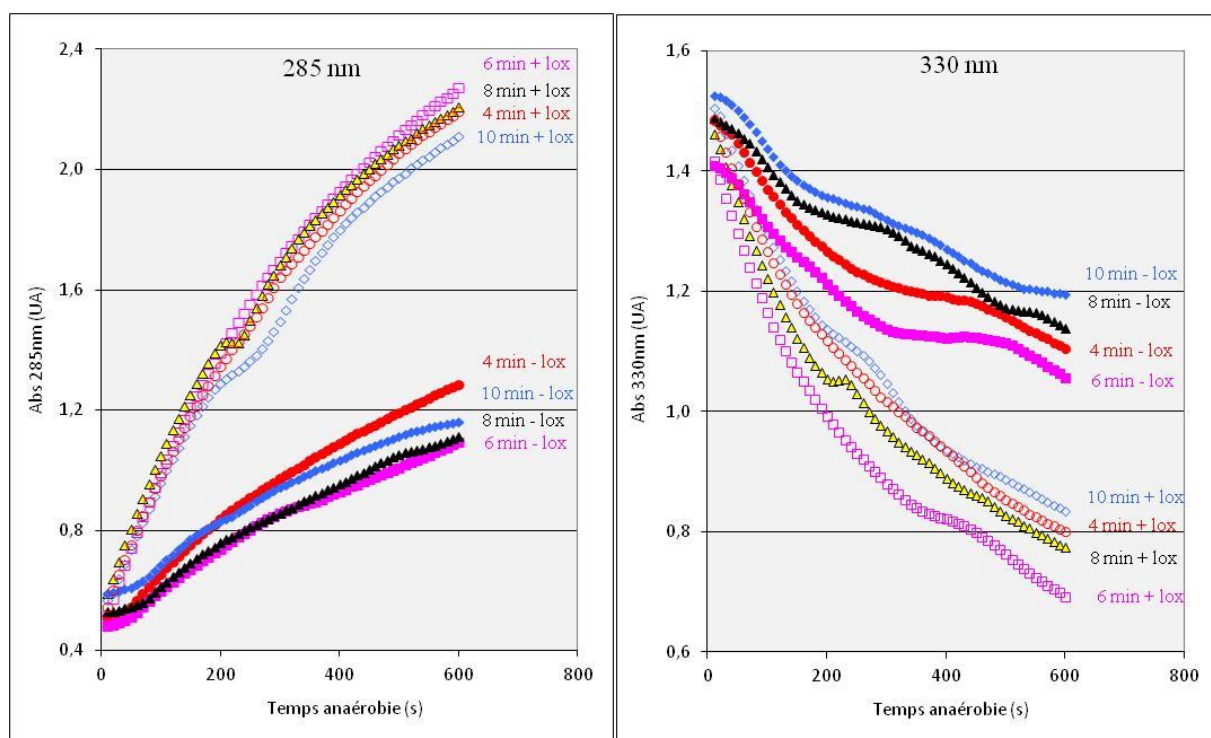


Figure 24 : Evolution des absorbances à 285 nm et 330 nm lors de la réaction anaérobie en milieu dilué.

(Milieu concentré : 2,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 4 mM ; POBN 0,25 mM ; 10 nkat LOX soja. Réaction aérobie en milieu concentré (entre 4 et 10 min.) avant réaction anaérobie en milieu dilué. Au début de la réaction anaérobie, ajout de 4 nkat de LOX (+ lox) ou non (- lox).)

Dans ces conditions, la durée optimale de la réaction aérobie, déterminée par la vitesse maximale de la diminution d'absorbance à 330 nm, est comprise entre 4 et 6 minutes.

Il est évident que par rapport aux conditions précédentes (2 mM en acide linoléique), la durée de la réaction aérobie, pour avoir un rapport favorable des concentrations acide linoléique / hydroperoxyde, est plus longue, ce qui explique le résultat obtenu.

Cependant, l'examen de la vitesse maximale de diminution de l'absorbance à 330 nm montre qu'elle est nettement plus faible que celle observée précédemment. Ceci pourrait s'expliquer par une perte plus importante de l'activité lipoxygénasique pour des durées plus longues de réaction aérobie.

L'ajout d'enzyme fraîche (4 nkat) après la phase aérobie dans le milieu dilué au début de la phase anaérobie fait apparaître une augmentation nette de la vitesse de diminution de l'absorbance à 330 nm (et de l'augmentation de l'absorbance à 285 nm). Ce résultat montre bien que l'activité résiduelle de la lipoxygénase de soja après la phase aérobie est limitante

dans le développement de la réaction anaérobie et que l'ajout d'enzyme fraîche au début de la phase anaérobie permet une consommation plus rapide et plus importante de POBN.

III.1.2.1.2. Dégradation de l'activité enzymatique pendant la phase aérobie

Afin de mettre en évidence et quantifier la perte de l'activité enzymatique pendant la phase aérobie en milieu concentré, le milieu réactionnel dilué a été supplémenté avec des quantités croissantes de lipoxygénase au début de la phase anaérobie. La réaction est réalisée en l'absence de POBN, avec 4 mM d'acide linoléique et 10 nkat d'enzyme pour un volume de 2,5 mL, pendant 6 minutes. La réaction anaérobie est alors suivie, en milieu dilué (au 1/5), après ajout de 0 à 4 nkat de lipoxygénase de soja en enregistrant l'évolution de l'absorbance à 285 nm (Figure 25).

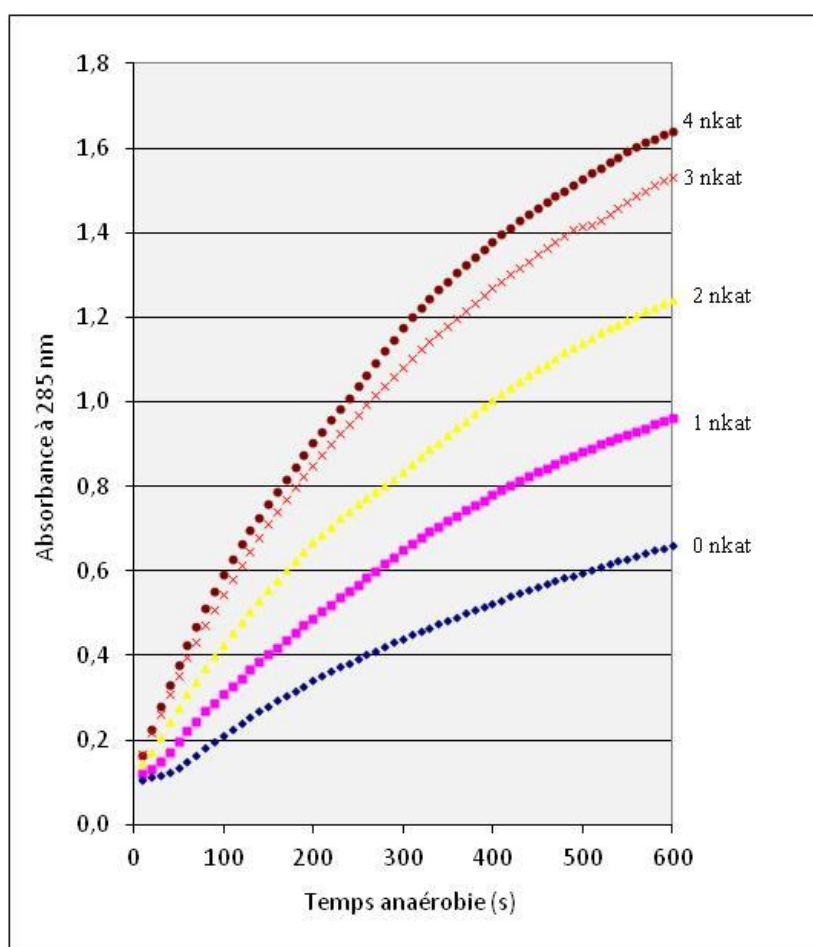


Figure 25 : Evolution de l'absorbance à 285 nm pendant la phase anaérobie en fonction de la quantité de LOX soja ajoutée.
(0 à 4 nkat de LOX soja ajoutée dans un volume de 2,5 mL.)

Il apparaît que pendant la phase anaérobie, l'absorbance à 285 nm augmente d'autant plus rapidement que la quantité d'enzyme ajoutée au début de cette phase augmente ce qui confirme que la vitesse de la réaction anaérobie dépend de la quantité de lipoxygénase en accord avec les résultats de GARSSSEN *et al.* (1971).

Lorsque la pente maximale (vitesse) de l'augmentation de l'absorbance à 285 nm est portée en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée, une droite est obtenue (Figure 26) confirmant que la vitesse de formation des produits qui absorbent à 285 nm est proportionnelle à la quantité d'enzyme. Par ailleurs en extrapolant cette droite sur l'axe des abscisses (à vitesse nulle), il est possible de déterminer l'activité lipoxygénasique résiduelle à la fin de la phase aérobie. Cette valeur est égale à 1,34 nkat. Etant donné que 10 nkat d'enzyme ont été initialement ajoutés à 2,5 mL de milieu réactionnel (pour débiter la réaction aérobie), le prélèvement de 0,5 mL (utilisé pour la dilution) en contenait 2 nkat. Il en résulte que : $2 - 1,34 = 0,66$ nkat d'enzyme ont été dénaturés pendant la phase aérobie, soit près de 1/3.

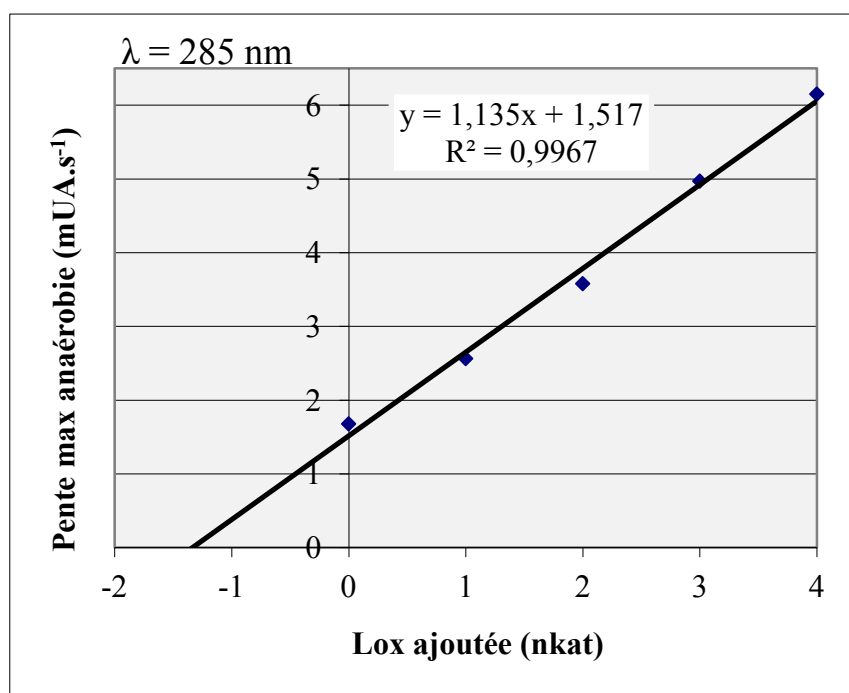


Figure 26 : Influence de la quantité de LOX soja ajoutée (entre 0 et 4 nkat) sur la vitesse maximale d'augmentation de l'absorbance à 285 nm pendant la réaction anaérobie.

III.1.2.1.3. Effet de la teneur en POBN

Dans une troisième série d'essais, la concentration initiale en POBN dans le milieu concentré (phase aérobie) a été doublée (0,5 mM) puis quadruplée (1 mM) afin de déterminer s'il était possible de dégrader de plus grandes quantités de POBN. Dans ces nouvelles conditions, l'absorbance finale à 330 nm après les 10 minutes de phase anaérobie en milieu dilué (10 fois pour 0,5 mM en POBN et 20 fois pour 1 mM en POBN) était comprise en 0,65 et 0,7 soit une valeur voisine de celle observée lorsque le milieu concentré (phase aérobie) contenait 0,25 mM en POBN. Il apparaît que la quantité de POBN dégradée (c'est-à-dire ayant piégé un radical) n'est pas modifiée par la concentration initiale en POBN présent dans la phase aérobie (au moins jusqu'à 1 mM).

III.1.2.1.4. Effet de la dilution du milieu

Dans une dernière série d'expérimentations, nous avons cherché à vérifier si des réactions aérobie et anaérobie effectuées en milieu concentré donnaient des résultats similaires à une réaction aérobie effectuée en milieu concentré suivie d'une réaction anaérobie en milieu dilué (ce qui a toujours été effectué précédemment). Pour ce faire, les réactions en aérobie puis en anaérobie sont effectuées en milieu concentré puis une dilution est effectuée juste avant de suivre l'évolution des absorbances au spectrophotomètre. Les résultats obtenus montrent que les quantités de POBN dégradé dans ces conditions sont beaucoup plus faibles que celles observées en milieu dilué (Figure 27). De plus, l'ajout de 4 ou 20 nkat de lipoxygénase fraîche dès le début de la réaction anaérobie en milieu concentré (après 4 minutes de réaction aérobie), ne modifie pas sensiblement les quantités de POBN dégradé qui restent toujours très faibles et quasiment pas différentes après 15 minutes de réaction en milieu concentré (4 minutes en milieu aérobie et 11 minutes en milieu anaérobie).

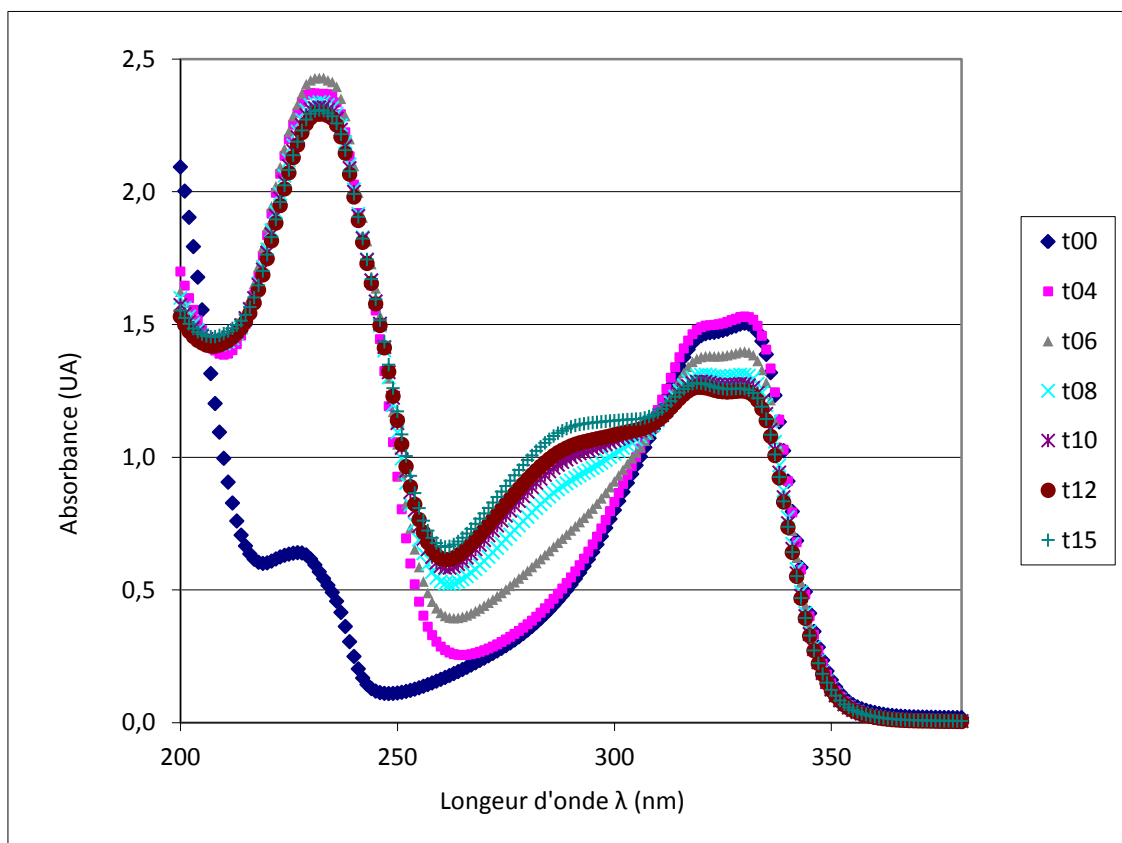


Figure 27 : Spectres UV du milieu réactionnel après X min. de réaction en milieu concentré. (Les 4 premières min. sont en aérobiose et les suivantes sont en anaérobiose. Réaction aérobie initiée par : 10 nkat de LOX soja dans 2,5 mL de tampon borate pH 9 ; 4 mM de LH ; 1 mM de POBN. Spectre enregistré après dilution au 20^{ème}. Après 4 min. de réaction, 20 nkat d'enzyme fraîche sont ajoutés (en anaérobiose).)

Les spectres t00 minute et t04 minutes ne diffèrent que par leur absorbance à 234 nm : cette période correspond à l'aérobiose avec la formation de diènes conjugués

(hydroperoxydes). Au-delà de 4 minutes de réaction, lorsque le milieu est appauvri en oxygène, l'absorbance à 285 nm augmente alors que celle à 330 nm diminue. Cependant, comparées aux résultats précédents (réaction anaérobie en milieu dilué) où les diminutions de l'absorbance à 300 nm étaient proches de 0,8 UA, les évolutions en milieu concentré à cette même longueur d'onde ne dépassent pas 0,3 UA (Figure 27).

Ainsi, le milieu concentré, pour la réaction anaérobie, est défavorable à la réaction de consommation du POBN pour une raison qui reste inexpiquée.

A l'issue de ces travaux, la spectrophotométrie UV apparaît comme une méthode simple et utile pour suivre en continu les réactions entre le POBN et les radicaux lipidiques. Cependant, elle est limitée par les propriétés spectrales des produits qui apparaissent et disparaissent, notamment pour le POBN pour lequel la limite de concentration utilisable ne peut être supérieure à 60 – 70 μM , concentration très inférieure à celle utilisée dans les expérimentations en RPE (50 mM).

De plus, il n'est pas possible de calculer les teneurs en hydroperoxydes formés et en acide linoléique résiduel compte tenu des absorbances obtenues.

III.1.2.2. Etude par spectroscopie de RPE

Le suivi des adduits radicalaires générés en phase anaérobie a été réalisé en présence d'acide linoléique et de 13-hydroperoxyde de synthèse, dans un milieu débarrassé d'oxygène et conservé sous argon.

Pour ces essais, une activité enzymatique de 0,2 nkat est choisie pour pouvoir accéder à la phase initiale. La quantité d'hydroperoxydes est choisie arbitrairement dans un premier temps. Une première expérimentation a été réalisée avec 0,15 mM d'hydroperoxyde et 1 mM d'acide linoléique en présence de POBN (50 mM) au cours de laquelle l'évolution du signal RPE a été enregistrée pendant plus de 30 minutes (Figure 28).

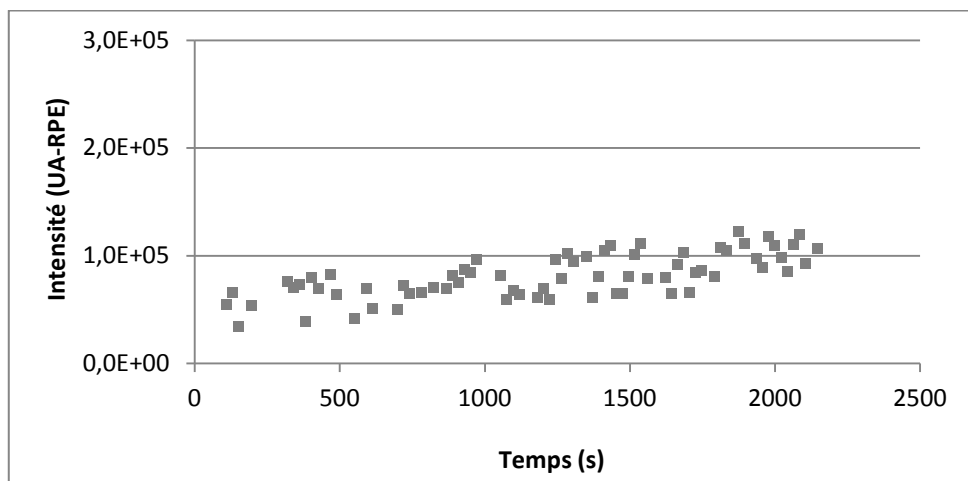


Figure 28 : Evolution des espèces paramagnétiques issues de la réaction anaérobie catalysée par la LOX soja.

(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; 13-LOOH 0,15 mM ; POBN 50 mM ; 0,2 nkat LOX soja.)

Dans ces conditions, une augmentation de l'intensité du signal extrêmement lente est observée et une intensité maximale de 1.10^5 UA est atteinte après 30 minutes de réaction.

Dans une seconde expérimentation, l'évolution de l'intensité du signal RPE a été enregistrée sur un temps nettement plus long (11 heures), avec la même activité enzymatique (0,2 nkat de lipoxygénase de soja dans 0,5 mL) mais en présence d'une quantité plus élevée de 13-hydroperoxyde (0,25 mM) puisque nous avons observé que la quantité d'adduits maximale dépendait de la quantité d'hydroperoxydes (Figure 29).

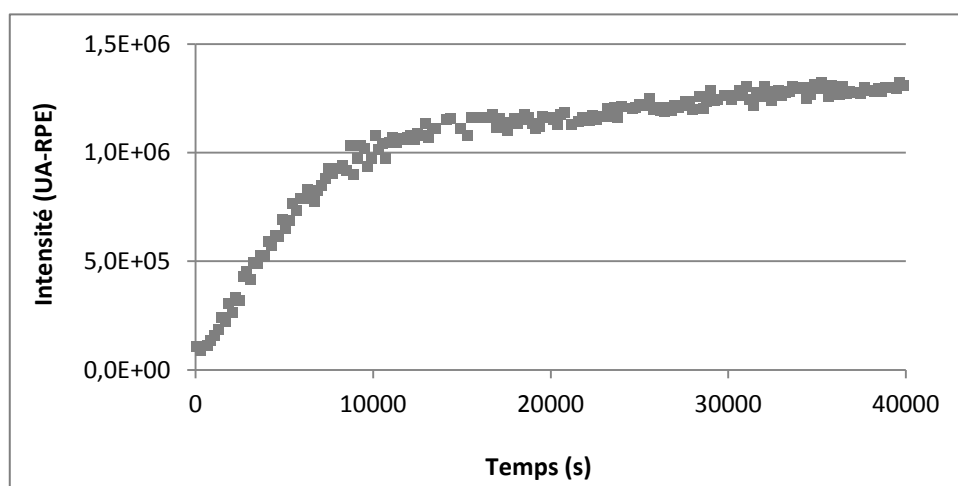


Figure 29 : Evolution des espèces paramagnétiques issues de la réaction anaérobie catalysée par la LOX soja.

(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; 13-LOOH 0,25 mM ; POBN 50 mM ; 0,2 nkat LOX soja.)

Dans ces nouvelles conditions, une évolution lente de l'intensité du signal est à nouveau observée mais la valeur atteinte après 2 h 30 de réaction est voisine de $1 \cdot 10^6$ UA pour tendre vers un palier proche de $1,3 \cdot 10^6$ UA après 11 h de réaction.

Il aurait sûrement été intéressant de faire varier les concentrations en acide linoléique et en hydroperoxydes, et également de modifier la quantité d'enzyme apportée pour moduler l'évolution du signal. Cependant, le POBN est très peu réactif, la formation d'adduits radicalaires est lente et n'est donc pas adaptée à nos objectifs, à savoir l'étude du suivi cinétique de la réactivité radicalaire.

Bilan :

Les suivis de la réaction d'oxydation enzymatique de l'acide linoléique, par UV et par RPE, montrent que la formation d'adduits s'effectue essentiellement en anaérobiose.

Mais la quantité de POBN à utiliser pour suivre la réaction est très différente selon les techniques utilisées, sa concentration est 1000 fois plus forte en RPE qu'en UV, ce qui pose des problèmes pour l'analyse des adduits par LC-DAD et LC-MS, analyse essentielle pour établir des cinétiques réactionnelles pour les différents radicaux lipidiques.

En outre, en UV, il est possible d'avoir une consommation quasi totale en POBN (50 μ M) si celle-ci est estimée à partir de la diminution de l'absorbance à 330 nm, ce qui signifie que la quantité maximale d'adduits est de 50 μ M. En RPE, lorsque la concentration en POBN utilisée est de 50 mM, seuls 20 μ M d'adduits ont pu être détectés (RABII, 2011). Les quantités d'adduits estimées par les deux méthodes sont donc significativement différentes. Il est probable que la diminution de l'absorbance à 330 nm observée en spectrophotométrie UV ne reflète pas uniquement des espèces radicalaires mais également des espèces non radicalaires issues de réactions de terminaison avec les adduits radicalaires de POBN et d'autres radicaux libres lipidiques issus de la réaction anaérobie catalysée par la lipoxigénase de soja.

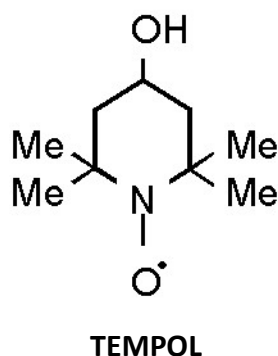
Il ressort de ces observations que le POBN a une réactivité assez complexe. Le bilan de piégeage est très mauvais (QIAN *et al.*, 2005 ; YU *et al.*, 2008 ; ROMAN *et al.*, 2012) ce qui est incompatible avec des mesures cinétiques qui constituent l'objet de notre étude.

Le système doit donc être modifié :

- en changeant de piègeur afin d'augmenter la réactivité vis-à-vis des radicaux lipidiques générés en absence d'oxygène
- en limitant le nombre initial d'espèces radicalaires issues de l'oxydation des lipides (en absence d'oxygène) ce qui nécessite de commencer notre étude par des analyses en anaérobiose.

➤ en suivant uniquement des réactions de terminaison. En effet, le POBN mime des réactions de propagation puis de terminaison ce qui provoque une augmentation de l'intensité du signal RPE puis une diminution. Il serait plus simple que le piègeur n'effectue que des réactions de terminaison. Ce composé doit donc être un radical stable qui piège des radicaux libres pour former des espèces non radicalaires (« *spin scavenger* »).

Le nouveau piègeur choisi est alors le 4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl (TEMPOL) qui, par sa fonction aminoxyle, est une molécule radicalaire assez stable.



III.2. EXPERIMENTATIONS AVEC LE TEMPOL (SPIN SCAVENGING)

III.2.1. PROPRIETES DU TEMPOL

Sa première propriété indispensable pour notre système est sa solubilité dans l'eau. Cette molécule a, de plus, l'avantage d'être plus réactive que le POBN (WRIGHT *et al.*, 2003) et pourra donc être utilisée à des concentrations nettement plus faibles.

En outre, le TEMPOL n'affecte pas l'activité enzymatique en aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9 : en effet, la mesure de l'activité lipoxygénasique, par polarographie, ne montre pas de différences significatives lors de mesures réalisées avec ou sans TEMPOL (pour des concentrations allant jusque 0,3 mM).

En solution dans le tampon borate à pH 9, le TEMPOL absorbe dans l'UV avec un maximum à 242 nm (Figure 30).

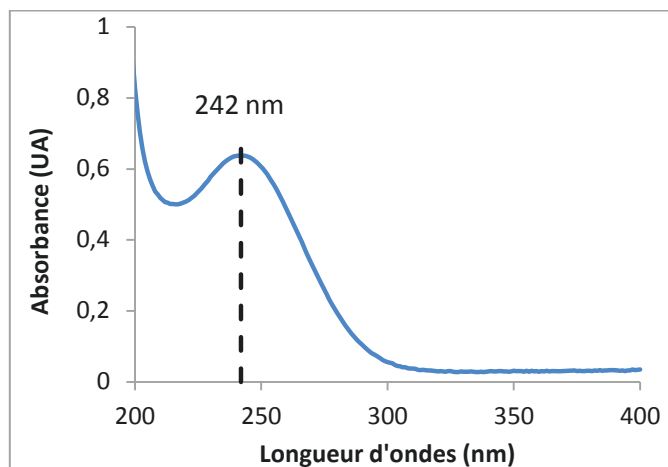
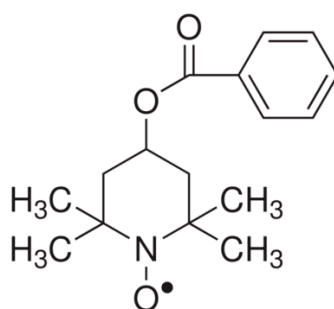


Figure 30 : Spectre du TEMPOL (0,3 mM) en tampon borate pH 9.

Le coefficient d'extinction moléculaire du TEMPOL à 242 nm est égal à $2100 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, près de 8 fois inférieur à celui du POBN à 330 nm ($16000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et plus de 10 fois inférieur à celui des hydroperoxydes à 234 nm (25000 à $28000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Ceci implique que lorsque la détection est réalisée vers 234-240 nm en HPLC / DAD, les pics contenant du TEMPOL ou ses dérivés auront une surface près de 10 fois inférieure à celle des pics contenant à concentration égale les hydroperoxydes ou leurs dérivés possédant encore le système de doubles liaisons conjuguées.

Cette molécule, bien adaptée à nos besoins, a donc le désavantage d'absorber faiblement en UV. Pour résoudre cette difficulté, l'utilisation d'une autre molécule a été envisagée, le 4-hydroxy-TEMPO benzoate ou benzoate de TEMPO. Il s'agit d'une molécule de TEMPOL sur laquelle a été greffé un acide benzoïque, ce qui confère à la molécule une plus forte absorption dans l'UV.



Benzoate de TEMPO

Cependant, le benzoate de TEMPO présente deux inconvénients majeurs. Relativement peu soluble en phase aqueuse, il est nécessaire de le solubiliser préalablement dans de l'éthanol. Par ailleurs, il entraîne une diminution significative de l'activité de la lipoxygénase de soja et ce, même à faible concentration (0,03 mM). Quelques essais ont tout de même été

tentés en RPE mais là aussi des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés ce qui a conduit à l'abandon de ce piègeur. En conséquence, les travaux ont été poursuivis avec le TEMPOL.

Cette molécule, qui est un radical libre stable, piège les radicaux libres lipidiques via des réactions de terminaison qui vont provoquer une diminution de l'intensité du signal observé en RPE.

Dans un premier temps, une courbe d'étalonnage du TEMPOL dans du tampon borate pH 9 a été établie (Figure 31).

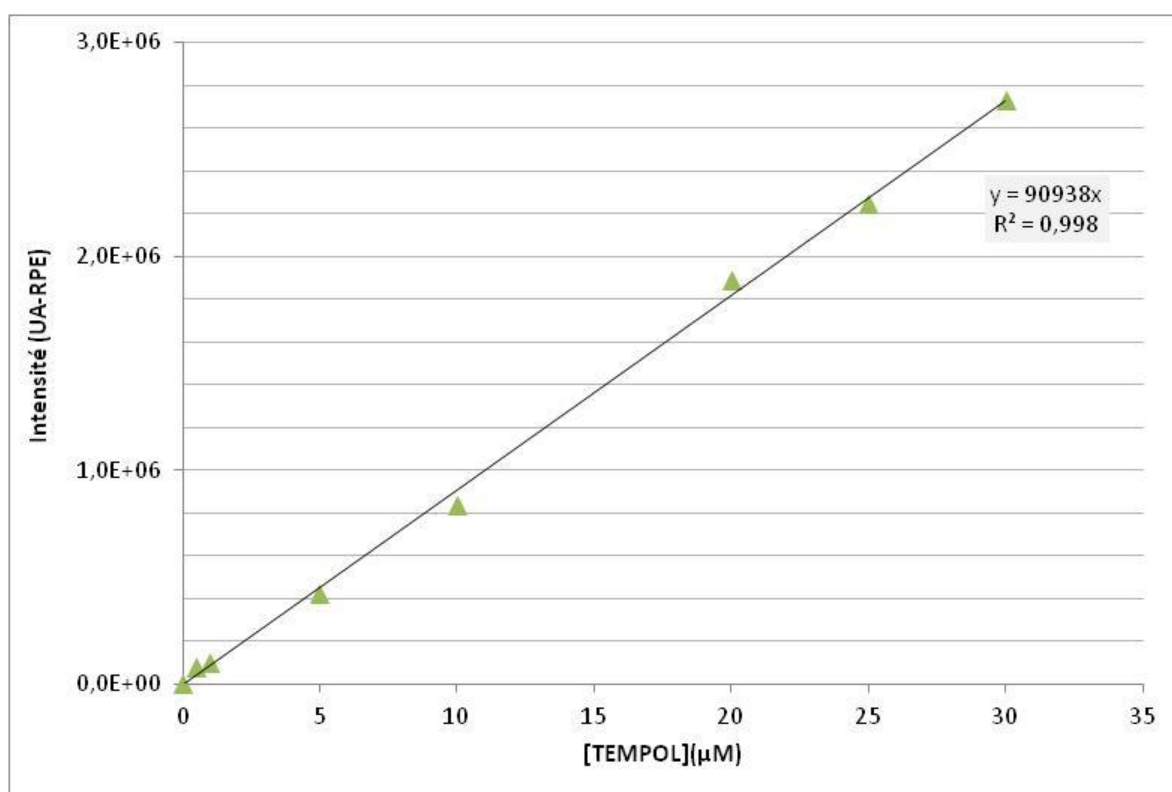


Figure 31: Courbe d'étalonnage du TEMPOL dans du tampon borate pH 9. Gain $G = 5 \cdot 10^4$.

Cette courbe permet de convertir les intensités spectrales, qui sont des unités arbitraires, en unités de concentrations et ainsi de quantifier les molécules de TEMPOL encore radicalaires (c'est-à-dire, n'ayant rien piégé). Entre 0 et 30 μM , la courbe $I = f([TEMPOL])$ est linéaire. Ce résultat confirme celui obtenu par RABII (2011). Dans les conditions opératoires suivies, la limite de détection du TEMPOL est de 1 μM . En raison de la linéarité de réponse observée jusqu'à 30 μM , il a été décidé de conduire la majeure partie de nos expérimentations avec une concentration initiale en TEMPOL égale à 30 μM .

III.2.2. REACTION ANAEROBIE

Comme proposé précédemment, pour simplifier le système, il paraissait intéressant de commencer par des analyses en anaérobiose ce qui permet d'une part de limiter le nombre de radicaux libres lipidiques différents (au moins dans la phase initiale) et d'autre part d'empêcher la réaction de ces derniers avec l'oxygène, molécule en compétition avec le TEMPOL.

Pour fonctionner en anaérobiose, la lipoxigénase utilise deux substrats, l'hydroperoxyde comme composé oxydant (en remplacement de l'oxygène dans la réaction aérobie) et l'acide linoléique comme composé réducteur (sans changement dans la réaction aérobie).

Tout d'abord, il a été vérifié que le signal du TEMPOL dilué dans du tampon borate pH 9 était stable au cours du temps. Pour cela, la concentration en TEMPOL dans la cellule de la RPE a été fixée à 10 μM ce qui correspond à une intensité de signal proche de 1.106 UA. Dans ces conditions, le signal RPE enregistré pendant 60 minutes, reste stable.

Des conditions expérimentales de « routine » ont été mises en place pour suivre le signal RPE de façon précise et répétable. Ainsi que nous l'avons vu précédemment, la concentration initiale de 30 μM en TEMPOL permet de quantifier facilement la consommation de ce piègeur puisque l'intensité du signal est proportionnelle à sa concentration. De la même façon, les concentrations initiales en acide linoléique et en hydroperoxyde ainsi que la quantité de lipoxigénase de soja ont été fixées de manière à obtenir des évolutions notables du signal, ni trop lentes, ni trop rapides, pour des durées d'enregistrement variant entre 5 et 20 minutes. Un bon compromis correspond aux valeurs suivantes : 1 mM pour l'acide linoléique, 0,15 mM pour le 13-hydroperoxyde et 0,12 nkat pour la lipoxigénase de soja (dans un volume total de 0,5 mL). Dans ces conditions, les 30 μM (soit 15 nmol dans 0,5 mL) de TEMPOL sont consommés en moins de 10 minutes et le coefficient de variation de la mesure de la vitesse maximale est inférieur à 5 %.

III.2.2.1. Lipoxigénase de soja à pH 9

III.2.2.1.1. Effet de la quantité d'enzyme sur la vitesse de la réaction

Dans un premier temps, l'influence de la quantité de lipoxigénase de soja sur la vitesse de la réaction anaérobiose a été étudiée. Dans cette série d'expérimentations, la concentration en 13-hydroperoxyde a été portée à 0,25 mM afin d'être plus proche de la saturation de la lipoxigénase vis-à-vis du substrat réducteur. Les mesures ont été effectuées avec des quantités variables d'enzyme, allant de 0 à 0,168 nkat pour 0,5 mL de milieu réactionnel.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la Figure 32. En absence de lipoxygénase (0 nkat), l'intensité du signal n'est pas modifiée tout au long des 20 minutes d'enregistrement ce qui confirme la stabilité du TEMPOL et montre également l'absence de dégradation des hydroperoxydes dans ce laps de temps.

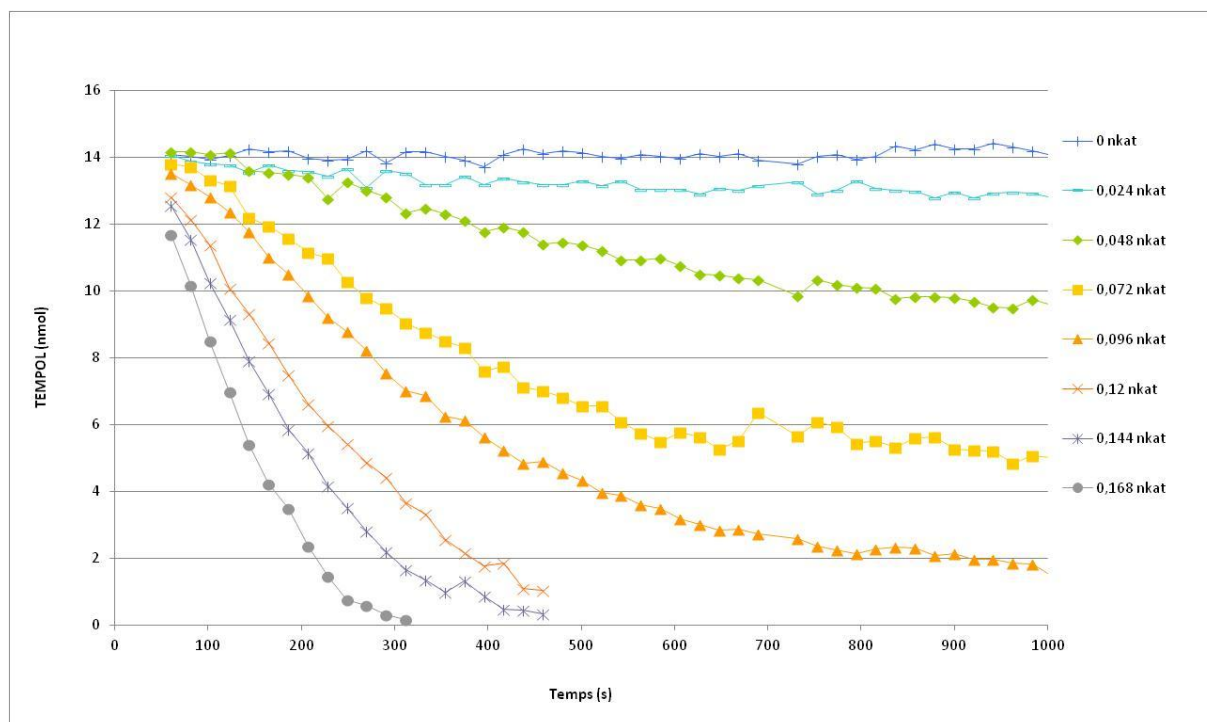


Figure 32 : Influence de la quantité d'enzyme sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction anaérobie de la LOX soja à pH 9.
(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; 13-LOOH 0,25 mM ; TEMPOL 30 μ M ; LOX soja de 0 à 0,168 nkat.)

L'ajout de lipoxygénase au milieu réactionnel provoque une consommation du TEMPOL (perte de la forme radicalaire). Cette consommation est d'autant plus rapide que la quantité de lipoxygénase ajoutée est importante. Avec 0,168 nkat de lipoxygénase ajoutée dans 0,5 mL, les 15 nmol de TEMPOL sont totalement consommées après 5 minutes de réaction anaérobie.

Lorsque la vitesse maximale de la réaction anaérobie est portée en fonction de la quantité de lipoxygénase ajoutée, une droite est obtenue entre 0,048 et 0,168 nkat d'enzyme (Figure 33).

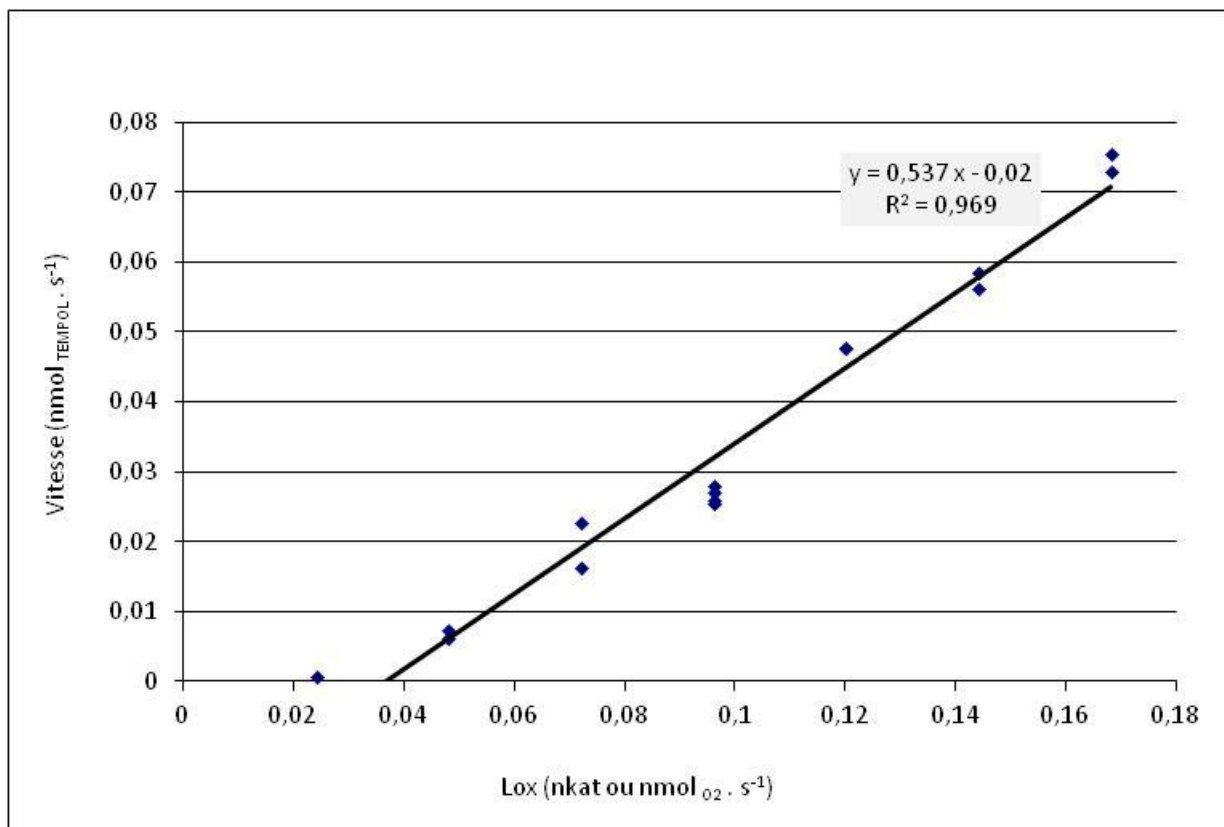


Figure 33 : Vitesse maximale de la réaction anaérobie à pH 9 en fonction de la quantité de LOX soja introduite.

(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; 13-LOOH 0,25 mM ; TEMPOL 30 μ M ; LOX soja de 0 à 0,168 nkat.)

Il semble que la réaction anaérobie ne devient notable qu'à partir d'une valeur seuil d'enzyme ajoutée (0,04 nkat dans nos conditions). Ce phénomène a également été observé à pH 6,5 avec la lipoxygénase de soja et celle de fève mais pas avec celle du blé (voir chapitre III.2.2.2). La pente de la droite obtenue est proche de 0,5 ce qui signifie qu'entre 0,04 et 0,168 nkat, la même quantité de lipoxygénase de soja à pH 9 provoque la disparition de deux fois plus d'oxygène que de TEMPOL pour des concentrations voisines en composé oxydant (0,22 mM en oxygène dans la réaction aérobie et 0,25 mM en 13-hydroperoxyde dans la réaction anaérobie).

III.2.2.1.2. Effet des concentrations en substrats sur la vitesse de la réaction

Dans un deuxième temps, l'influence des concentrations des deux substrats (acide linoléique et 13-hydroperoxyde) sur la vitesse de la réaction anaérobie a été étudiée en présence d'une quantité constante de lipoxygénase de soja (0,12 nkat dans 0,5 mL de tampon borate à pH 9). Dans cette étude, les concentrations testées ont été 0,1 ; 0,15 ; 0,3 et 1 mM pour l'acide linoléique et 0 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,07 ; 0,1 ; 0,15 et 0,25 mM pour le 13-hydroperoxyde ajouté. Si l'on admet que les vitesses des réactions de terminaison entre les radicaux libres lipidiques et le TEMPOL (à l'origine de la consommation du TEMPOL, phénomène mesuré en

RPE) sont beaucoup plus rapides que celle de la réaction anaérobie de la lipoxygénase, il est possible de déduire des relations liant la vitesse de la réaction de consommation du TEMPOL aux concentrations des deux substrats de l'enzyme, à savoir le mécanisme réactionnel et les constantes cinétiques de la réaction anaérobie catalysée par la lipoxygénase de soja à pH 9.

Au début de notre étude, acide linoléique et 13-hydroperoxyde étaient disponibles sous forme de solutions concentrées dans l'éthanol. Des études préalables au laboratoire avaient montré que l'activité lipoxygénasique mesurée par polarographie diminue notablement lorsque la concentration en éthanol dépasse 5 % dans le tampon borate à pH 9. Pour cette raison, la concentration en éthanol a été fixée à 5 % pour l'ensemble des expérimentations conduites à des concentrations en acide linoléique et 13-hydroperoxyde variables afin que les variations de vitesses observées soient induites uniquement par les variations de concentrations en substrat oxydant ou réducteur.

La Figure 34 rassemble les résultats obtenus lorsque la concentration en 13-hydroperoxyde ajoutée varie entre 0 et 0,25 mM en présence d'une concentration constante en acide linoléique (1 mM).

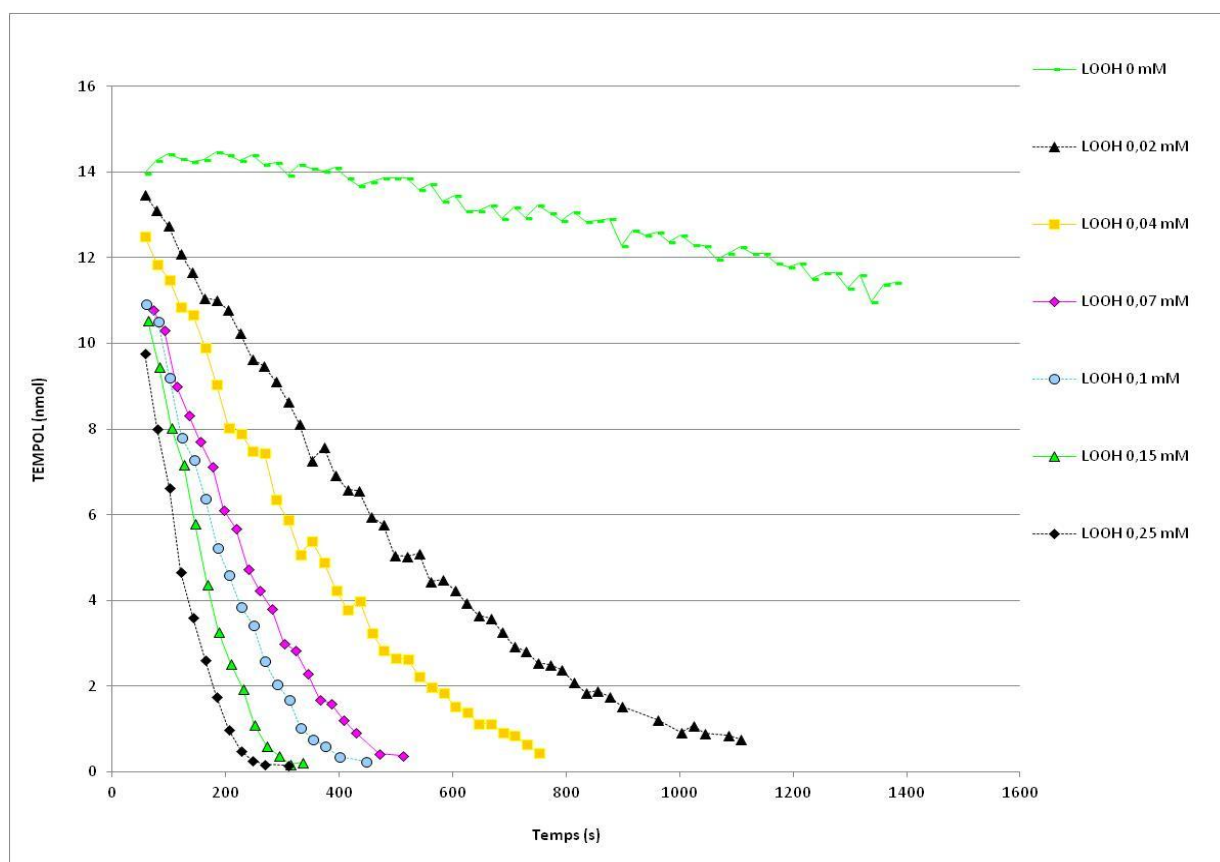


Figure 34 : Influence de la concentration en 13-LOOH ajouté sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction anaérobie de la LOX soja à pH 9.
(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; 13-LOOH de 0 à 0,25 mM ; TEMPOL 30 μ M ; LOX soja 0,12 nkat ; éthanol 5 %.)

En absence d'ajout d'hydroperoxydes, il apparaît tout de même une décroissance lente de l'intensité du signal après 5 min de réaction. La première hypothèse qui peut être formulée est la présence de traces d'oxygène au début de la mesure (l'anaérobiose totale est difficile à conserver jusqu'à la mise en cellule RPE). Cet oxygène permettrait à la lipoxigénase de produire une petite quantité de 13-hydroperoxyde à partir de l'acide linoléique contenu dans le milieu. Une fois l'oxygène consommé, l'enzyme peut fonctionner alors en anaérobiose avec les deux substrats à sa disposition, acide linoléique et 13-hydroperoxyde, pour former des radicaux libres qui seraient susceptibles de réagir avec le TEMPOL. La deuxième hypothèse avancée est la présence de traces d'hydroperoxydes dans la solution éthanolique d'acide linoléique utilisée. Pour vérifier cela, un spectre UV de cette solution a été réalisé. Une maximum d'absorbance à 234 nm a été observé ce qui correspond à la présence de deux doubles liaisons conjuguées et donc aux hydroperoxydes. A partir du coefficient d'extinction moléculaire des hydroperoxydes à 234 nm, il est possible de calculer leur concentration dans la solution d'acide linoléique. Elle est d'environ 1,2 % ce qui signifie qu'en utilisant une solution 1 mM d'acide linoléique, la concentration en hydroperoxyde apportée est de 12 μ M. En conséquence, la décroissance de l'intensité du signal RPE observée en l'absence d'ajout de 13-hydroperoxyde est probablement due à la combinaison de ces deux phénomènes.

Les courbes présentées dans la Figure 34 montrent également que la vitesse de consommation du TEMPOL augmente avec la quantité de 13-hydroperoxyde ajoutée. Les mêmes concentrations de 13-hydroperoxyde ajoutées ont été testées avec trois autres concentrations en acide linoléique, à savoir 0,3, 0,15 et 0,1 mM.

A partir de cet ensemble d'essais, il est possible de déterminer les vitesses maximales pour chacune des réactions en fonction des concentrations en hydroperoxyde ajouté (corrigées par la quantité apportée par l'acide linoléique) et en acide linoléique. La représentation de l'inverse de la vitesse de la réaction de consommation du TEMPOL en fonction de l'inverse de la concentration en 13-hydroperoxyde ajoutée (corrigée) est montrée dans la Figure 35.

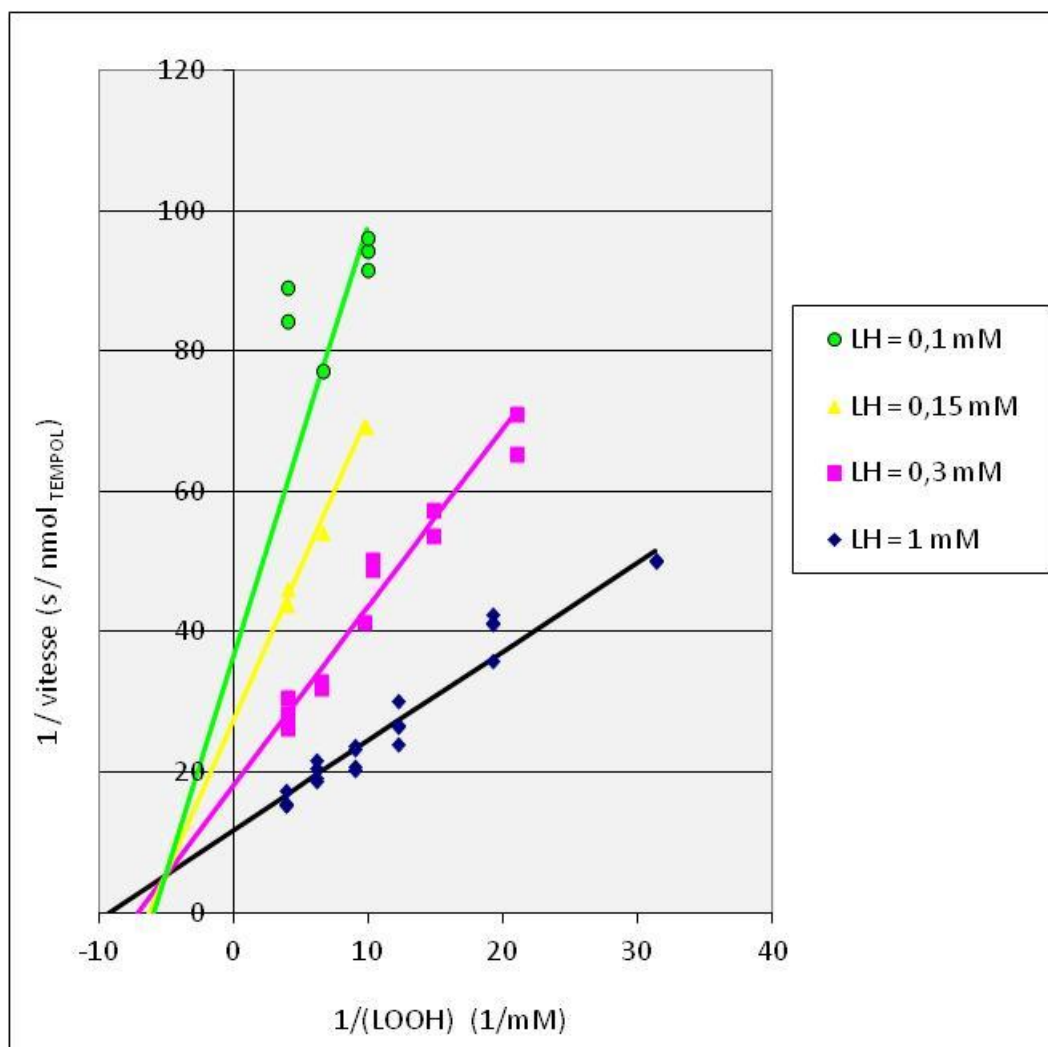


Figure 35 : Représentation en double inverse des vitesses initiales des réactions en fonction des concentrations en LOOH à différentes concentrations en LH.

(Les points représentent les valeurs expérimentales, les droites en trait plein ont été tracées à partir des valeurs calculées en utilisant les constantes cinétiques données dans le Tableau V.)

Pour chaque concentration en acide linoléique testée, une droite est obtenue dont la pente augmente lorsque la concentration acide linoléique diminue (montrant ainsi que pour une même concentration en 13-hydroperoxyde, la vitesse de consommation du TEMPOL augmente avec la concentration en acide linoléique). Les points expérimentaux sont bien alignés à l'exception de ceux obtenus pour les fortes concentrations en 13-hydroperoxyde (0,25 mM) associées à la plus faible concentration en acide linoléique (1 mM) ce qui pourrait traduire une inhibition de la réaction anaérobie par excès de substrat oxydant en présence d'une faible concentration en substrat réducteur. Ce phénomène a déjà été observé par VERHAGEN *et al.* (1978).

Les 4 droites obtenues sont sécantes ce qui est caractéristique d'un mécanisme séquentiel au hasard dans lequel l'enzyme fixe d'abord un premier substrat puis le second, sans ordre prédéfini. La fixation du premier substrat induit une modification de l'affinité de l'enzyme

pour le deuxième substrat. Une fois le complexe ternaire formé (enzyme avec ses deux substrats), celui-ci soit se dissocie, soit évolue vers la formation des produits radicalaires avec libération de l'enzyme qui peut entrer dans un nouveau cycle réactionnel (Figure 36). La modification d'affinité induite par la fixation du premier substrat est illustrée par la constante α dans la Figure 36.

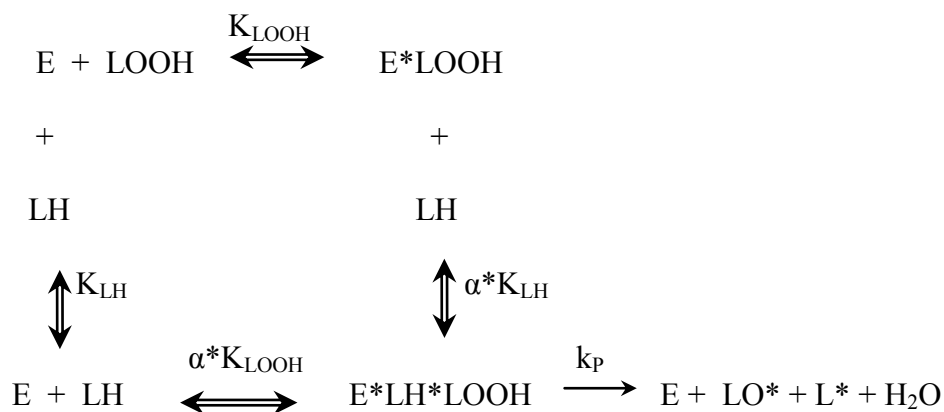


Figure 36 : Schéma réactionnel du mécanisme séquentiel au hasard.

(*E* représente la forme libre de la LOX, LH l'acide linoléique, LOOH le 13-hydroperoxyde, L^* et LO^* les produits radicalaires de la réaction anaérobie de la LOX.)

Pour ce type de mécanisme, la relation liant les concentrations en substrats avec la vitesse de la réaction est donnée par l'équation (1) reproduite ci-dessous (SEGEL, 1975) :

$$v = V_m \frac{[LH] [LOOH]}{\alpha K_{LH} K_{LOOH} + \alpha K_{LH} [LOOH] + \alpha K_{LOOH} [LH] + [LH] [LOOH]} \quad (1)$$

Avec :

v = vitesse de la réaction

$[LH]$ = Concentration en acide linoléique

$[LOOH]$ = Concentration en 13-hydroperoxyde

K_{LH} = Constante d'équilibre entre l'enzyme et l'acide linoléique (constante d'affinité)

K_{LOOH} = Constante d'équilibre entre l'enzyme et le 13-hydroperoxyde (constante d'affinité)

α = Constante modifiant l'affinité de l'enzyme pour le second substrat en présence du premier

V_m = Vitesse maximale de la réaction (enzyme saturée par ses deux substrats)

L'abscisse du point commun des 4 droites sécantes de la Figure 35 est égale à $-1 / K_{LOOH}$.

Deux graphes secondaires obtenus à partir de la Figure 35 permettent de déterminer l'ensemble des autres constantes de l'équation (1).

Le premier graphe secondaire porte l'inverse de la pente des droites du graphe primaire en fonction de l'inverse de la concentration en acide linoléique (Figure 37). Dans ce graphe, une droite est obtenue pour laquelle l'intersection avec l'axe des abscisses est égale à $-1 / K_{LH}$.

Le second graphe secondaire porte l'inverse de l'ordonnée à l'origine ($1 / V_{mapp}$) des droites du graphe primaire en fonction de l'inverse de la concentration en acide linoléique (Figure 37). Dans ce graphe, une droite est obtenue pour laquelle l'intersection avec l'axe des ordonnées est égale à $1 / V_m$ et l'intersection avec l'axe des abscisses est égale à $-1 / (\alpha * K_{LH})$.

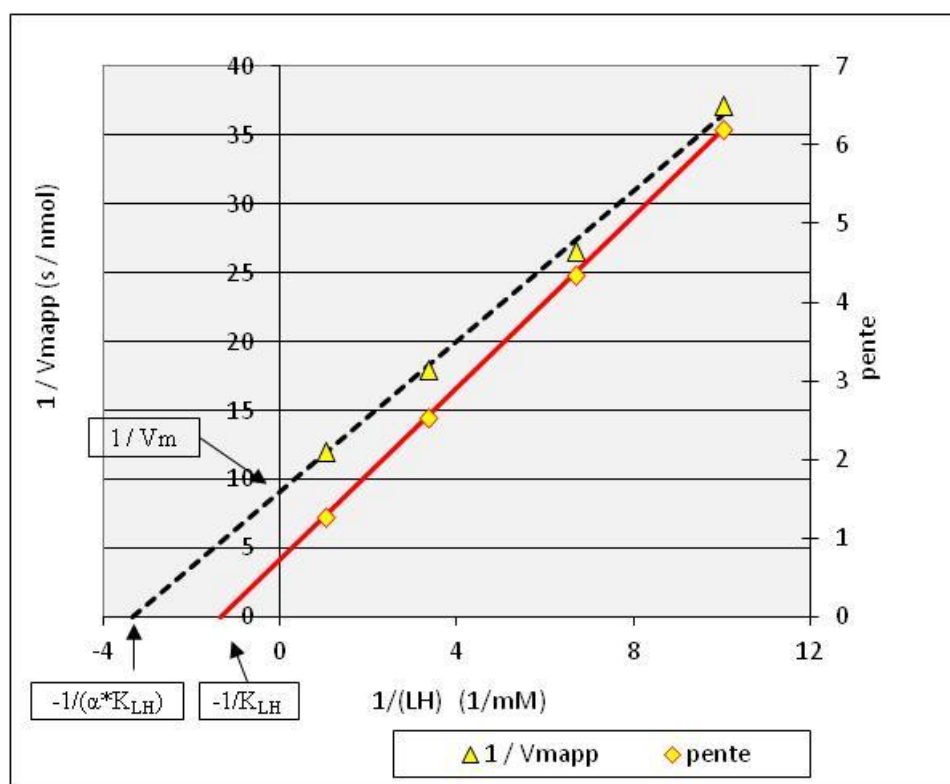


Figure 37 : Graphes secondaires donnant $1 / V_{mapp}$ (Δ) d'une part et la pente ($\diamond$) d'autre part en fonction de l'inverse de la concentration en acide linoléique (LH).

(Les droites en trait pointillé ($1/V_{mapp}$) et trait plein (pente) ont été tracées à partir des valeurs calculées de ces paramètres en utilisant les constantes cinétiques données dans le Tableau V.)

Les valeurs des paramètres cinétiques ainsi déterminés après ajout de 0,12 nkat de lipoxygénase de soja dans un volume total de 0,5 mL de tampon borate à pH 9, sont regroupées dans le Tableau V.

Tableau V : Paramètres cinétiques de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja en solution dans un tampon borate à pH 9.

V_m (nkat) (nmol.s ⁻¹ de TEMPOL)	α	K_{LH} (mM)	K_{LOOH} (mM)
0,11	0,4	0,75	0,2

Une bonne concordance est obtenue entre valeurs expérimentales et valeurs calculées des vitesses (Figures 35 et 37) à l'exception des points correspondant à la plus faible concentration en acide linoléique associée à la plus forte valeur en hydroperoxyde, probablement en raison d'une inhibition par excès de substrat oxydant.

Lors de leurs études sur le mécanisme réactionnel de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja, VERHAGEN *et al.* (1978) ont obtenu un mécanisme Ping-Pong (pas de complexe ternaire entre l'enzyme et ses deux substrats) avec une double inhibition par excès de substrat. Les constantes d'affinité qu'ils ont obtenues sont égales à 0,16 mM pour l'acide linoléique et 0,11 mM pour le 13-hydroperoxyde. Ces écarts peuvent provenir de la valeur du pH, 10 au lieu de 9, et / ou de la méthode de dosage utilisée, suivi de l'apparition des oxodiènes (augmentation de l'absorbance à 285 nm) au lieu de la consommation du TEMPOL. Ces deux méthodes de dosage de l'activité anaérobie de la lipoxygénase peuvent porter à critique. En effet, la méthode spectrophotométrique mesure l'apparition d'un ensemble de produits (les oxodiènes) qui sont eux-mêmes issus des réactions de terminaisons impliquant les radicaux libres lipidiques provenant de la scission de la fonction peroxyde et / ou de la scission de la liaison C-C située en α de cette fonction peroxyde alors que la méthode RPE suit les réactions de terminaison entre les radicaux libres lipidiques et le TEMPOL. Toutefois, si l'on admet que les vitesses de ces dernières réactions sont très rapides par rapport aux réactions catalysées par la lipoxygénase, les phénomènes suivis par RPE apparaissent à un stade plus précoce que ceux suivis par la méthode spectrophotométrique.

III.2.2.1.3. Stœchiométrie de la réaction

Dans leurs études de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja, VERHAGEN *et al.* (1978) avaient montré que la stœchiométrie est de 1 mole d'acide linoléique (substrat réducteur) pour une mole de 13-hydroperoxyde (substrat oxydant) avec formation d'une demi-mole de composés oxodiènes, la quantité d'oxodiènes formée dépendant exclusivement de la concentration du substrat limitant (oxydant ou réducteur). Le but de cette série d'expérimentations est d'étudier la stœchiométrie de la réaction entre les radicaux libres lipidiques issus de la réaction anaérobie de la lipoxygénase et le TEMPOL. Pour cela, il est nécessaire d'opérer avec un excès de TEMPOL dans le milieu réactionnel par rapport à l'un des substrats de la réaction enzymatique (oxydant ou réducteur) afin d'aboutir en fin de réaction à un signal RPE quantifiable pour déterminer la quantité résiduelle de TEMPOL.

Afin d'éviter d'utiliser des concentrations trop faibles en substrats, les premières mesures ont été réalisées en augmentant à 0,1 mM la concentration initiale en TEMPOL. La concentration en acide linoléique a été fixée à 1 mM (c'est la concentration pour laquelle les mesures sont bien reproductibles) et les concentrations en hydroperoxydes ont varié entre 0 et 0,1 mM. L'activité de la lipoxigénase de soja est maintenue à 0,12 nkat pour 0,5 mL de milieu réactionnel. Le résultat attendu est l'atteinte d'un plateau (signal RPE d'intensité constante) d'autant plus faible que la concentration en 13-hydroperoxyde ajoutée est élevée.

Les résultats obtenus montrent bien l'existence d'un plateau qui diminue pour les faibles concentrations en 13-hydroperoxyde mais qui ne diminue plus pour les concentrations plus élevées (résultats non montrés). Par ailleurs, les plateaux ne sont atteints que pour des temps largement supérieurs à 30 minutes ce qui laisse penser à une dénaturation progressive de l'activité enzymatique. Pour cette raison, quelques essais ont été refaits avec une activité enzymatique 5 fois supérieure (0,6 nkat de lipoxigénase de soja pour 0,5 mL de milieu réactionnel). Dans ces conditions, pour les plus fortes concentrations en 13-hydroperoxyde ajoutées, l'intensité du signal diminue jusqu'à disparaître totalement en 400 secondes, correspondant à une consommation totale du TEMPOL. Les valeurs des plateaux précédents atteints avec 0,12 nkat d'enzyme étaient donc faussées par la dénaturation progressive de l'activité lipoxigénasique.

Etant donné que le but est d'arriver à un équilibre avec une intensité de signal mesurable, la concentration en TEMPOL a été de nouveau augmentée pour qu'il soit en excès. Le réglage du gain G a été modifié et sa valeur a été fixée à $5 \cdot 10^3$. De même, pour éviter une perte totale de l'activité enzymatique et atteindre l'équilibre en moins de 45 minutes, l'ajout initial d'enzyme a également été augmenté.

La même série d'expérimentations (de 0 à 0,1 mM en 13-hydroperoxyde ajouté avec 1 mM en acide linoléique) a donc été refaite avec 0,3 mM en TEMPOL et 1,2 nkat d'enzyme. Les résultats sont montrés sur la Figure 38.

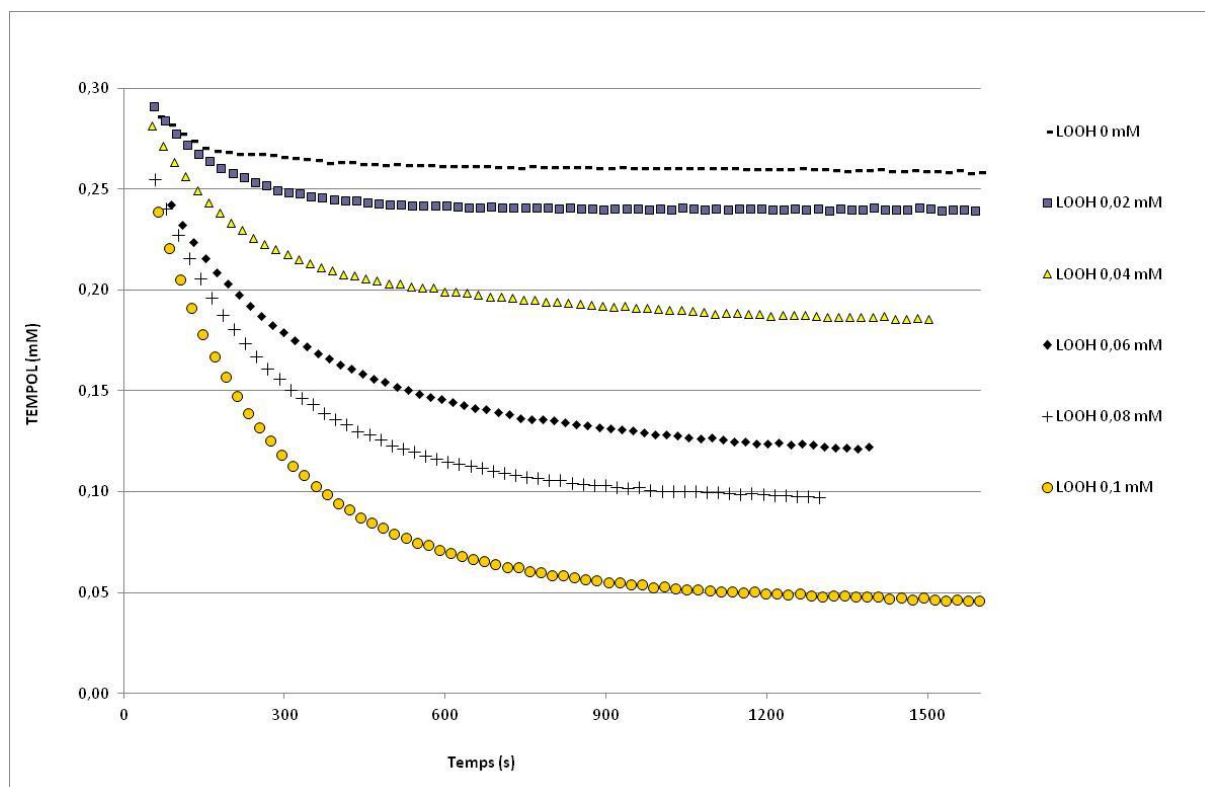


Figure 38 : Influence de la concentration en 13-LOOH ajouté sur la consommation du TEMPOL présent en excès pendant la réaction anaérobie de la LOX soja à pH 9. (0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; 13-LOOH de 0 à 0,1 mM ; TEMPOL 0,3 mM ; LOX soja 1,2 nkat.)

Il apparaît que l'intensité du signal RPE à l'équilibre en fin de réaction (au plateau) est d'autant plus basse que la concentration en 13-hydroperoxyde ajoutée est forte. De plus même sans ajout d'hydroperoxyde, une baisse du signal est observée, ceci est dû à la quantité d'hydroperoxyde présente dans la solution d'acide linoléique (1,2 %). Sachant qu'avec le nouveau réglage de gain ($G = 5 \cdot 10^3$) une intensité de $2,6 \cdot 10^6$ correspond à une concentration en TEMPOL de 0,3 mM, il est possible de calculer la concentration résiduelle en TEMPOL en fonction de la quantité en hydroperoxydes (celle apportée par 1 mM d'acide linoléique et celle ajoutée) qui a participé à la réaction anaérobie. Les points obtenus sont bien alignés (Figure 39) et le point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses donne une concentration en 13-hydroperoxyde proche de 0,14 mM. Il en résulte qu'en présence d'un excès d'acide linoléique, il faut environ 0,14 mM de 13-hydroperoxyde pour consommer en totalité 0,3 mM de TEMPOL, soit une stœchiométrie proche de 2 moles de TEMPOL pour une mole d'hydroperoxyde.

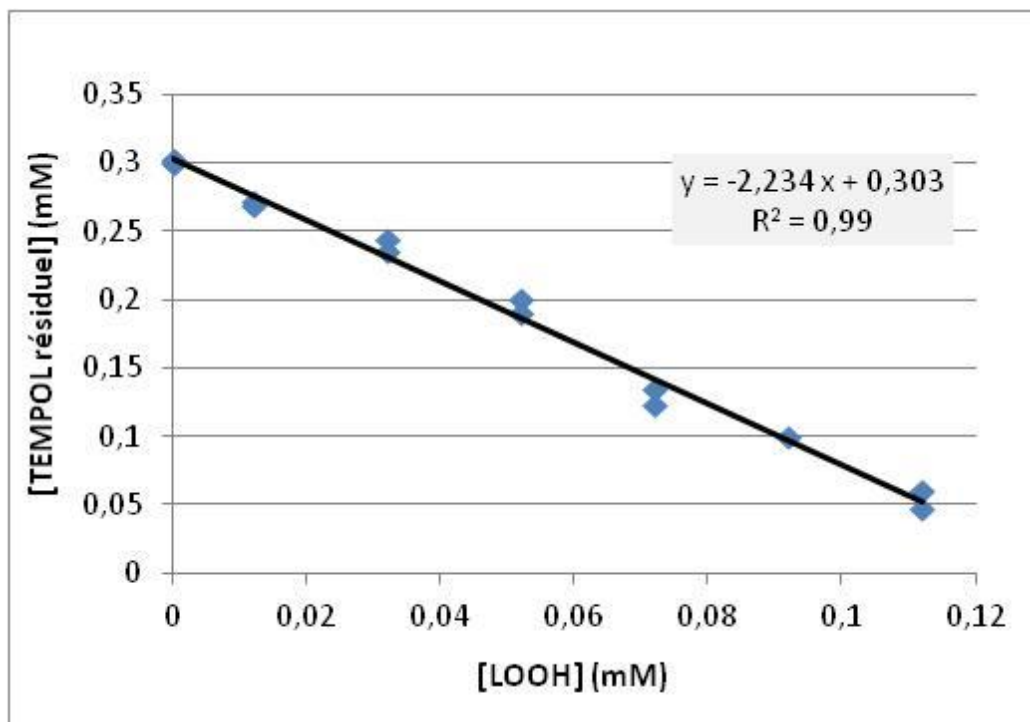


Figure 39 : Effet de la concentration en 13-LOOH ajoutée sur la concentration résiduelle en TEMPOL en fin de réaction anaérobie.

(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; 13-LOOH de 0 à 0,1 mM ; TEMPOL 0,3 mM ; LOX soja 1,2 nkat.)

Une autre série d'expérimentations a été réalisée, toujours avec 1,2 nkat d'enzyme pour 0,5 mL de milieu réactionnel et 0,3 mM de TEMPOL, mais en fixant la concentration en hydroperoxydes à 0,15 mM (concentration pour laquelle une consommation totale de TEMPOL est observée avec 1 mM d'acide linoléique) et en faisant varier la concentration en acide linoléique de 0 à 0,5 mM. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 40.

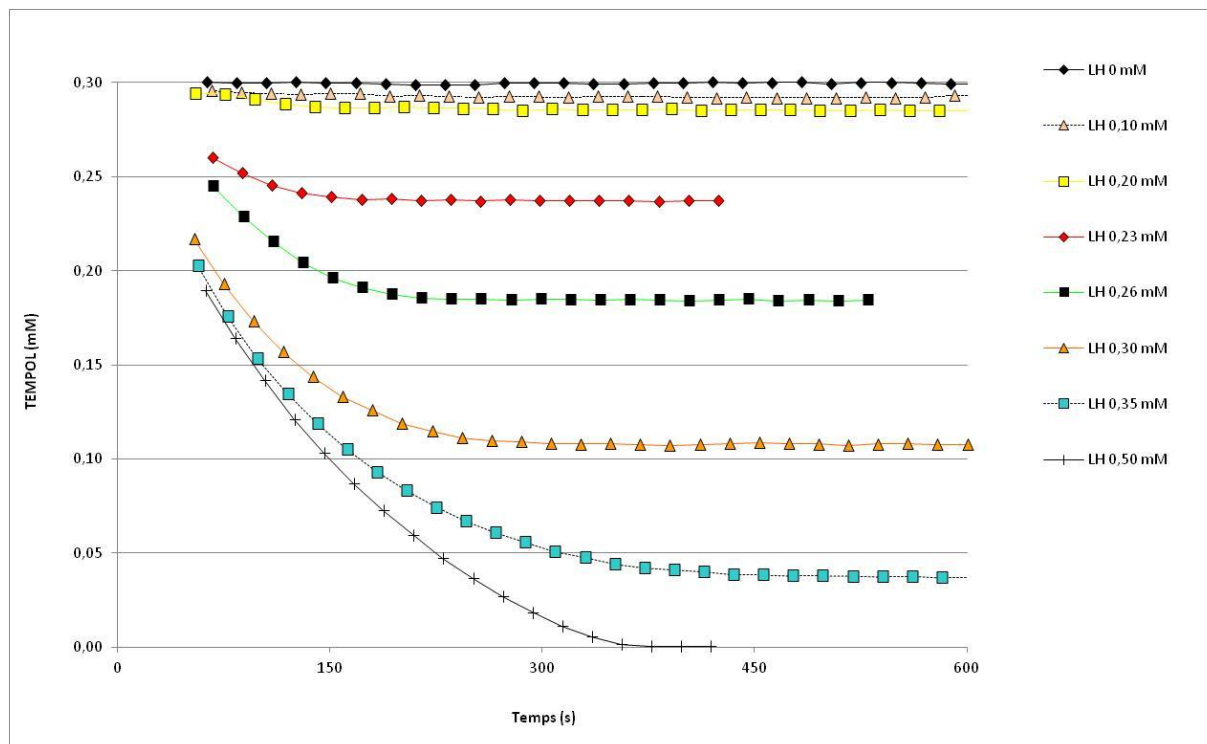


Figure 40 : Influence de la concentration en acide linoléique ajouté sur la consommation du TEMPOL présent en excès pendant la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9. (0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH de 0 à 0,5 mM ; 13-LOOH 0,15 mM ; TEMPOL 0,3 mM ; LOX soja 1,2 nkat.)

L'ensemble des courbes obtenues montre qu'en absence d'acide linoléique ajouté, le signal RPE est parfaitement stable et que c'est seulement au-delà de 0,2 mM d'acide linoléique ajouté que l'intensité du signal au niveau du plateau diminue. A partir de cette concentration en acide linoléique, le niveau du signal à l'équilibre diminue rapidement pour s'annuler avec l'ajout de 0,5 mM en acide linoléique.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les résultats obtenus aux faibles concentrations en acide linoléique :

- Pendant la désoxygénation du milieu réactionnel par bullage d'argon, il se forme beaucoup de bulles (formation de savon favorisée par le pH basique). Ces bulles montent dans le tube Eppendorf et éclatent à la surface projetant de minuscules gouttelettes hors du tube, d'où la perte probable en acide linoléique. Cette perte a un impact d'autant plus grand que la concentration initiale en acide linoléique utilisée est faible.

- Après la désaération par bullage d'argon, la lipoxygénase est ajoutée au milieu, le milieu est agité au Vortex, puis un prélèvement est effectué afin de remplir la cellule RPE. Toutes ces étapes sont susceptibles de réintroduire une petite quantité d'oxygène dans le milieu réactionnel malgré toutes les précautions prises. En présence d'oxygène, la réaction aérobie catalysée par la lipoxygénase consomme l'acide linoléique pour produire des hydroperoxydes.

Lorsque la quantité initiale d'acide linoléique utilisée est faible, il est possible que la réaction aérobie le consomme en quasi-totalité ce qui empêche la réaction anaérobie de se produire par la suite par manque du substrat réducteur.

Ceci explique également pourquoi la reproductibilité des expérimentations réalisées avec de faibles concentrations en acide linoléique est moins bonne que celles réalisées avec des concentrations plus élevées.

Comme dans le cas précédent (quantité d'hydroperoxydes ajoutée variable), il est possible de tracer l'évolution de la concentration en TEMPOL résiduelle (calculée à partir de l'intensité du signal RPE au plateau) en fonction de la concentration en acide linoléique ajoutée (Figure 41).

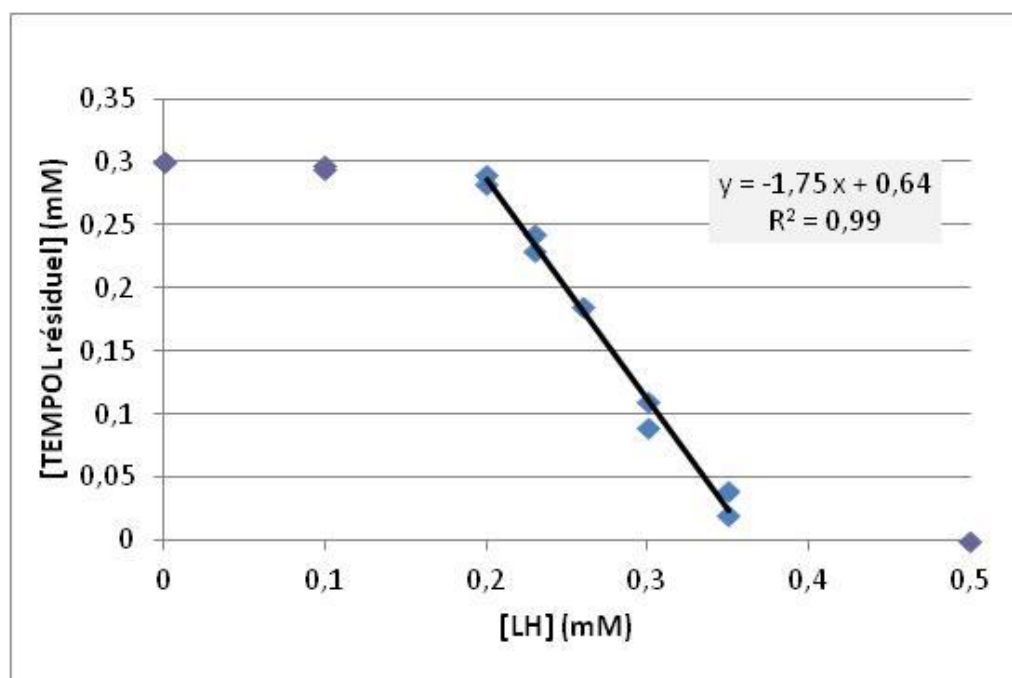


Figure 41 : Effet de la concentration en acide linoléique ajoutée sur la concentration résiduelle en TEMPOL en fin de réaction anaérobie.

(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH de 0 à 0,5 mM ; 13-LOOH 0,15 mM ; TEMPOL 0,3 mM ; LOX soja 1,2 nkat.)

Le résultat obtenu montre que la concentration résiduelle en TEMPOL décroît linéairement entre 0,2 et 0,35 mM d'acide linoléique ajouté. Entre ces deux valeurs, la consommation de TEMPOL est légèrement inférieure à 0,3 mM (elle est égale à 0,27 mM). Il en résulte qu'en présence d'une quantité suffisante de 13-hydroperoxyde (0,15 mM), il faut environ 0,15 mM de d'acide linoléique pour consommer 0,27 mM de TEMPOL, soit là encore une stœchiométrie proche de 2 moles de TEMPOL pour une mole d'acide linoléique.

Ainsi, les deux séries d'expérimentation arrivent à la même conclusion : la stœchiométrie de la réaction de consommation du TEMPOL par les radicaux libres lipidiques issus de la réaction anaérobie catalysée par la lipoxigénase est de deux moles de TEMPOL consommées pour une mole d'acide linoléique (substrat réducteur) et une mole d'hydroperoxyde (substrat oxydant) utilisées. L'examen du mécanisme de la réaction anaérobie proposé par DE GROOT *et al.* (1975) explique aisément ce résultat (Figure 42). En effet, selon ces auteurs, durant les premières étapes de la catalyse en phase anaérobie, l'arrachement d'un atome d'hydrogène de l'acide linoléique (LH) produit une forme radicalaire $L^\bullet$ tandis que simultanément la scission de la fonction peroxyde du 13-hydroperoxyde (LOOH) donne naissance à une forme radicalaire $LO^\bullet$. Le bilan de la catalyse anaérobie de la lipoxigénase peut ainsi se résumer par la réaction suivante :

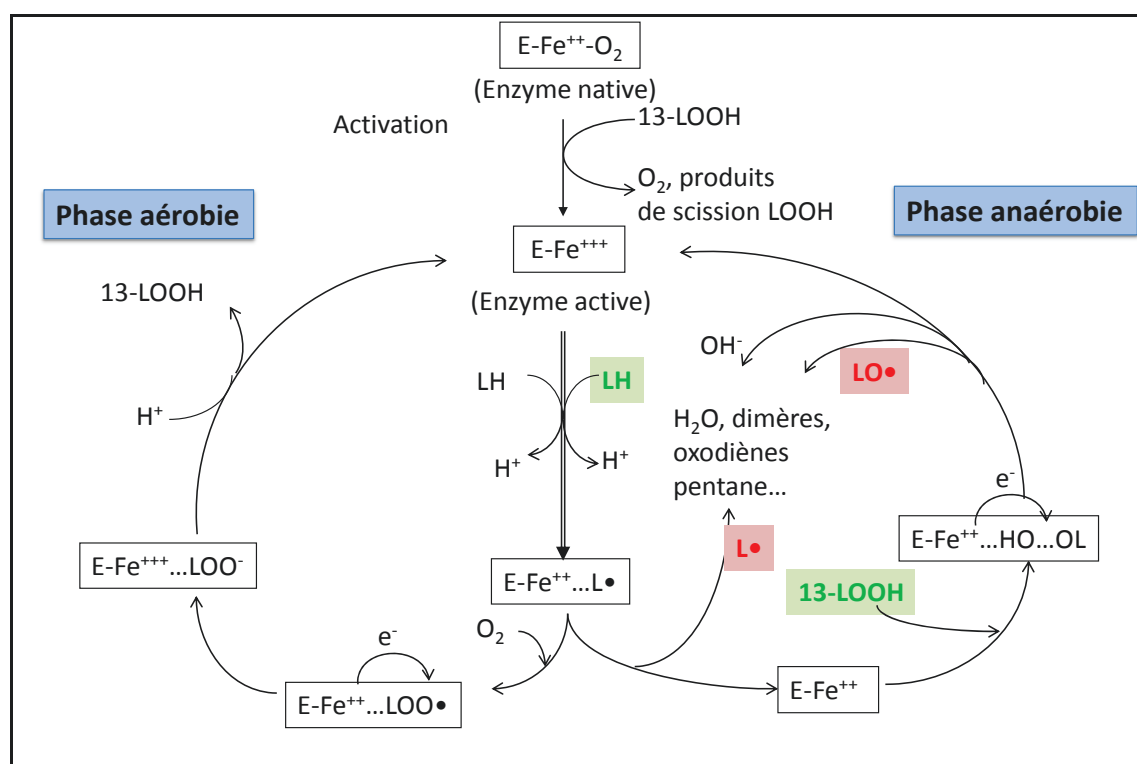


Figure 42 : Mécanisme réactionnel de la lipoxigénase de soja d'après DE GROOT *et al.* (1975).

Ce bilan fait apparaître deux formes radicalaires distinctes ($L^\bullet$ et $LO^\bullet$) qui sont susceptibles d'entrer dans des réactions de terminaison et donc de consommer chacune une mole de TEMPOL.

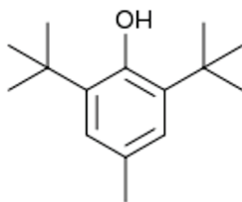
Ainsi deux moles de TEMPOL sont consommées pour une mole d'acide linoléique (substrat réducteur) et une mole d'hydroperoxyde (substrat oxydant) consommées.

Ces résultats sont confortés par les analyses HPLC-DAD et HPLC-MS réalisées par ailleurs (Aline BOUSSARD, Audrey ORANGE et Yann PADELLEC), dans le cadre de l'AIC-RPE. Ces résultats feront l'objet d'un document ultérieur.

III.2.2.1.4. Effet de composés antioxydants phénoliques

Dans une dernière série d'expérimentations concernant la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9, l'effet de l'ajout de composés antioxydants phénoliques a été étudié. Cette réaction permet en effet de mimer (en absence d'oxygène) la phase d'initiation secondaire qui se produit pendant l'oxydation des lipides (apparition de nouvelles formes radicalaires à partir de la scission de la fonction peroxyde des hydroperoxydes) tout en maîtrisant sa vitesse par l'ajout d'enzyme.

La première étude a porté sur le 2,6-*di-tert*-butyl-4-méthylphénol (BHT) :



BHT

Les conditions expérimentales sont identiques en ce qui concerne le TEMPOL (30 μ M) et la quantité de lipoxygénase (0,12 nkat dans un volume total de 0,5 mL). Les concentrations en 13-hydroperoxyde ajoutées ont varié de 0,04 à 0,15 mM pour deux concentrations en acide linoléique (0,5 et 1 mM) en absence ou en présence de BHT (0,03 ou 0,06 mM). Les résultats obtenus avec 0,5 mM en acide linoléique, 0,1 mM en 13-hydroperoxyde en présence et en absence de BHT sont présentés dans la Figure 43.

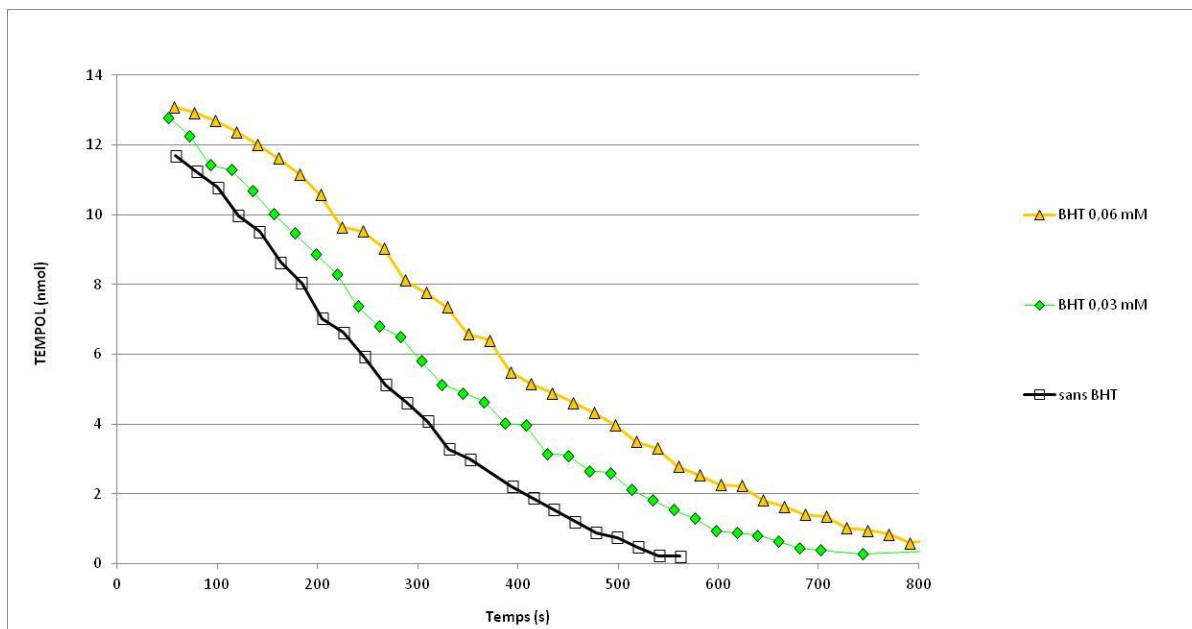


Figure 43 : Influence de l'ajout de BHT sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.
(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 0,5 mM ; 13-LOOH 0,15 mM ; TEMPOL 30 μ M ; BHT 0 à 0,06 mM ; LOX soja 0,12 nkat.)

Sans surprise, l'ajout de BHT se traduit par le ralentissement de la consommation du TEMPOL, ralentissement d'autant plus important que la concentration en BHT ajouté est élevée. Il est probable que l'antioxydant phénolique réagit avec les radicaux libres issus de la scission de la fonction peroxyde ce qui les rend moins disponibles pour des réactions de terminaison avec le TEMPOL expliquant du même coup la diminution de la vitesse de consommation de ce dernier.

Lorsque l'inverse de la vitesse maximale de la réaction est portée en fonction de l'inverse de la concentration en hydroperoxydes et cela pour les trois concentrations en BHT étudiées (0 mM ; 0,03 mM et 0,06 mM) une série de 3 droites parallèles est obtenue (Figure 44).

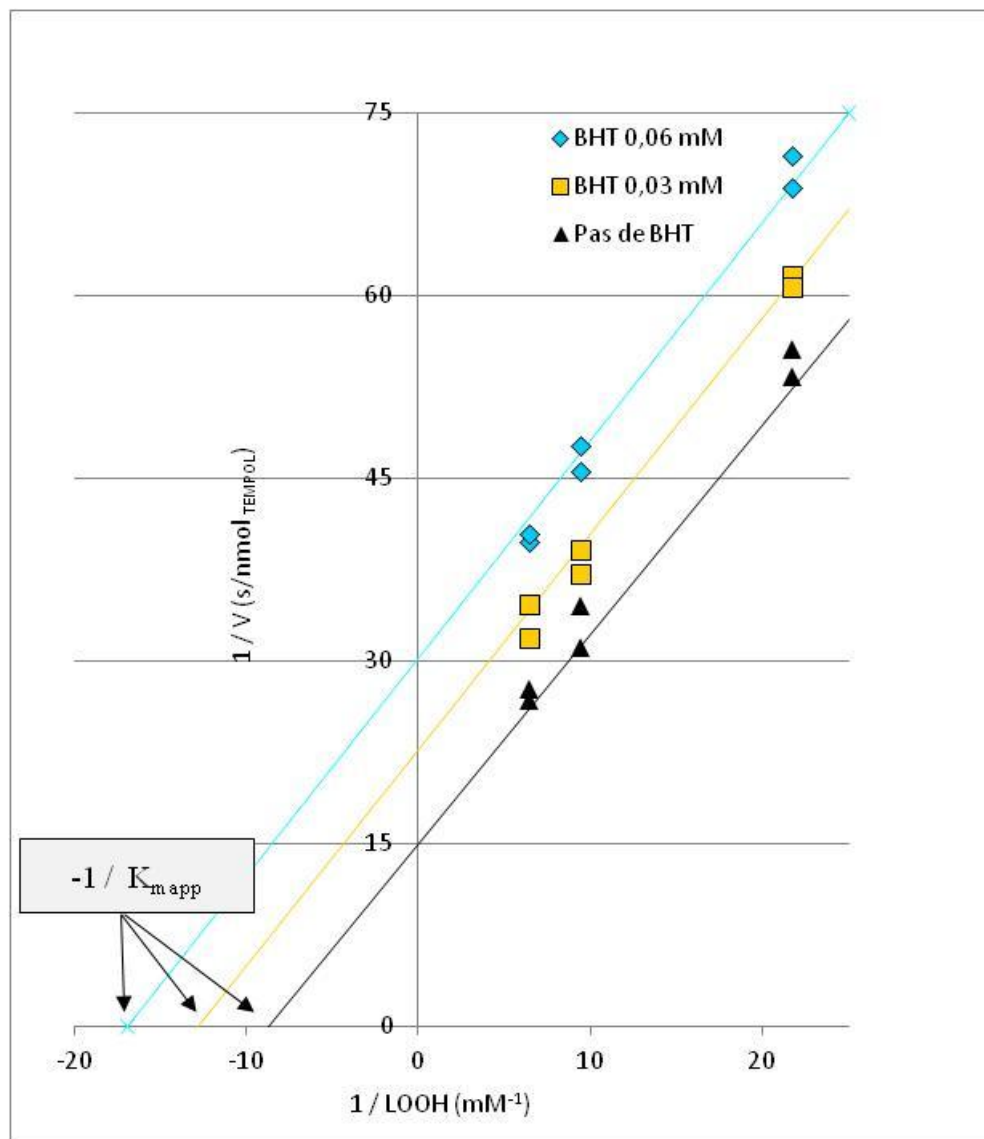


Figure 44 : Inverse de la vitesse maximale de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9 en fonction de l'inverse de la concentration en hydroperoxyde en absence ou en présence de BHT.

(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 0,5 mM ; 13-LOOH de 0,04 à 0,15 mM ; TEMPOL 30 μM ; BHT 0 à 0,06 mM ; LOX soja 0,12 nkat.)

Ce comportement est caractéristique d'une inhibition incompétitive dans laquelle l'inhibiteur se fixe exclusivement sur la forme complexée de l'enzyme avec le substrat (l'hydroperoxyde). Dans ce type d'inhibition, les valeurs de V_m et K_m sont diminuées et l'efficacité de l'inhibition augmente avec la concentration en substrat.

Un graphe secondaire dans lequel la valeur de $1 / K_{m \text{ app}}$ est portée en fonction de la concentration en BHT permet de déterminer la valeur de la constante d'inhibition ($K_{i \text{ app}}$) de ce composé pour une concentration en acide linoléique de 0,5 mM (Figure 45). La valeur obtenue par extrapolation de la droite sur l'axe des abscisses est représentative de l'affinité du BHT pour la lipoxygénase. Elle est égale à 0,065 mM.

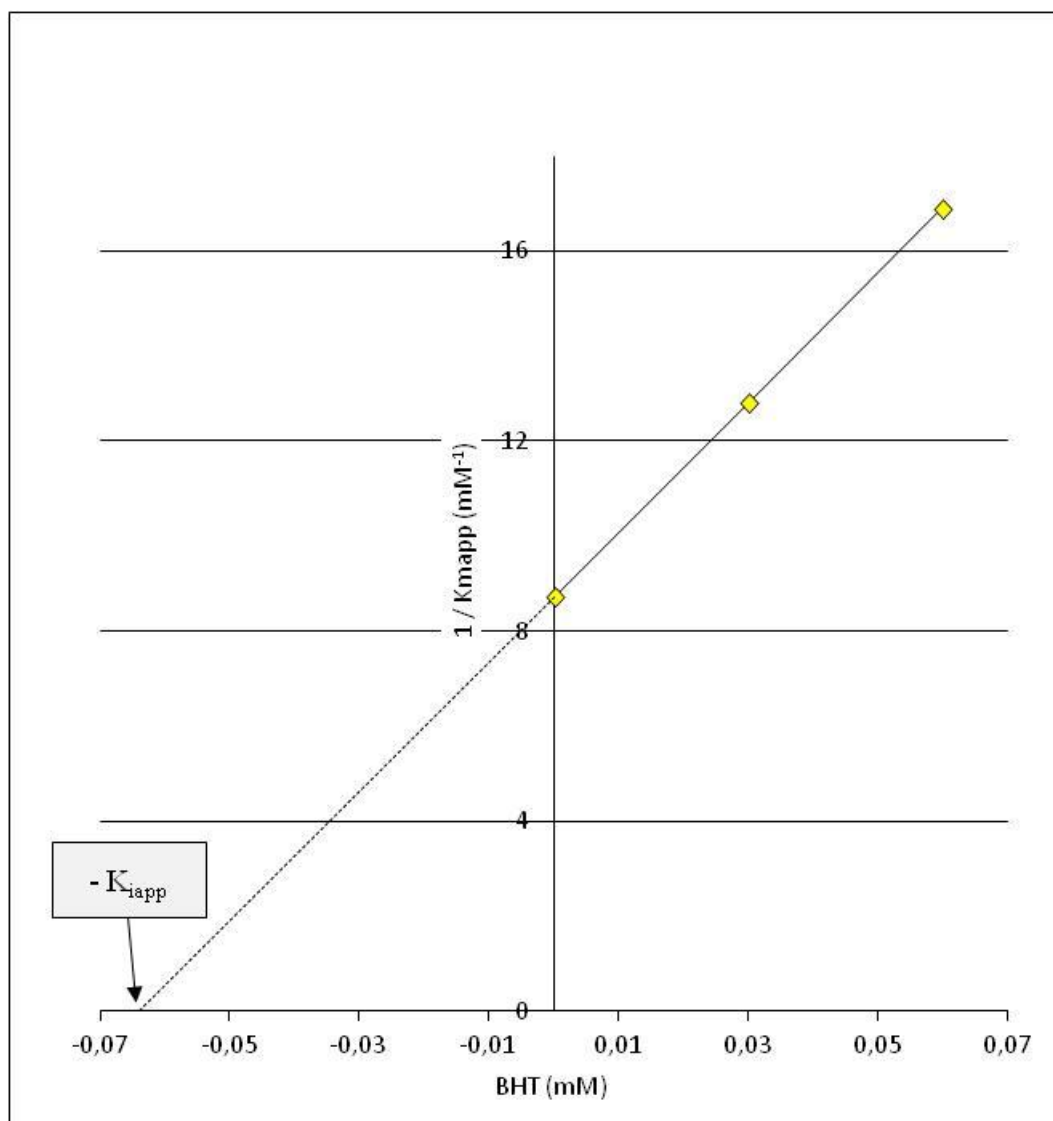


Figure 45 : Effet de la teneur en BHT sur la valeur du K_{mapp} déterminé à partir de la Figure 44. (Les conditions sont celles décrites dans la Figure 44.)

La même série d'expérimentations conduite avec une concentration en acide linoléique égale à 1 mM montre aussi une inhibition incompétitive du BHT. La valeur du K_{iapp} obtenue dans ces conditions est égale à 0,029 mM, illustrant une efficacité accrue du BHT lorsque la concentration en acide linoléique augmente.

D'autres composés antioxydants phénoliques (α -, β -, γ - et δ -Tocophérol, acide chlorogénique et (+)-catéchine) ont été testés de façon identique avec une concentration constante en acide linoléique (1 mM). Tous ces composés ont un comportement d'inhibiteur incompétitif. Les valeurs du K_{iapp} de chacun d'eux est porté dans le Tableau VI.

Tableau VI : Constante d'inhibition apparente de différents composés phénoliques vis-à-vis de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.

(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; 13-LOOH de 0,04 à 0,15 mM ; TEMPOL 30 μ M ; composé phénolique de 0 à 30 μ M ; LOX soja 0,12 nkat.)

Composés phénoliques	Ki (μ M)	Type d'inhibition
BHT	29	incompétitive
α -Tocophérol	38	incompétitive
β -Tocophérol	36	incompétitive
γ -Tocophérol	30	incompétitive
δ -Tocophérol	28	incompétitive
Acide chlorogénique	63	incompétitive
(+)-Catéchine	170	incompétitive

Les 4 formes de tocophérol ont une efficacité très proche et voisine de celle du BHT, alors que les moins efficaces sont la (+)-catéchine et l'acide chlorogénique.

Un résultat similaire (inhibition incompétitive) avait été observé par RICHARD-FORGET *et al.* (1995) pour la réaction aérobie à pH 6,5 des lipoxygénases de fève et d'orge germée avec une série d'antioxydants phénoliques. Dans le cas de la lipoxygénase de fève, les constantes d'inhibition apparentes étaient comprises entre 30 et 150 μ M pour les esters de l'acide gallique alors que la valeur trouvée pour la (+)-catéchine était de 0,5 mM.

Le fait de trouver une inhibition ne signifie pas obligatoirement que ces composés phénoliques forment un complexe avec l'enzyme. Cependant, le fait que la forme d'inhibition s'apparente à une inhibition incompétitive pourrait plutôt être dû à une action de l'inhibiteur se situant juste après la formation du complexe entre l'enzyme et le 13-hydroperoxyde. En effet, la formation de ce complexe est immédiatement suivie de l'apparition du radical $LO^{\bullet}$ qui est la cible probable du composé phénolique antioxydant.

A l'issue de ce chapitre consacré à l'étude la réaction anaérobie catalysée par la lipoxygénase de soja à pH 9, il est utile de récapituler les principaux résultats obtenus à l'aide du suivi de la consommation du TEMPOL par RPE :

➤ Un mécanisme séquentiel au hasard de la réaction anaérobie de la Lipoxygénase de soja a été établi.

- Les paramètres cinétiques associés à ce mécanisme ont été déterminés

$$K_{LH} = 0,75 \text{ mM}$$

$$K_{LOOH} = 0,2 \text{ mM}$$

$$\alpha = 0,4$$

$$V_m = 0,11 \text{ nmol TEMPOL.s}^{-1} \text{ (pour une activité aérobie de 0,12 nkat).}$$

➤ La stœchiométrie de la réaction entre le TEMPOL et les 2 substrats de la réaction anaérobie de la lipoxygénase a été établie, elle est égale à 2 moles de TEMPOL consommées pour 1 mole d'acide linoléique et 1 mole de 13-hydroperoxyde.

➤ La séparation, l'identification et la quantification par HPLC / DAD et HPLC / MS des adduits entre le TEMPOL et les radicaux libres lipidiques ont été initiées dans le cadre de l'AIC-RPE.

➤ Le mode d'inhibition de quelques antioxydants phénoliques a été établi et les constantes d'inhibition K_{iapp} ont été déterminées.

Le chapitre suivant est consacré à une étude similaire mais avec des lipoxygénases provenant d'autres sources végétales avec des caractéristiques cinétiques différentes (optimum d'activité à pH 6,5).

III.2.2.2. Lipoxygénases à pH 6,5

Les autres lipoxygénases étudiées sont celles de blé et de fève. Etant donné que leur pH optimal d'activité est de 6,5, il a été décidé de réétudier également l'action de la lipoxygénase de soja à ce pH. En effet, il existe plusieurs isoformes de lipoxygénase de soja et à pH 6,5, ce sont d'autres isoformes (L_2 et L_3) qui s'expriment majoritairement alors que la forme L_1 est la seule active à pH 9.

Jusqu'ici, les expérimentations étaient réalisées à pH 9, pH auquel l'acide linoléique forme une solution homogène en phase aqueuse aux concentrations qui ont été utilisées ($\leq 1 \text{ mM}$). A pH 6,5 (pH proche de la neutralité), l'acide linoléique n'est plus soluble et cela nécessite d'ajouter un agent tensioactif (le Tween 20) pour le rendre accessible à la lipoxygénase. Dès lors, les études qui suivent ont toutes été réalisées avec un milieu réactionnel qui différait du précédent par l'ajout du Tween 20 (substrat « RM 4 »).

L'activité enzymatique aérobie mesurée par polarographie avec le substrat « RM 4 » à pH 6,5 est reportée dans le Tableau VII pour les différentes préparations de lipoxygénase utilisées (soja, blé et fève). Sans surprise, l'activité de la même préparation de lipoxygénase de soja est près de cinq fois plus faible à pH 6,5 qu'à pH 9. Ainsi qu'il a été écrit précédemment,

l'isoforme L₁ (majoritaire dans la préparation utilisée) est nettement moins active à pH 6,5 contrairement aux isoformes L₂ et L₃ (minoritaires dans la préparation utilisée) actives aux pH proches de la neutralité mais inactives à pH 9.

Tableau VII : Activité aérobie à pH 6,5 des lipoxygénases de soja, blé et fève.

	LOX de soja	LOX de blé	LOX de fève
Activité (nkat.mL ⁻¹)	75	200	50

Les dosages d'activité ont été faits également en présence de TEMPOL (0,3 mM). La lipoxygénase de blé n'est quasiment pas affectée, la lipoxygénase de soja est faiblement inhibée (10 % de perte d'activité) alors que la lipoxygénase de fève est fortement inhibée (près de 60 % de perte d'activité). Le TEMPOL inhibe donc la consommation d'oxygène pour la lipoxygénase de fève. Ceci étant, comme les expérimentations qui vont suivre sont réalisées en anaérobiose, il a été décidé tout de même de suivre les réactions par RPE en se basant sur l'activité aérobie des différentes préparations enzymatiques mesurée en absence de TEMPOL. Le TEMPOL inhibe la consommation d'oxygène pour certaines lipoxygénases mais son impact est inconnu sur la réaction anaérobie. En remarque préalable, il apparaît que par rapport aux mesures de consommation de TEMPOL réalisées à pH 9, celles effectuées à pH 6,5 avec le substrat « RM4 » sont plus « bruitées », entraînant une moins bonne reproductibilité des duplicata. Il est probable que le signal RPE soit perturbé par la présence de Tween 20.

III.2.2.2.1. Effet de la quantité d'enzyme sur la vitesse de la réaction

Dans un premier temps, l'influence des quantités d'enzyme ajoutées sur la vitesse de la réaction anaérobie des différentes lipoxygénases a été étudiée (Figure 46).

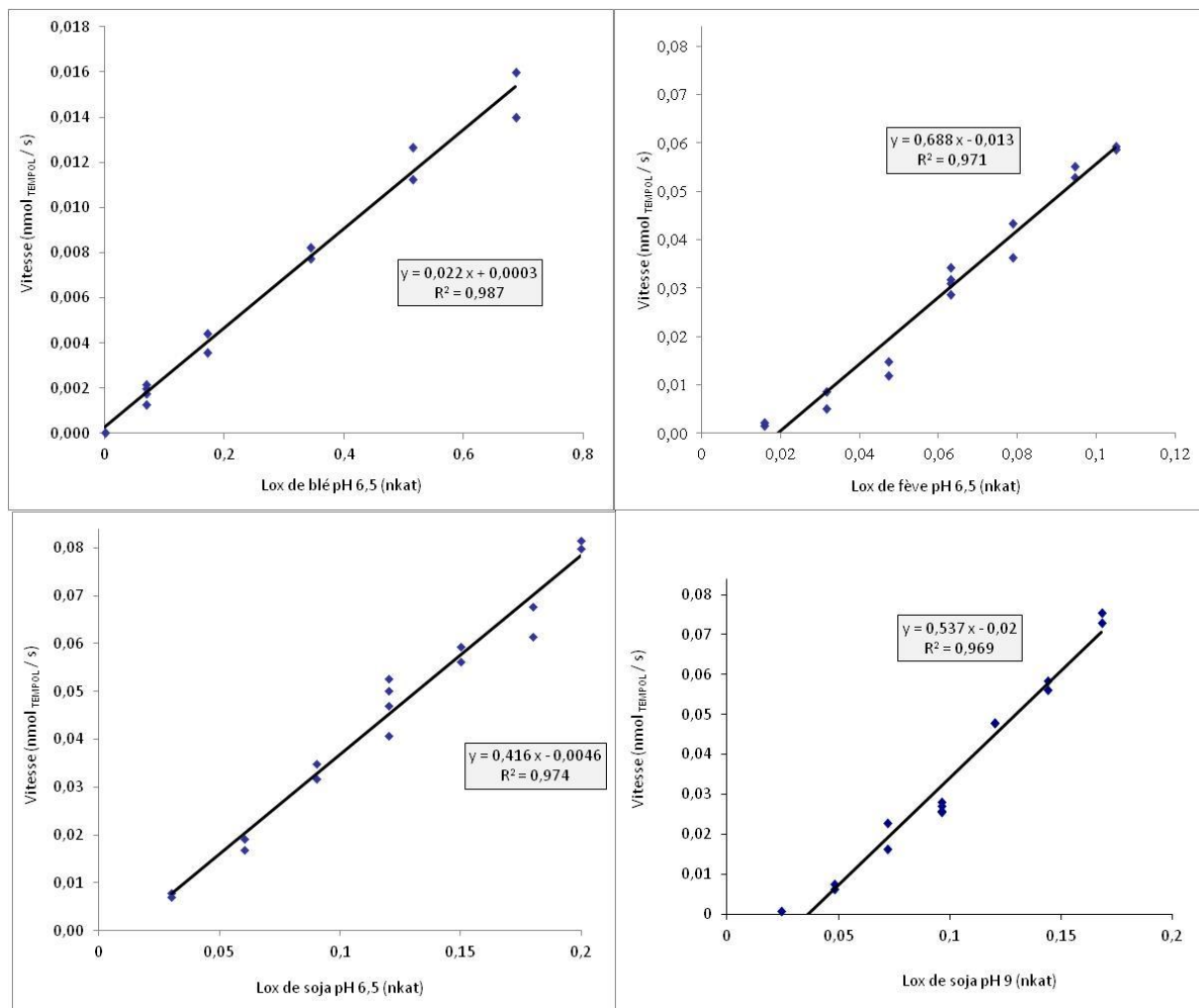


Figure 46 : Vitesses maximales de la réaction anaérobie avec un substrat « RM4 » à pH 6,5 en fonction de différentes quantités de LOX introduites.

Les quantités de LOX introduites sont exprimées par la vitesse mesurée en milieu aérobie à pH 6,5 en absence de TEMPOL (sauf pour la LOX soja à pH 9).

(LH 1 mM ; 13-LOOH 0,15 mM (0,25 mM pour la LOX soja à pH 9) ; TEMPOL 30 μ M.)

Comme dans le cas de la lipoxygénase de soja à pH 9, les vitesses de la réaction anaérobie des lipoxygénases de soja et de fève sont proportionnelles aux quantités d'enzyme ajoutées mais la proportionnalité n'apparaît qu'après une quantité minimale ajoutée, 0,02 nkat pour la fève et 0,01 nkat pour le soja. Ce phénomène n'est pas observé avec la lipoxygénase du blé où la vitesse de la réaction anaérobie est strictement proportionnelle à la quantité d'enzyme ajoutée. Cependant, lorsque l'ensemble des résultats obtenus pour les lipoxygénases de soja et de fève sont comparés, il apparaît que pour une même vitesse de la consommation d'oxygène (milieu aérobie), les vitesses de consommations de TEMPOL (réaction anaérobie) sont identiques à pH 6,5 et à pH 9 pour la lipoxygénase de soja alors que celle catalysée par la lipoxygénase de fève est légèrement supérieure (au-delà de 0,07 nmol $O_2 \cdot s^{-1}$). Il est possible que cette différence de comportement soit liée à l'effet propre du TEMPOL. En effet, ce

composé inhibe fortement l'activité aérobie de la lipoxygénase de fève à pH 6,5 alors que pour la lipoxygénase de soja, son effet sur la réaction aérobie est faible à pH 6,5 et nul à pH 9.

Lorsque les vitesses de consommation du TEMPOL en anaérobie et de l'oxygène en aérobie sont comparées, le rapport est de 0,42 pour la lipoxygénase de soja à pH 6,5, 0,54 pour la lipoxygénase de soja à pH 9 et de 0,69 pour la lipoxygénase de la fève (Figure 46). Le résultat est très différent pour la lipoxygénase de blé puisqu'il faut ajouter des quantités d'enzyme de quinze à vingt fois plus fortes pour obtenir des vitesses de la réaction anaérobie comparables à celles observées avec les deux autres lipoxygénases. Dans le cas de l'enzyme de blé, le rapport TEMPOL consommé sur oxygène consommé n'est plus que de 0,022 (Figure 46).

Ce résultat tient probablement à la nature du substrat oxydant, le 13-hydroperoxyde, qui a été utilisé dans nos expérimentations. En effet, la nature des produits formés lors de la réaction aérobie des lipoxygénases de soja (à pH 9 et à pH 6,5), de fève et de blé est très différente (Tableau VIII).

Tableau VIII : pH optimum de la réaction aérobie et pourcentage de chaque hydroperoxyde produit en présence d'oxygène par les lipoxygénases de soja, fève et blé (NICOLAS et DRAPRON, 1981).

Lipoxygénase	pH optimum	13 hydroperoxydes (%)	9 hydroperoxydes (%)
Soja L1	9	90	10
Soja L2	6,5	40	60
Soja L3	6,5	55	45
Fève	6,8	60	40
Blé	6,5	15	85

Ainsi, la lipoxygénase de blé produit très majoritairement du 9-hydroperoxyde à l'opposé de l'isoforme L1 du soja qui, à pH 9, produit essentiellement du 13-hydroperoxyde tandis que les isoformes L2 et L3 du soja et celle de la fève produisent à pH 6,5 des quantités voisines de 9 et 13-hydroperoxydes. Il est dès lors possible que le 13-hydroperoxyde ne soit pas ou très peu reconnu comme substrat oxydant de la réaction anaérobie catalysée par la lipoxygénase de blé. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait refaire les expérimentations avec la lipoxygénase de blé en utilisant le 9-hydroperoxyde en lieu et place du 13-hydroperoxyde.

III.2.2.2.2. Effet des concentrations en substrats sur la vitesse de la réaction

Comme dans le cas de la lipoxygénase de soja à pH 9, l'effet des variations des concentrations en substrat réducteur (acide linoléique) et oxydant (13-hydroperoxyde) a été analysé sur la vitesse de la réaction anaérobie à pH 6,5 pour les lipoxygénases de soja et de fève. Les quantités d'enzyme testées à pH 6,5 étaient de 0,12 nkat pour la lipoxygénase de soja et de 0,063 nkat pour celle de fève (activités aérobies mesurées avec le substrat « RM4 » en absence de TEMPOL). Un traitement des données identique à celui effectué avec la lipoxygénase de soja à pH 9 a permis de déterminer les constantes cinétiques de la réaction anaérobie catalysée par les lipoxygénases de soja et de fève à pH 6,5 (Tableau IX).

Tableau IX : Paramètres cinétiques de la réaction anaérobie des lipoxygénases de soja et de fève à pH 6,5.

	Soja		Fève
	pH 9 (rappel)	pH 6,5	pH 6,5
Quantité d'enzyme utilisée (nmol_{O2}.s⁻¹ pour vol. total de 0,5 mL)	0,12	0,12	0,063
V_m nkat (nmol_{TEMPOL}.s⁻¹)	0,11	0,125	0,093
K_{LH} (mM)	0,75	0,89	1,4
K_{LOOH} (mM)	0,2	0,39	0,18
α	0,4	0,38	0,47

Les valeurs des constantes d'affinité des lipoxygénases de fève à pH 6,5 et de soja à pH 6,5 et à pH 9 varient dans un rapport de 1 à 2 aussi bien pour le substrat oxydant (de 0,18 à 0,39 mM pour le 13-hydroperoxyde) que pour le substrat réducteur (de 0,75 à 1,4 mM pour l'acide linoléique). L'effet induit par la fixation d'un substrat sur l'affinité de l'enzyme pour l'autre substrat est très proche pour les activités testées (α varie de 0,38 à 0,47).

En utilisant les paramètres cinétiques données dans le Tableau IX, il est possible de calculer pour les 3 enzymes testées, la vitesse de consommation du TEMPOL pour une concentration en substrat oxydant (le 13-hydroperoxyde) de 0,22 mM identique à celle de l'oxygène présente dans la réaction aérobie servant à mesurer l'activité lipoxygénasique en présence d'une même concentration en substrat réducteur (1 mM en acide linoléique).

Tableau X : Comparaison des vitesses des réactions aérobie (mesure expérimentale) et anaérobie (calculées à partir des paramètres du Tableau IX) des lipoxygénases du soja à pH 6,5 et 9 et de la fève à pH 6,5 (1 mM en substrat réducteur et 0,22 mM en substrat oxydant).

	Soja		Fève
	pH 9	pH 6,5	pH 6,5
Réaction aérobie ($\text{nmol}_{\text{O}_2} \cdot \text{s}^{-1}$ vol total 0,5 mL)	0,12	0,12	0,063
Réaction anaérobie ($\text{nmol}_{\text{TEMPOL}} \cdot \text{s}^{-1}$ vol total 0,5 mL)	0,057	0,048	0,036
Ratio aérobie / anaérobie	2,1	2,5	1,8

Le résultat obtenu (Tableau X) montre que pour une concentration identique en substrat oxydant la vitesse de la réaction aérobie (consommation de l'oxygène) est près de deux fois plus rapide que celle la réaction anaérobie (consommation du TEMPOL) et ce pour les 3 préparations testées à pH 6,5 comme à pH 9. Cette observation rejoint et complète celle du paragraphe précédent où les vitesses expérimentales de consommation du TEMPOL et de l'oxygène étaient comparées mais pour des concentrations en substrat oxydant différentes.

III.2.2.2.3. Effet de l'ajout d'un composé antioxydant phénolique : le BHT

L'étude de l'effet de l'ajout de BHT a également été réalisée avec les lipoxygénases de fève et de soja à pH 6,5. Comme dans le cas de la lipoxygénase à pH 9, le mode d'inhibition est toujours incompétitif et les valeurs de la constante d'inhibition, toutes du même ordre de grandeur, sont reportées dans le Tableau XI pour les deux enzymes à pH 6,5 en comparaison de celle obtenue pour la réaction à pH 9.

Tableau XI : Constante d'inhibition apparente du BHT vis-à-vis de la réaction anaérobie des lipoxygénases de soja à pH 6,5 et à 9 et de la fève à pH 6,5.

(Volume total de 0,5 mL ; LH 1 mM ; 13-LOOH de 0,04 à 0,15 mM ; TEMPOL 30 μM , BHT de 0 à 30 μM et LOX soja 0,12 nkat, LOX fève 0,063 nkat.)

Lipoxygénase	Ki (μM)	Type d'inhibition
Soja pH 9	29	incompétitive
Soja pH 6,5	23	incompétitive
Fève	26	incompétitive

A l'issue de ce chapitre consacré à l'étude la réaction anaérobie catalysée par la lipoxygénase, il apparaît qu'à pH 6,5, les lipoxygénases de soja et de la fève ont un comportement voisin de celui de la lipoxygénase de soja à pH 9 alors que la lipoxygénase de blé est très différente. Cette différence tient probablement à la nature du substrat oxydant que nous avons testé, le 13-hydroperoxyde. Au cours de la réaction aérobie, celui-ci est formé en proportion notable par les lipoxygénases de fève et de soja mais pas par celle du blé. Il est envisageable que le système lipoxygénasique du blé ne reconnaît pas (ou mal) ce substrat oxydant expliquant du même coup sa faible activité en anaérobie.

Après les études consacrées à la réaction anaérobie de la lipoxygénase, il convient de s'intéresser à la catalyse en présence d'oxygène, donc à des réactions qui se placent en amont par rapport à celles suivies jusqu'à présent.

III.2.3. REACTION AEROBIE

Dans cette partie, la réaction d'oxydation de l'acide linoléique en présence de TEMPOL sera suivie dans un milieu qui aura été préalablement saturé en air à 25 °C. Une fois l'enzyme ajoutée, le milieu réactionnel placé dans la cellule RPE sera clos et plus aucun apport d'oxygène par l'atmosphère extérieure ne sera possible. Ainsi, l'expérimentation débute en présence d'oxygène (0,22 mM) et s'appauvrit progressivement du fait de la réaction enzymatique pour terminer dans un milieu anaérobie sans oxygène avec une concentration maximale théorique en hydroperoxyde de 0,22 mM (le 13-hydroperoxyde si l'enzyme utilisée est celle du soja à pH 9). Comme dans le chapitre précédent, les expérimentations ont débuté avec la lipoxygénase de soja à pH 9 puis se poursuivront avec les autres enzymes.

III.2.3.1. Lipoxygénase de soja à pH 9

Une expérimentation préliminaire est effectuée avec une concentration de 1 mM en acide linoléique et 0,12 nkat de lipoxygénase de soja pour un volume de milieu réactionnel de 0,5 mL en tampon borate à pH 9 (conditions proches de celles utilisées en anaérobiose mais en absence de 13-hydroperoxyde ajouté).

Une lente diminution du signal RPE est tout d'abord observée pendant les 450 premières secondes de l'expérimentation (Figure 47). Au-delà de cette durée, la diminution du signal s'accélère pour aboutir à une consommation totale du TEMPOL après 20 minutes de réaction. Lors des essais avec le POBN, il avait été remarqué que les réactions impliquant ce composé avec les radicaux libres lipidiques ne se produisaient pas de façon notable en milieu aérobie. Par analogie avec cette observation, nous avons dans un premier temps émis

l'hypothèse que la rupture de pente était le signe du début de la réaction anaérobie de la lipoxygénase.

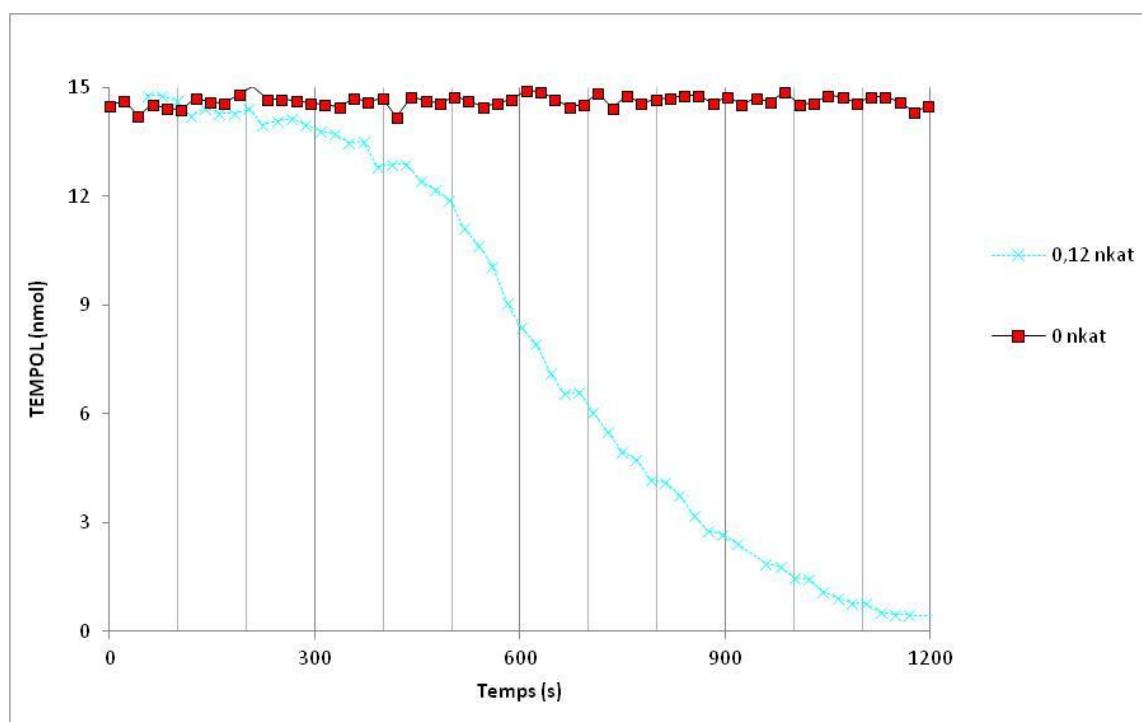


Figure 47 : Suivi de la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.
(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; TEMPOL 30 μ M ; LOX soja 0 ou 0,12 nkat.)

Ainsi avec une quantité d'enzyme de 0,12 nkat (dans un volume de 0,5 mL), il était supposé que la consommation de l'oxygène présent dans la cellule était totale après 450 secondes de réaction et qu'ensuite, l'enzyme se trouvait en présence d'acide linoléique à une concentration proche de 0,78 mM (1 mM présent initialement moins 0,22 mM consommé pendant la réaction aérobie) et de 0,22 mM en 13-hydroperoxyde (formé pendant la réaction aérobie).

L'effet de différents facteurs, et en premier lieu celui de la quantité d'enzyme ajoutée, a été étudié sur cette cinétique à double pente.

III.2.3.1.1. Effet de la quantité d'enzyme sur la consommation du TEMPOL en milieu aérobie

Lorsque la quantité d'enzyme ajoutée augmente, la durée de la première phase diminue alors que la vitesse de consommation du TEMPOL pendant la deuxième phase augmente (Figure 48). Quoique plus difficilement mesurable, la vitesse de la première phase augmente également. L'augmentation de la vitesse et la diminution de la durée font que la quantité de TEMPOL consommée pendant la première phase reste comprise entre 2 et 3 nmol quand la quantité de lipoxygénase utilisée varie de 0,06 à 0,36 nkat.

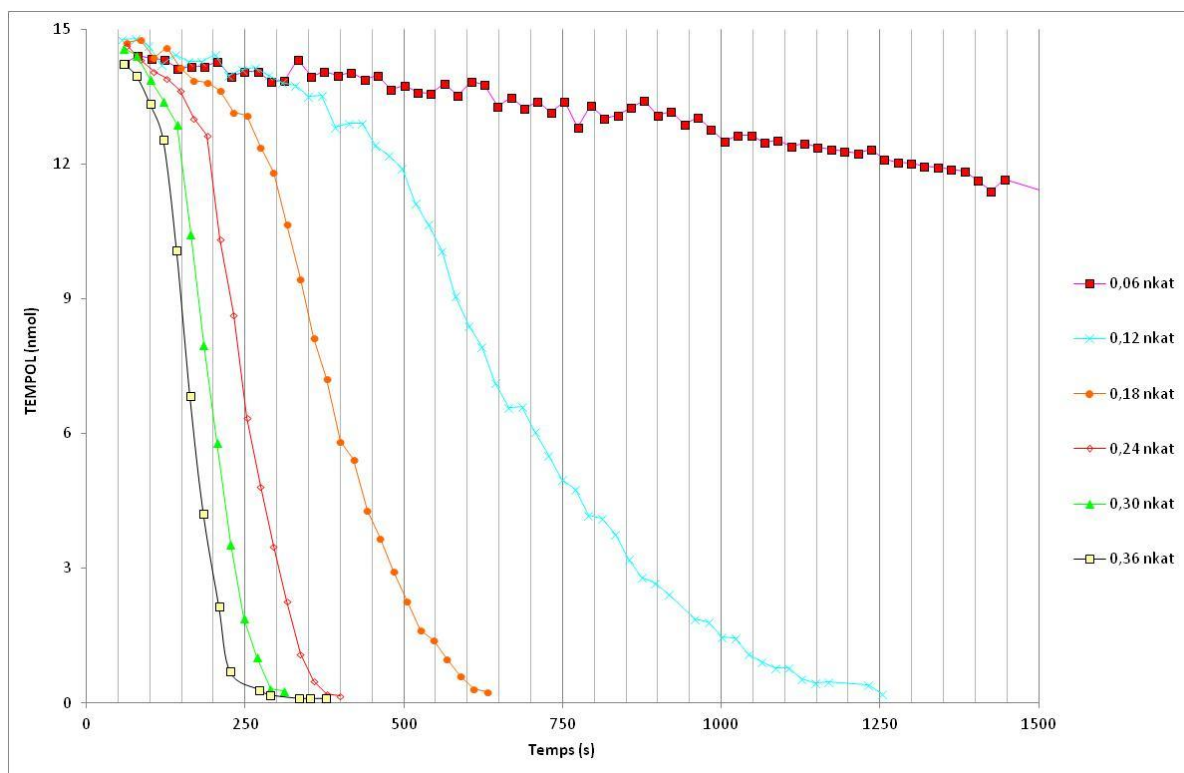


Figure 48 : Effet de la quantité d'enzyme sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.
(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; TEMPOL 30 μ M ; LOX soja entre 0,06 et 0,36 nkat.)

Les valeurs de la durée de la première phase et de la vitesse de la deuxième phase sont reportées dans le Tableau XII.

Tableau XII : Effet de la quantité d'enzyme sur la durée de la première phase et sur la vitesse de consommation du TEMPOL pendant la deuxième phase.
(Les conditions sont celles décrites dans la légende de la Figure 48).

Quantité de LOX (nkat)	Durée de la première phase (s)	Vitesse de la deuxième phase (nmol.s ⁻¹)
0,36	115 - 120	0,12 – 0,115
0,30	140 - 140	0,107 – 0,101
0,24	170 - 180	0,075 – 0,081
0,18	270 – 260	0,048 – 0,043
0,12	455 – 465	0,029- 0,026
0,06	1080	0,003

Lorsque l'évolution de l'inverse de la durée de la première phase (Figure 49A) et celle de la vitesse de la deuxième phase (Figure 49B) sont portées en fonction de la quantité de lipoxygénase ajoutée, une relation linéaire est obtenue dans les deux cas, au-delà de 0,05 nkat dans le premier cas et de 0,02 nkat dans le second. A titre de rappel, dans la Figure 49B, l'influence de la quantité d'enzyme sur la vitesse de la réaction anaérobie est également présentée.

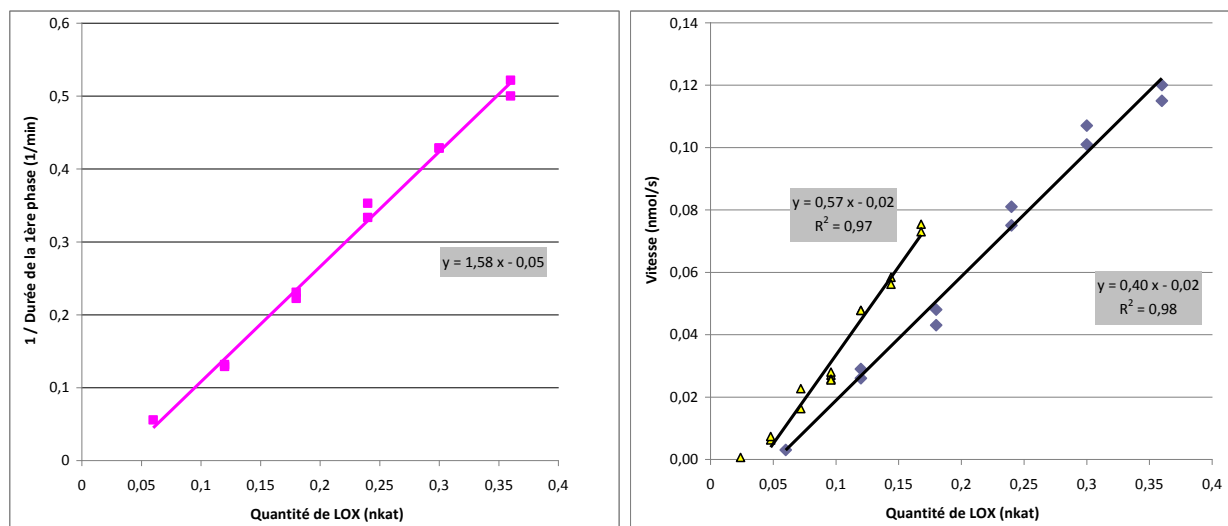


Figure 49 : (A) Effet de la quantité d'enzyme sur l'inverse de la durée de la première phase de la réaction aérobie et (B) sur la vitesse de la consommation du TEMPOL dans la deuxième phase de la réaction aérobie (◇) et dans la réaction anaérobie (Δ) de la lipoxygénase de soja à pH 9. (0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; TEMPOL 30 μ M ; 13-LOOH 0,25 mM (milieu anaérobie) ; LOX soja entre 0,06 et 0,36 nkat.)

En admettant que la deuxième phase de la réaction aérobie débute avec la mise en place de l'anaérobie, il apparaît sur cette figure que pour une même quantité d'enzyme ajoutée, la vitesse de la réaction anaérobie est supérieure de près de 40 % à celle de la deuxième phase de la réaction aérobie (le rapport des pentes des 2 droites 0,57 / 0,40 est égal à 1,425). Deux raisons, au moins, peuvent expliquer cet écart. La première tient aux différences de concentration en substrat réducteur. En effet, si les concentrations en substrat oxydant (13-hydroperoxyde) sont proches (0,22 mM au lieu de 0,25 mM), celles en substrat réducteur (acide linoléique) sont plus faibles au début de la deuxième phase de la réaction aérobie (0,78 mM) qu'au début de la réaction anaérobie (1 mM). La seconde peut résulter d'une dénaturation partielle de l'activité lipoxygénasique pendant la première phase de la réaction aérobie et donc à une activité résiduelle plus faible au début de la deuxième phase de la réaction aérobie que celle utilisée lors de l'étude en anaérobie.

III.2.3.1.2. Effet de la quantité d'enzyme sur la consommation d'oxygène en milieu aérobie

A l'issue de cette série d'expérimentations et pour vérifier l'hypothèse du début, il convient de déterminer la cinétique de consommation de l'oxygène dans la cellule RPE. Pour cela, nous avons utilisé une sonde à oxygène permettant de mesurer la concentration en oxygène dissous dans un tube Eppendorf fermé dans lequel la réaction aérobie catalysée par la lipoxygénase de soja se déroule dans des conditions aussi proches que possible de celles de la cellule RPE. Après ajout de l'enzyme, le tube Eppendorf choisi contenant 1 mL d'une solution d'acide linoléique (1 mM dans le tampon borate à pH 9) était fermé, « vortexé » puis positionné pour mesurer en continu l'évolution de la concentration en oxygène dissous. Ainsi, comme dans la cellule RPE, la réaction se poursuivait dans un milieu confiné et non agité.

Les courbes de consommation d'oxygène obtenues lorsque les quantités de lipoxygénase ajoutées variaient de 2 à 12 μg (dans un volume total de 1 mL, soit l'équivalent de 0,06 à 0,36 nkat d'enzyme dans un volume total de 0,5 mL) sont montrées dans la Figure 50.

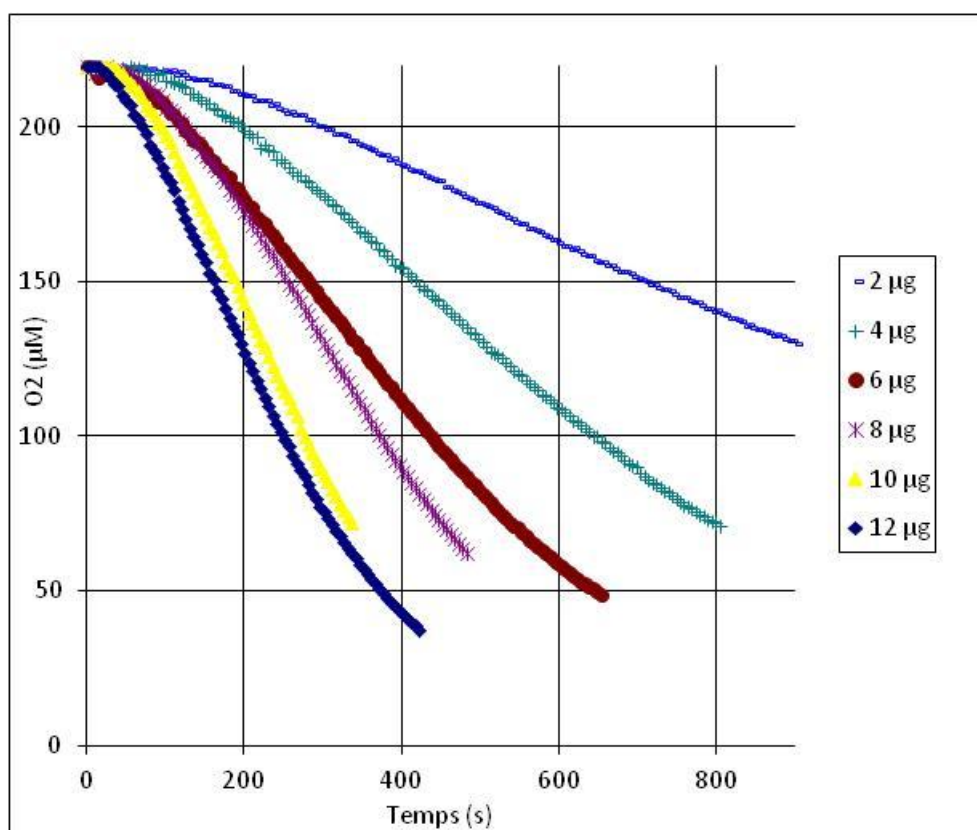


Figure 50 : Effet de la quantité de lipoxygénase de soja sur la consommation d'oxygène à pH 9. (1 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; TEMPOL 30 μM ; LOX soja entre 2 et 12 μg .)

La vitesse maximale de consommation d'oxygène est bien proportionnelle à la quantité d'oxygène consommée (Figure 51), cependant la vitesse maximale n'est atteinte qu'après une

durée variant de 2 à 5 minutes. Ceci est probablement lié à l'absence d'agitation pendant la mesure. Néanmoins, si l'on admet que les concentrations en oxygène évoluent de la même manière dans le tube Eppendorf et dans la cellule RPE, les Figures 50 (consommation d'oxygène) et 48 (consommation du TEMPOL) montrent que, pour des concentrations équivalentes en lipoxigénase, le début de la deuxième phase de consommation du TEMPOL (phase rapide) se produit bien avant que l'oxygène ne soit consommé en totalité donc bien avant l'anaérobiose.

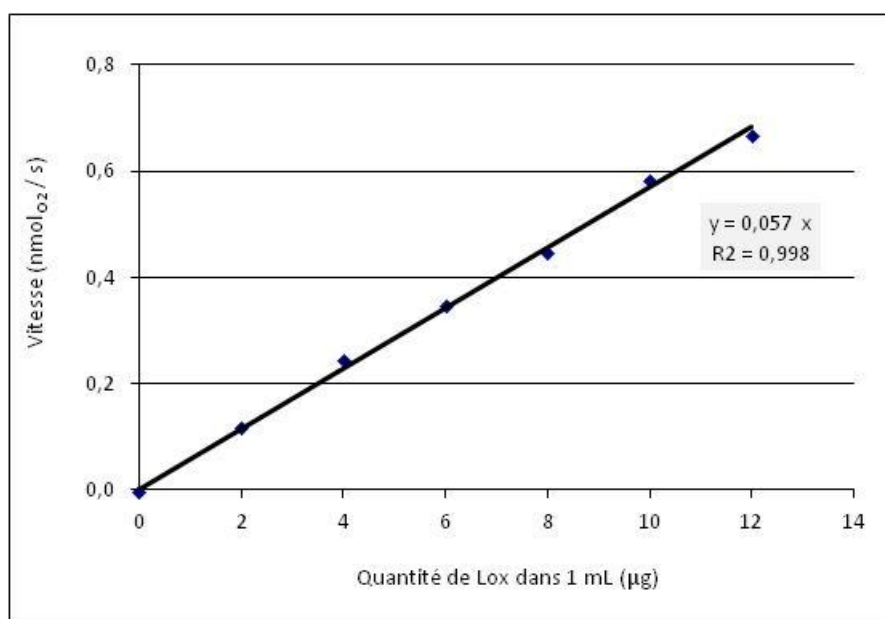


Figure 51 : Relation entre la quantité de lipoxigénase de soja et la vitesse maximale de consommation d'oxygène à pH 9
(1 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; TEMPOL 30 µM ; LOX soja entre 2 et 12 µg.)

Ainsi pour les quantités les plus élevées en enzyme (entre 0,24 et 0,36 nkat), la concentration résiduelle en oxygène est proche de 175 µM (soit une consommation de seulement 20 % de l'oxygène disponible) au moment de l'accélération de la consommation du TEMPOL. Pour des quantités plus faibles de lipoxigénase ajoutée, la concentration résiduelle en oxygène à la rupture de pente diminue jusqu'à 115 µM (soit près de la moitié de l'oxygène disponible).

III.2.3.1.3. Effet des concentrations en substrat (acide linoléique et oxygène)

L'étude de l'effet de la concentration en acide linoléique permet d'observer, comme attendu, une diminution de la vitesse de consommation d'oxygène quand la concentration en acide linoléique est diminuée de 1 à 0,25mM (Figure 52).

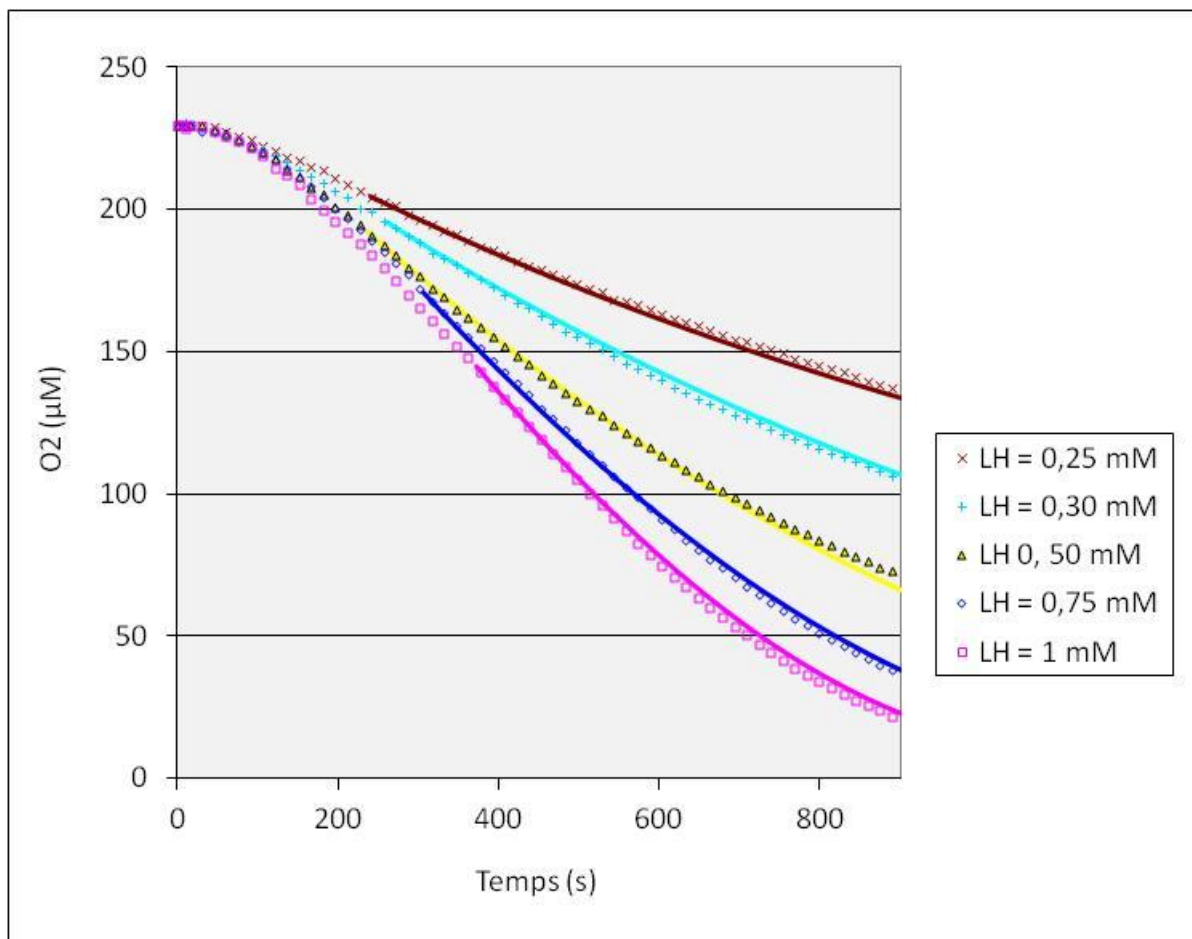


Figure 52 : Influence de la concentration en acide linoléique ajouté sur la consommation de l'oxygène pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9. (1 mL de tampon borate pH 9 ; LH de 0,25 à 1 mM ; TEMPOL 30 μ M ; LOX soja 0,48 nkat. Les points représentent les valeurs expérimentales, les courbes en trait plein ont été tracées à partir des valeurs calculées en utilisant les constantes cinétiques données dans le Tableau XIII.)

Comme dans le cas précédent, l'obtention de la vitesse maximale n'est pas immédiate. Une fois celle-ci atteinte, il est possible pour une concentration constante en oxygène, de tracer l'inverse de la vitesse instantanée en fonction de l'inverse de la concentration en acide linoléique. La droite obtenue permet de déterminer le K_{mapp} vis-à-vis de l'acide linoléique ainsi que le V_{mapp} pour cette concentration en oxygène. Lorsque cette détermination est répétée pour d'autres concentrations en oxygène, une série de droites est obtenue qui se coupent en un point unique (Figure 53).

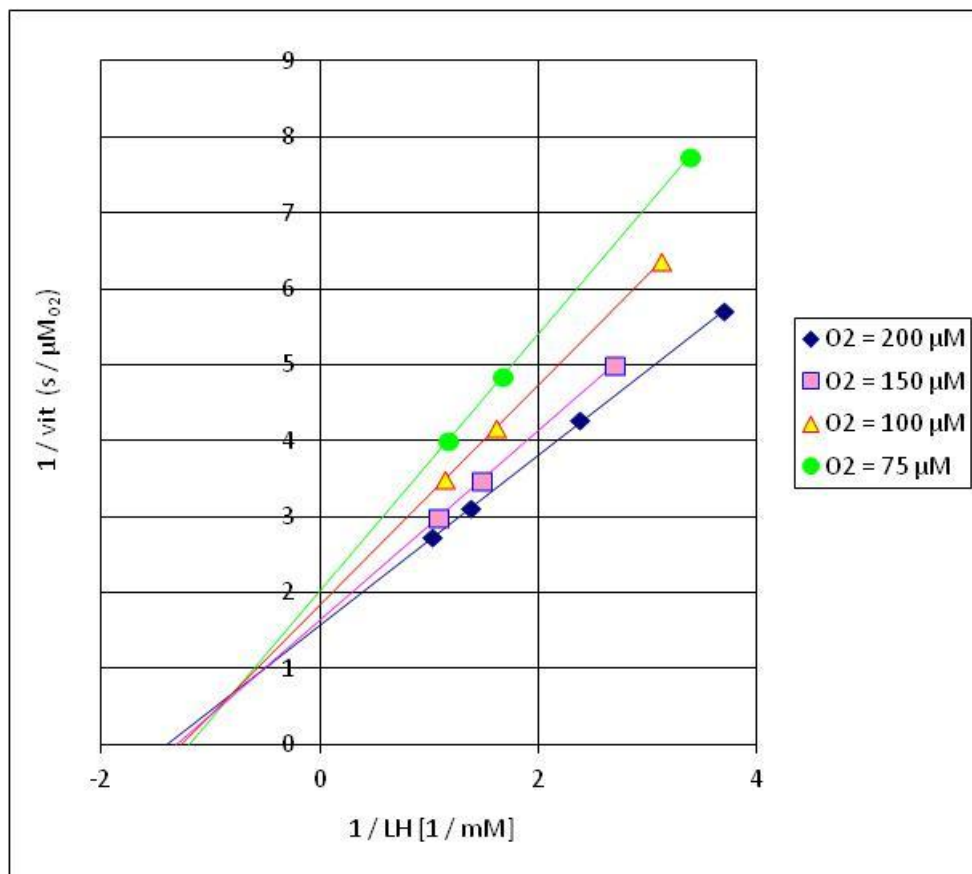


Figure 53 : Représentation en double inverse des vitesses instantanées des réactions en fonction des concentrations en acide linoléique à différentes concentrations en oxygène. (Les points représentent les valeurs expérimentales, les droites en trait plein ont été tracées à partir des valeurs calculées en utilisant les constantes cinétiques données dans le Tableau XIII.)

En accord avec des résultats obtenus précédemment (ROBINSON *et al.*, 1995), ceci traduit un mécanisme séquentiel ordonné dans lequel l'enzyme fixe d'abord l'acide linoléique, puis fixe l'oxygène avant de former l'hydroperoxyde selon le schéma reproduit dans la Figure 54.

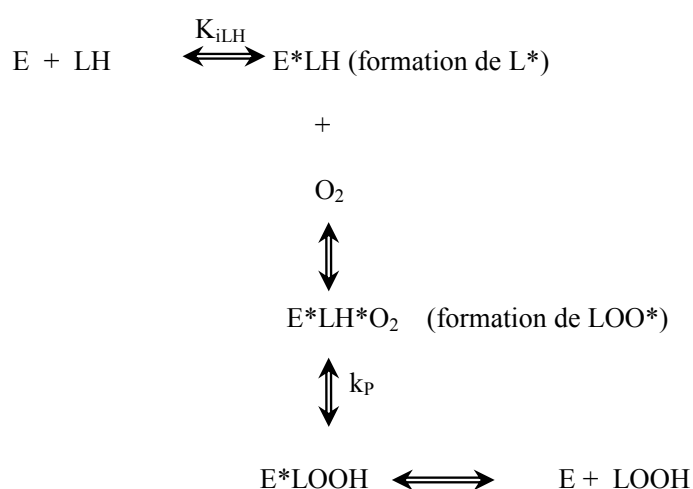


Figure 54 : Mécanisme aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9 (*E* = lipoxygénase, *LH* = acide linoléique, *LOOH* = hydroperoxyde).

Pour ce type de mécanisme, la relation liant les concentrations en substrats avec la vitesse de la réaction est donnée par l'équation (2) reproduite ci-dessous (SEGEL, 1975) :

$$v = V_m \frac{[LH] [O_2]}{K_{iLH} K_{mO_2} + K_{mLH} [O_2] + K_{mO_2} [LH] + [LH] [O_2]} \quad (2)$$

Avec :

v = vitesse de la réaction

$[LH]$ = Concentration en acide linoléique

$[O_2]$ = Concentration en oxygène

K_{iLH} = Constante d'équilibre entre l'enzyme et l'acide linoléique (constante d'affinité)

K_{mO_2} = Valeur du K_m vis-à-vis de l'oxygène quand LH est saturant

K_{mLH} = Valeur du K_m vis-à-vis de LH quand l'oxygène est saturant

V_m = Vitesse maximale de la réaction (enzyme saturée par ses deux substrats)

Deux graphes secondaires portant l'inverse du V_{mapp} d'une part et la pente des droites du graphe primaire d'autre part, en fonction de l'inverse de la concentration en oxygène (Figure 55) permet de déterminer les valeurs des constantes cinétiques de l'équation (2).

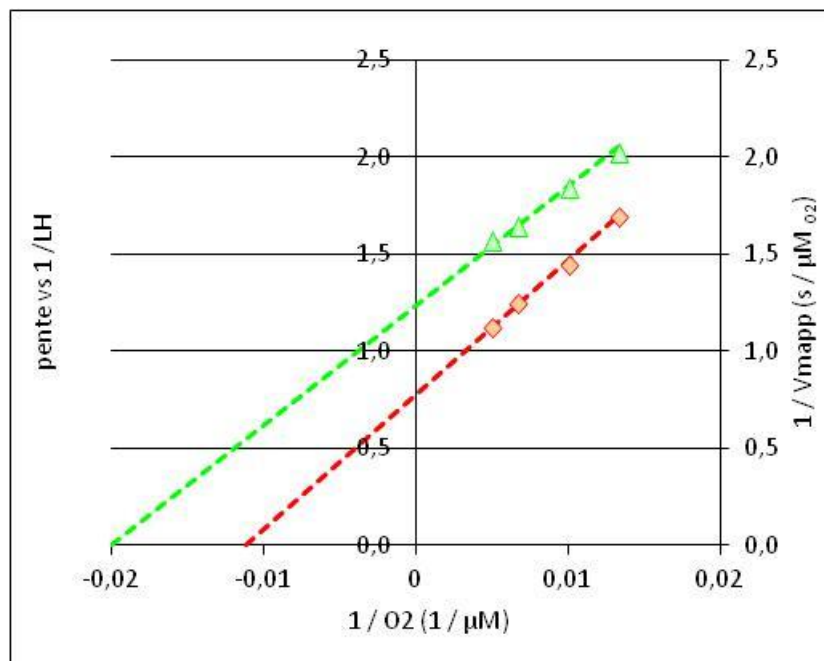


Figure 55 : Graphes secondaires donnant $1 / V_{mapp}$ (Δ) d'une part et la pente (◇) d'autre part en fonction de l'inverse de la concentration en oxygène.

(Les droites en trait pointillé ($1 / V_{mapp}$) et trait plein (pente) ont été tracées à partir des valeurs calculées de ces paramètres en utilisant les constantes cinétiques données dans le Tableau XIII.)

Les valeurs des paramètres cinétiques ainsi déterminés après ajout de 0,48 nkat de lipoxygénase de soja dans un volume total de 1 mL de tampon borate à pH 9, sont regroupées dans le Tableau XIII.

Tableau XIII : Paramètres cinétiques de la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja en solution dans un tampon borate à pH 9.

V_m (nkat) (nmol_{oxygène} · s⁻¹)	K_{iLH} (mM)	K_{mLH} (mM)	K_{mO_2} (mM)
0,8	1,125	0,625	0,05

Cependant, deux facteurs peuvent fausser cette analyse.

Le premier tient au protocole utilisé pour la mesure. En effet, la teneur en oxygène est mesurée dans un tube Eppendorf partiellement rempli de liquide. Même lorsque le tube est fermé, pour les faibles activités et les temps longs, il est possible que de l'oxygène contenu dans la phase gazeuse se dissolve dans la phase liquide où se produit la réaction enzymatique.

Le second facteur peut résulter d'une dénaturation partielle de l'enzyme ce qui implique que les vitesses instantanées ne sont pas toutes mesurées pour la même quantité d'enzyme (au même V_m).

Ces deux facteurs peuvent conduire à une sous estimation des valeurs mesurées par rapport aux valeurs réelles notamment aux faibles concentrations en oxygène ce qui induit une sous estimation du V_m et une surestimation des valeurs de K_m .

L'influence de la concentration en acide linoléique sur la consommation du TEMPOL a été étudiée entre 0,25 et 1,25 mM (Figure 56).

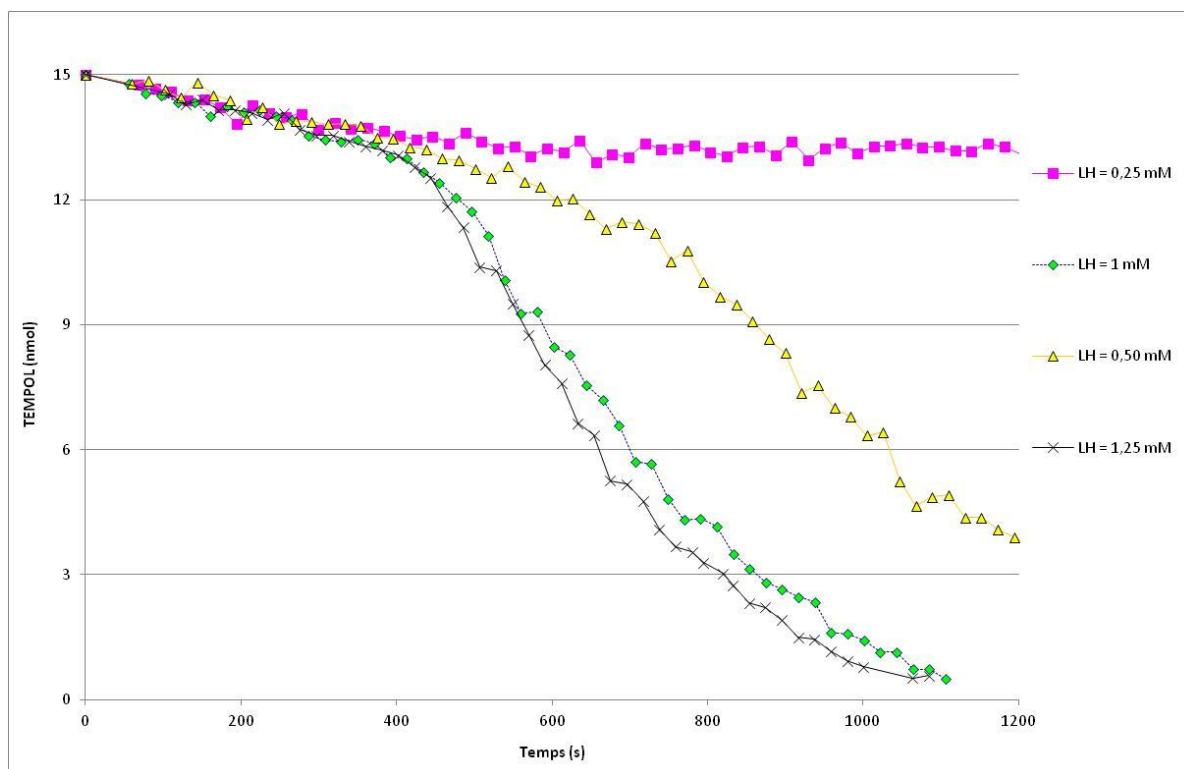


Figure 56 : Influence de la concentration en acide linoléique ajouté sur la consommation de l'oxygène pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9.
(0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH de 0,25 à 1,25 mM ; TEMPOL 30 μ M, LOX soja 0,24 nkat.)

Pour ces concentrations, la rupture de pente est d'autant plus précoce que la concentration en acide linoléique est élevée. De plus, la vitesse de consommation du TEMPOL dans la deuxième phase est d'autant plus élevée que la rupture de pente est précoce. En comparant avec les cinétiques de consommation d'oxygène dans des conditions similaires (dans le tube Eppendorf), les teneurs résiduelles en oxygène sont proches de 180 μ M pour les concentrations de 1 et 1,25 mM en acide linoléique et de 140 μ M pour 0,5 mM en acide linoléique. La plus faible vitesse constatée dans ce dernier cas pourrait être due à une concentration résiduelle en acide linoléique (substrat réducteur de l'enzyme) nettement plus faible ($0,5 - 0,08 = 0,42$ mM) comparée aux deux premiers cas (soit 0,96 et 1,21 mM respectivement).

III.2.3.1.4. Effet de l'ajout d'éthanol

Avec 0,12 nkat d'enzyme, l'ajout d'éthanol jusqu'à 5 % provoque une légère augmentation de la durée de la première phase et une diminution de la vitesse de la deuxième phase (résultats non montrés). Il est probable que cela résulte d'une dénaturation plus précoce d'une fraction de l'enzyme puisqu'avec 0,24 nkat d'enzyme, l'effet est nettement moins marqué, voire inexistant. Néanmoins, il paraît souhaitable de maintenir constante la

concentration en éthanol lors de l'ajout de solutions éthanoliques contenant les réactants dont la concentration initiale doit varier (le 13-hydroperoxyde et l'acide linoléique).

III.2.3.1.5. Effet de l'ajout de BHT

L'ajout de BHT (30 μ M) provoque l'allongement de la durée de la première phase (de près de 50 %) ainsi qu'une nette diminution des vitesses de consommation du TEMPOL dans les première et deuxième phases (Figure 57).

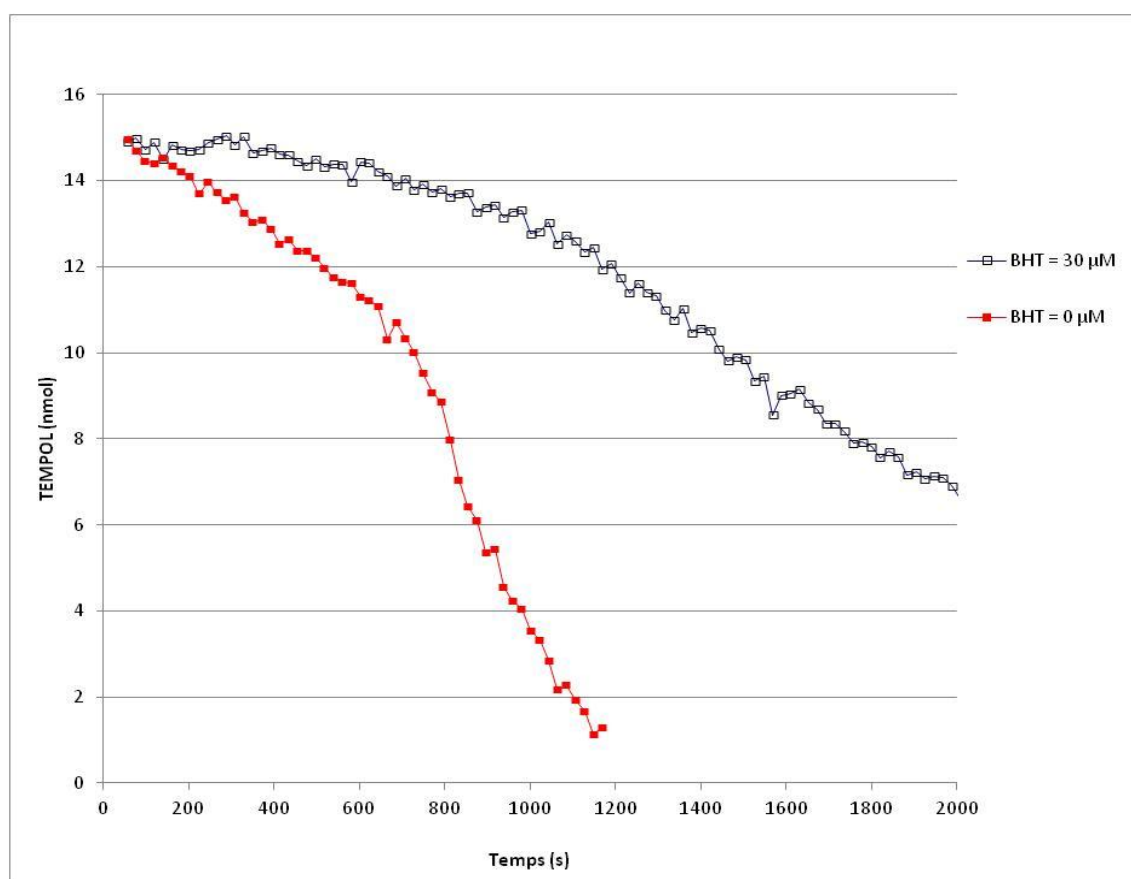


Figure 57 : Effet de l'ajout de BHT sur la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9. (0,5 mL de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; TEMPOL 30 μ M ; BHT 0 ou 30 μ M ; LOX soja 0,12 nkat).

Lors des mesures de consommation d'oxygène dans des conditions similaires, cette même concentration de BHT provoquait une légère diminution de la vitesse maximale de consommation de l'oxygène (près de 15 %) alors qu'il est sans effet lorsqu'il est ajouté seul sans TEMPOL (rappelons que le TEMPOL 30 μ M est également sans effet sur la vitesse de la réaction aérobie la lipoxygénase de soja à pH 9).

A ce stade, il apparaît difficile de déterminer avec précision quels sont les paramètres (ou la combinaison de paramètres) qui déclenchent l'apparition de la deuxième phase de

consommation du TEMPOL : concentration en acide linoléique, concentration en 13-hydroperoxyde (13-LOOH), concentration en oxygène et / ou activité enzymatique. Dans une étude préliminaire, nous avons fait varier la quantité initialement ajoutée de 13-LOOH de 0 à 0,25 mM avec deux quantités d'enzyme. Si dans tous les cas, l'ajout de 13-LOOH provoque une diminution de la vitesse de consommation du TEMPOL dans la première phase, les autres effets observés sont contradictoires en fonction de la quantité d'enzyme. Ainsi avec 0,12 nkat d'enzyme, l'ajout de 0,12 mM de 13-LOOH provoque une apparition plus précoce de la deuxième phase alors qu'avec 0,25 mM ajoutée, l'effet est contraire puisque l'apparition est plus tardive tandis qu'avec 0,24 nkat d'enzyme, l'ajout de 0,12 ou 0,25 mM de 13-LOOH provoque une apparition plus précoce. De même, par rapport aux cinétiques en absence de 13-LOOH ajouté, l'ajout de 13-LOOH conduit à une diminution de la vitesse de la deuxième phase avec 0,12 nkat d'enzyme alors que le contraire est observé avec 0,24 nkat d'enzyme. Une explication plausible pourrait être une dénaturation partielle de l'enzyme pendant la première phase, cette dénaturation ayant un impact beaucoup plus important quand l'activité enzymatique initialement présente est faible.

Quoiqu'il en soit, une étude systématique devrait être engagée en faisant varier les quantités initiales des différents substrats (LH, LOOH et O₂) ainsi que des quantités d'enzyme pour déterminer les conditions d'apparition de la deuxième phase de la consommation du TEMPOL dans la réaction aérobie catalysée par la lipoxygénase de soja à pH 9.

III.2.3.2. Lipoxygénases à pH 6,5

Le suivi de la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie a également été effectué avec les autres lipoxygénases (blé, fève et soja) à pH 6,5. Le résultat est présenté dans la Figure 58.

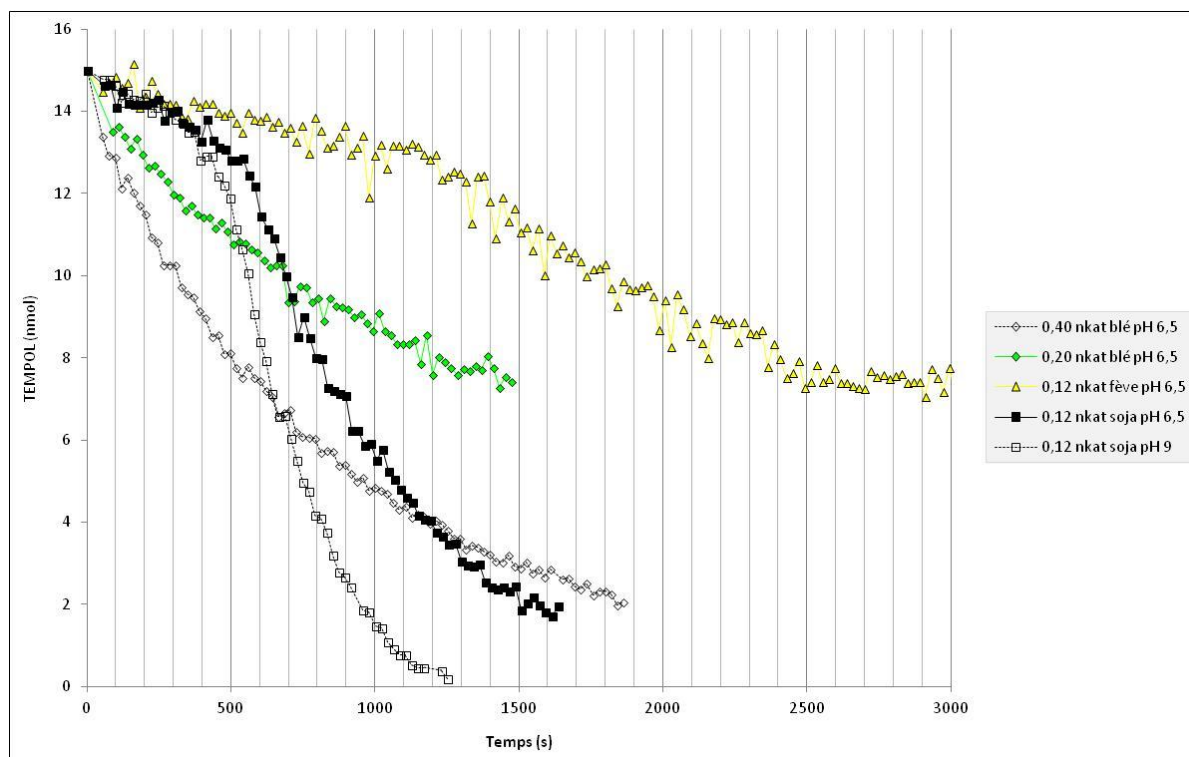


Figure 58 : Suivi de la consommation du TEMPOL pendant la réaction aérobie des lipoxygénases de blé, fève et soja à pH 6,5 et de la lipoxygénase de soja à pH 9.

(0,5 mL de substrat « RM4 » à pH 6,5 ou de tampon borate pH 9 ; LH 1 mM ; TEMPOL 30 μ M ; LOX blé 0,2 et 0,4 nkat ; autres LOX 0,12 nkat.)

Comparés à celui de la lipoxygénase de soja à pH 9, les comportements des autres lipoxygénases sont nettement différents. Ainsi, les lipoxygénases de soja et de fève à pH 6,5 présentent aussi une cinétique en deux phases, une phase lente suivie d'une phase plus rapide mais pour une même activité de consommation d'oxygène, les durées de la première phase sont plus longues de 35 % pour le soja et plus que doublées pour celle de la fève. De même, la vitesse de la deuxième phase est diminuée de 40 % pour le soja et de près de 90 % pour la fève.

En quantité de TEMPOL consommé pendant la première phase, les valeurs sont très proches représentant environ 20 % du TEMPOL présent initialement.

En ce qui concerne la lipoxygénase du blé à pH 6,5, la cinétique de consommation du TEMPOL démarre immédiatement. Pour les deux quantités de lipoxygénase testées, la vitesse maximale de consommation du TEMPOL est proportionnelle aux quantités ajoutées. Pour une activité de consommation d'oxygène ajoutée (0,2 nkat) près de 2 fois plus forte que celle du soja à pH 9 (0,12 nkat), la vitesse de consommation du TEMPOL est 4 fois plus faible avec la lipoxygénase de blé ($0,0064 \text{ nmol de TEMPOL} \cdot \text{s}^{-1}$) que celle observée dans la deuxième phase de la réaction catalysée par la lipoxygénase de soja à pH 9 ($0,025 \text{ nmol de TEMPOL} \cdot \text{s}^{-1}$).

Le Tableau XIV regroupe l'ensemble des relations entre les vitesses de consommation de l'oxygène et celles de consommation du TEMPOL pendant les réactions aérobie et anaérobie, et permet de comparer les différentes lipoxygénases testées à pH 6,5 et à pH 9.

Tableau XIV : Relations entre les vitesses de consommation d'oxygène v_{O_2} (réaction aérobie) et les vitesses de consommation du TEMPOL v_{TEMPOL} pendant la réaction anaérobie et pendant la réaction aérobie (deuxième phase) pour les lipoxygénases de soja, blé et fève à pH 6,5 et pour la lipoxygénase de soja à pH 9.

	Anaérobie		Aérobie		
		Ratio TEMPOL/ O_2	v_{TEMPOL}	v_{O_2}	Ratio TEMPOL/ O_2
Soja pH 6,5	$v_{TEMPOL} = 0,42 \cdot v_{O_2} - 0,005$	0,42	0,015	0,12	0,125
Fève pH 6,5	$v_{TEMPOL} = 0,69 \cdot v_{O_2} - 0,01$	0,69	0,0029	0,12	0,024
Blé pH 6,5	$v_{TEMPOL} = 0,022 \cdot v_{O_2}$	0,022	0,0064 0,0107	0,2 0,4	0,032 0,027
Soja pH 9	$v_{TEMPOL} = 0,54 \cdot v_{O_2} - 0,02$	0,54	$v_{TEMPOL} = 0,40 \cdot v_{O_2} - 0,02$		0,40

Ainsi que cela avait été dit précédemment en ce qui concerne la réaction anaérobie, pour une même activité de consommation d'oxygène, les lipoxygénases de soja (pH 9 et pH 6,5) et de fève (pH 6,5) ont une efficacité proche pour la consommation du TEMPOL. En effet, le ratio TEMPOL / O_2 est compris entre 0,42 et 0,69 alors que celle du blé est très peu efficace (ratio égal à 0,022). Il est probable que l'utilisation du 9-hydroperoxyde comme substrat oxydant dans la réaction anaérobie en lieu et place du 13-hydroperoxyde améliorerait le ratio TEMPOL / O_2 pour cette enzyme.

En ce qui concerne la réaction aérobie et pour une même activité de consommation d'oxygène, la lipoxygénase de soja apparaît près de 3 fois plus efficace à pH 9 qu'à pH 6,5 dans la consommation du TEMPOL pendant la deuxième phase de la réaction. En comparaison, les lipoxygénases de fève et de blé sont très peu efficaces (près de 15 fois moins efficaces que la lipoxygénase de soja à pH 9). Dans le cas de la lipoxygénase de fève, il est possible que la forte inhibition de la consommation d'oxygène provoquée par le TEMPOL soit (au moins en partie) responsable de l'inefficacité de cette enzyme. Cette explication ne tient pas pour l'enzyme du blé car le TEMPOL n'a pas d'effet inhibiteur sur la consommation d'oxygène lors de la réaction

aérobie catalysée par la lipoxygénase de blé. De plus, le comportement de cette dernière est très différent de celui des autres lipoxygénases puisque la cinétique de consommation du TEMPOL ne présente qu'une seule phase pendant la réaction aérobie. Des études supplémentaires doivent être effectuées pour expliquer ces différences de comportement entre les lipoxygénases.

Un ensemble de travaux, comprenant des manipulations parallèles en RPE et en HPLC / MS, devrait permettre de mieux préciser, lors des réactions d'oxydation de l'acide linoléique débutant en présence d'oxygène, quelles sont les formes radicalaires les plus réactives pour participer aux réactions de terminaison impliquant la disparition du TEMPOL.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'oxydation des lipides affecte la valeur nutritionnelle et les propriétés sensorielles et fonctionnelles des aliments. Cela conduit au rancissement dont la perception est due aux produits résultant de la décomposition des hydroperoxydes, produits primaires de l'oxydation des lipides. De nombreuses méthodes sont proposées pour suivre l'oxydation des lipides et l'efficacité de composés antioxydants. Cependant, aucune de ces méthodes n'est totalement satisfaisante pour prédire l'avancement des réactions lors de l'élaboration et la conservation des produits alimentaires. Ceci est probablement lié au fait que peu de méthodes permettent d'étudier la réactivité des radicaux libres lipidiques qui sont les intermédiaires clés de l'oxydation des lipides. A partir d'un lipide symbolisé par LH, les radicaux susceptibles de s'accumuler pendant la phase initiale sont les formes $L^\bullet$, $LOO^\bullet$ et $LO^\bullet$. La lipoxygénase permet de générer ces 3 formes radicalaires suivant qu'elle catalyse la réaction aérobie (en présence d'oxygène) ou la réaction anaérobie (en présence d'hydroperoxyde) d'oxydation des acides gras polyinsaturés. L'objectif de notre travail était d'utiliser cette enzyme pour produire à une vitesse connue et facilement modulable ces radicaux libres. La réaction enzymatique était suivie par Résonance Paramagnétique Electronique en présence d'une molécule susceptible de réagir avec les radicaux libres par des réactions de propagation et / ou de terminaison. Cet ensemble devrait permettre à terme de déterminer les constantes de vitesse des réactions entre les radicaux lipidiques et les molécules présentes dans l'environnement afin d'acquérir une meilleure connaissance des réactions de co-oxydation de composés réducteurs (composés phénoliques, composés thiols et vitamines antioxydantes notamment).

Le POBN, utilisé comme piègeur de radicaux pour nos premières expérimentations, a permis de mener en parallèle des études par spectroscopie UV et par RPE. Par spectroscopie UV, il a été mis en évidence l'importance de la teneur en oxygène dans le milieu : la réaction du POBN avec les radicaux lipidiques est quasiment inexistante en présence d'oxygène. La RPE a conforté ces résultats en montrant que les adduits radicalaires générés par l'oxydation de l'acide linoléique sont directement liés à la quantité d'hydroperoxydes présents dans le milieu. Cependant, la concentration en POBN utilisée est beaucoup plus forte en RPE qu'en UV ce qui rend difficile la comparaison directe des résultats obtenus par ces 2 méthodes. De plus, le bilan de piégeage du POBN est très mauvais et seule une très faible fraction de POBN donne naissance à des adduits avec les radicaux lipidiques. Ceci accroît la difficulté de l'analyse de ces derniers par HPLC-DAD et HPLC-MS, analyse essentielle pour établir des cinétiques

réactionnelles pour les différents radicaux lipidiques. Ces raisons ont conduit au changement de piègeur de radicaux libres.

Le TEMPOL, qui est un piègeur plus réactif que le POBN, a donc été utilisé pour la suite des travaux. Il a pu être utilisé à des concentrations bien inférieures que celles utilisées pour le POBN grâce à sa plus forte réactivité. De nombreux résultats ont ainsi pu être obtenus.

La vitesse de consommation du TEMPOL est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme utilisée. En faisant varier les concentrations initiales en acide linoléique et 13-hydroperoxyde, un mécanisme séquentiel au hasard de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja à pH 9 a été établi. En supposant que les vitesses de réaction entre radicaux lipidiques et TEMPOL sont beaucoup plus rapides que celle de la réaction enzymatique, les paramètres cinétiques de cette dernière ont été déterminés (K_m vis-à-vis des substrats et V_m). La stœchiométrie de la réaction entre le TEMPOL et les deux substrats de la réaction anaérobie de la lipoxygénase de soja a également été établie. Elle est de 2 moles de TEMPOL consommées pour une mole d'acide linoléique (LH) et une mole de 13-hydroperoxyde (LOOH) en accord avec la formation d'une mole de $L^\bullet$ et une mole de $LO^\bullet$ pour la consommation d'une mole de LH et d'une mole de LOOH. Toujours en anaérobiose, le mode d'inhibition d'antioxydants phénoliques a été établi et les constantes d'inhibition ont pu être déterminées.

A partir de là, les expérimentations ont été étendues à l'étude des lipoxygénases de soja, de fève et de blé à pH 6,5, toujours en anaérobiose. Les résultats ont pu mettre en évidence des différences notables des réponses obtenues en RPE. Pour une même vitesse de consommation d'oxygène, les lipoxygénases de soja (à pH 9 et 6,5) et de fève (à pH 6,5) consomment beaucoup plus de TEMPOL que celle de blé (à pH 6,5). Ceci est probablement lié à la nature du substrat oxydant utilisé (le 13-hydroperoxyde) puisque contrairement aux lipoxygénases de soja et de fève, celle de blé n'en produit pratiquement pas.

L'extension de l'étude à la phase aérobie a amené à l'obtention d'une cinétique à double pente (une phase lente suivie d'une phase rapide) pour la lipoxygénase de soja à pH 9. Des expérimentations en parallèle utilisant une sonde à oxygène ont montré que le début de la deuxième phase de consommation du TEMPOL se produit bien avant que l'oxygène ne soit consommé en totalité donc bien avant l'anaérobiose. La formation d'adduits est donc possible en aérobie. Par ailleurs, les vitesses des première et deuxième phases sont proportionnelles aux quantités d'enzyme mises en œuvre.

A partir des mesures de consommation d'oxygène pour différentes concentrations en acide linoléique, le mécanisme de la lipoxygénase de soja à pH 9 a pu être confirmé en aérobie :

il s'agit d'un mécanisme séquentiel ordonné dont les paramètres cinétiques ont été déterminés (K_m vis-à-vis des substrats et V_m).

Les lipoxygénases de soja, de fève et de blé ont également été étudiées à pH 6,5 et en aérobie. De nettes différences de réponses RPE sont apparues. Ainsi si les cinétiques de consommation du TEMPOL comportent toujours une double pente avec les lipoxygénases de soja et de fève, celle du blé ne comporte plus qu'une seule pente. De plus, au cours de la consommation rapide du TEMPOL et à vitesse équivalente de consommation de l'oxygène, la lipoxygénase de soja à pH 6,5 consomme beaucoup plus rapidement le TEMPOL que les lipoxygénases de fève et de blé (mais moins rapidement qu'à pH 9). Des études supplémentaires doivent être effectuées pour expliquer ces différences de comportement entre les lipoxygénases.

Pour approfondir ces connaissances, d'autres expérimentations seraient intéressantes à effectuer. Pour la réaction aérobie catalysée par la lipoxygénase de soja à pH 9, une étude devrait être faite en faisant varier les quantités initiales des différents substrats (acide linoléique, hydroperoxydes, et oxygène) ainsi que des quantités d'enzyme pour déterminer les conditions d'apparition de la deuxième phase de la consommation du TEMPOL.

En outre, un ensemble de travaux, comprenant des expérimentations parallèles en RPE et en HPLC / MS, permettrait de préciser les formes radicalaires qui produisent des adduits avec le TEMPOL, participant ainsi à sa disparition. Ces travaux seraient à réaliser lors des réactions d'oxydation de l'acide linoléique débutant en présence ou en absence d'oxygène. Dans ce sens, des études sont en cours dans le cadre de l'AIC-RPE et seront présentées dans un document ultérieur.

Après identification et quantification des adduits, il sera possible de modéliser les systèmes en aérobie et en anaérobie. Une ébauche de modélisation est présentée en annexe.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADDOK, BURTON D., STUART M.R., BURTON H.R., HILDEBRAND D. F., 1993. Soybean flour lipoxygenase isoenzyme mutant effects on bread dough volatiles. *J. Food Sci.*, **58**, 583-608.
- AFNOR ISO 15304:2002 mars 2002. Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de la teneur en isomères *trans* d'acides gras de corps gras d'origine végétale - Méthode par chromatographie en phase gazeuse.
- AFNOR NF EN ISO 3656 avril 2011. Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de l'absorbance dans l'ultraviolet, exprimée sous la forme d'extinction spécifique en lumière ultraviolette.
- AKASAKA K., OHIRUI H., 2000. Development of phosphine reagents for high-performance liquid chromatographic-fluorometric determination of lipid hydroperoxides. *J. Chromatogr.*, **881**, 159-170.
- ALAIS C., LINDEN G., MICLO L., 2008. Lipides. In *Biochimie alimentaire. 6^e édition de l'abrégé*. Dunod, Paris, 52-72.
- ALBRO P.W., KNECHT K.T., SCHROEDER J.L., CORBETT J.T., MARBURY D., COLLINS B.J., CHARLES J., 1992. Isolation and characterization of the initial radical adduct formed from linoleic acid and α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron in the presence of soybean lipoxygenase. *Chem.-Biol. Interactions*, **82**, 73-89.
- ANDERSEN M.L., OUTTRUP H., SKIBSTED L.H., 2000. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin-trapping. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3106-3111.
- ANDERSEN M.L., SKIBSTED L.H., 2001. Modification of the levels of polyphenols in wort and beer by addition of hexamethylenetetramine or sulfite during mashing. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5232-5237.
- ANDERSEN M.L., VELASCO J., SKIBSTED L.H., 2005. Analysis of Lipids Oxidation by ESR spectroscopy. In *Analysis of Lipid Oxidation*. Afaf Kamal-Eldin, Jan Pokorny (Eds), AOCS, 127-151.
- AOCS official method : 2-Thiobarbituric Acid Value Direct Method. Cd 19-90 (1997).
- AOCS official method : AOM for Oil Stability. Cd 12-57 (1981).
- AOCS official method : Determination of Polar Compounds in Frying Fats. Cd 20-91.
- AOCS Official Method : Oil Stability Index (OSI). Cd 12b-92 (1992).
- AOCS Official Method : Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane Method. Cd 8b-90 (1997).
- ATHERTON N.M., 1993. *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood (Ed), Prentice Hall, London, 585 p.
- AVRAM E., BOUSSARD A., POTUS J., NICOLAS J., 2003. Oxidation of glutathione by purified wheat and soybean lipoxygenases in the presence of linoleic acid at various pH. In *Recent advances in enzymes in grain processing*. Courtin C.C., Veraverbeke W.S., Delcour, J. (Eds). Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, pp 115-120.
- BASAGA H., TEKKAYA C., ACIKEL F., 1997. Antioxydative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensm-Wiss u.-Technol.*, **30**, 105-108.

- BAUER W.J., BADOUD R., LOLIGER J., 2010. Contrôle des denrées alimentaires. In *Science et technologie des aliments. Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés*. Etournaud A. (Ed). Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 565-633.
- BAYSAL T., DEMIRDÖVEN A., 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enz. Micro. Technol.*, **40**, 491-496.
- BERSET C., CUVELIER M.E., 1996. Méthodes d'évaluation de degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des Aliments*, **16**, 219-245.
- BONDET V., CUVELIER M.E., BERSET C., 2000. Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium : focus on linoleic acid peroxidation induced by iron/ascorbic acid system. *JAOCs*, **77**(8), 813-818.
- BONNELLY S., 2000. *Evaluation des propriétés antioxydantes des radicales de malt*. Thèse, Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Massy, 133p.
- BRAND-WILLIAM W., CUVELIER M.E., BERSET C., 1997. Vieillessement des produits extrudés et effet protecteur des antioxydants naturels. In *Agoral*. Lavoisier, Paris, 321-329.
- BRIJS K., COURTIN C.M., GOESAERT H., GEBRUERS K., DELCOUR J.A., SHEWRY P.R., HENRY R.J., NICOLAS J., POTUS J., GARCIA R., DAVIDOU S., 2010. Enzymes and enzyme inhibitors endogenous to wheat. In *Wheat chemistry and technology*. Khan K. and Shewry P.R., Eds, Am Assoc. Cereal Chem. Press, Minneapolis USA, 401-435.
- CASEY J. E., 1997. Lipoxygenases and breadmaking. In *First European symposium on enzymes and grain processing*. Angelino S.A.F., Hamer R.J., van Hartingsveldt W., van der Lugt J.P. (eds), TNO Nutrition and Food Research Institute, The Netherlands, pp 188-194.
- CHEFTEL J.C., CHEFTEL H., BESANÇON P. (2003). In *Introduction à la biochimie et la technologie des aliments*. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.
- CILLARD J., CILLARD P., 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, **1**, 24-29.
- DANIELS N.W.R., RICHMOND J.W., RUSSELL EGGITT P.W., COPPOCK J.B.M., 1968. Studies on the lipid of flour. IV Factors affecting lipid binding in breadmaking. *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 129-136.
- DE GROOT J.J.M.C., VELDINK G.A., VLEGENTHART J.F.G., BOLDINGH J., WEVER R., VAN GELDER B.F., 1975. Demonstration by EPR Spectroscopy of the Functional Role of Iron in Soybean Lipoxygenase-1. *Biochim. Biophys. Acta*, **377**, 71-79.
- DELANGE R.J., GLAZER A.N., 1989. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals : A screen for biologically relevant protective agents. *Anal. Biochem.*, **177**, 300-306.
- DOLESCHALL F., KEMENY Z., RECSEG K., KOVARI K., 2002. A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**(1), 14-18.
- DRAPRON R., UZZAN A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. Nut. Alim.* **22**, 393-436.
- DRAPRON R., BEAUX Y., 1969. Sur l'oxydation des acides gras essentiels par la lipoxygénase (EC 1.13.1.13) en panification et la formation de composés volatils intervenant dans l'arôme du pain. *CR Acad Sci Paris*, **268**, 2598-2601.

- FAUBION J.M., HOSENEY R.C., 1981. Lipoxygenase: Its biochemistry and role in breadmaking. *Cereal Chem.*, **58**, 175-180.
- FINLEY J.W., GIVEN P.J., 1986. Technological necessity of antioxydants in the food industry. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 999-1006.
- FRANKEL E.N., 1993. Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs oxidized vegetable oils. *JAOCs*, **70**(8), 767-772.
- FRAZIER P., 1979. Lipoxygenase action and lipid binding in breadmaking. *Bakers Dig* **53** (Dec):9-16-25.
- GARDNER H.W., 1988. Lipoxygenase pathways in cereals. In *Advances in cereal science and technology*, Pomeranz Y. Ed., Amer. Assoc. Cereal Chem.; St. Paul, vol. 9, pp. 161-215.
- GARSEN G.J., VLEGENTHART J.F.G., BOLDINGH J., 1971. An Anaerobic Reaction Between Lipoxygenase, Linoleic Acid and its Hydroperoxydes. *Biochem. J.*, **122**, 327-332.
- GIUFFRIDA F., DESTAILLATS F., EGART M.H., HUG B., 2007. Activity and thermal stability of antioxidants by differential scanning calorimetry and electron spin resonance spectroscopy. *Food Chem.*, **101**, 1108-1114.
- GRAVELAND A., BOSVELD P., MARSEILLE J.P., 1978. Determination of thiol groups and disulfide bonds in wheat flour and dough. *J Sci. Food Agric.*, **29**, 53-61.
- GRAY J., 1978. Measurement of lipid oxidation : A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **55**(6), 539-546.
- GROSCH W., 1986. Redox systems in dough. In *The chemistry and physics of baking : Materials, processes and products*. Blanchard J.M.V., Frazier, P.J., Galliard, T. (Eds). Royal Soc Chem, London, pp 155-169.
- GUILLAN M.A.D., CABO N., 2002. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, **77**(4), 503-510.
- GUISELLI A., SERAFINI M., NATELLA F., SCACCINI C., 2000. Total antioxydant capacity as a tool to assess redox status : critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 1106-1114.
- HALLIWELL B., 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.*, **13**, 1-32.
- HARTVIGSEN K., HANSEN L.F., LUND P., HOLMER G., 2000. Determination of neutral lipid hydroperoxides by size exclusion HPLC with fluorimetric detection. Application to fish oil enriched mayonnaises during storage. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5842-5849.
- HOSENEY R.C., RAO H., FAUBION J., SIDHU J.S., 1980. Mixograph studies. IV. The mechanism by which lipoxygenase increases mixing tolerance. *Cereal Chem.*, **57**, 163-166.
- HUANG D., OU B., HAMPSCH-WOODILL M., FLANAGAN J.A., PRIOR R.L., 2002. High-throughput assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4437-4444.
- JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P., BRULE G., 2006. Oxydation des lipides. In *Science des aliments Biochimie-Microbiologie-Procédés-Produits, volume 1, Stabilisation biologique et physico-chimique*. Tec et Doc Editions, Lavoisier, Paris, 95-120.

- JEROME M., 1999. *Suivi de l'oxydation et de l'effet protecteur du BHT au cours du procédé de friture de chips*. Mémoire d'ingénieur, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 113p.
- KANNER J., 1994. Oxidative processes in meat and meat products : quality implications. *Meat science*, 36, 169-189.
- KOCHERGINSKI N.M., KOSTETSKI Y.Y., SMIRNORV A.I., 2005. Antioxidant pool in beer and kinetics of EPR spin-trapping. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6870-6876.
- KOPANI M., CELEC P., DANISOVIC L., MICHALKA P., 2006. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin. Chim. Acta*, 364, 61-66.
- KOSHIISHI I., TSUCHIDA K., TAKAJO T., KOMATSU M., 2005. Quantification of lipid alkyl radicals trapped with nitroxyl radical via HPLC with postcolumn thermal decomposition. *J. of lipid research*, 46, 2506-2513.
- KRISTENSEN D., SKIBSTED L.H., 1999. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3099-3014.
- LIEGEOIS C., LERMUSIEAU G., COLLIN S., 2000. Mesuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1129-1134.
- LUNING P.A., ROOZEN, J.P., 1991. Volatile composition of white bread using enzyme active soya flour as improver. *Food Chem.*, **41**, 81-91.
- MANN D.L., MORRISON W.R., 1975. Effect of ingredients on the oxidation of linoleic acid by lipoxigenase in bread doughs. *J Sci. Food Agric.*, **26**, 493-505.
- MKHININI I., 2010. *Mécanisme d'action des lipoxygénases de fève, de blé et de soja et identification des radicaux libres*. Mémoire de stage de MASTER en Sciences et Technologies du vivant « Aliments et Bioproduits », AgroParisTech, Massy, 34p.
- NICOLAS J., BEAUX Y., DRAPRON R., 1974. Les méthodes de mesure de l'activité lipoxygénasique. Mise au point d'une nouvelle méthode. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 287-308.
- NICOLAS J., DRAPRON R. (1977). Some physicochemical characteristics of horse bean lipoxigenase (*Vicia faba* L.). *Ann. Technol. Agric.*, **26**, 119-132.
- NICOLAS J. et DRAPRON R., 1981. Les lipoxygénases végétales. Etat actuel de nos connaissances. *Sciences des aliments* I(1), 91-168.
- NICOLAS J., AUTRAN M., DRAPRON R. (1982). Purification and some properties of wheat germ lipoxigenase. *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 365-372.
- NICOLAS J. et DRAPRON R., 1983. Lipoxigenase and some related enzymes in breadmaking. In *Lipids in Cereal Technology*, Barnes P.J., Eds. Ac. Press, London England, 213-235.
- PAPADIMITRIOU V., SOTIROUDIS T.G., XENAKIS A., SOFIKITI N., STAVYIANNOUNDAKI V., CHANIOTAKIS N.A., 2006. Oxidative stability and radical scavenging activity of extra virgin olive oils : An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Analytica Chimica Acta*, 573-574, 453-458.

- PATTEE H.E., SINGLETON J.A., JOHNS E.B., 1974. Pentane production by peanut lipoygenase. *Lipids*, **9**, 302-306.
- QIAN S.Y., YUE G.-H., TOMER K.B., MASON R.P., 2003. Identification of all classes of spin-trapped carbon-centered radicals in soybean lipoygénase-dependent lipid peroxidations of ω -6 polyunsaturated fatty acids via LC / ESR, LC / MS, and tandem MS. *Free Rad. Biol. Med.* **34**, 1017-1028.
- QIAN S.Y., KADIISKA M.B., GUO Q., MASON R.P., 2005. A novel protocol to identify and quantify all spin trapped free radicals from *in vitro/in vivo* interaction of HO^{*} and DMSO: LC/ESR, LC/MS, and dual spin trapping combinations. *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 125-135.
- QUILES J.L., RAMIREZ-TORTOSA M.C., GOMEZ J.A., HUERTAS J.R., MATAIX J., 2002. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry*, **76**, 461-468.
- RABII H., 2011. *Etude des radicaux libres issus de la dégradation de l'acide linoléique en présence des lipoygénases végétales par résonance paramagnétique électronique et spin trapping*. Mémoire de stage de MASTER, ENSAIA, Nancy, 59p.
- RAHMANI M., 2007. Méthodes d'évaluation de la stabilité oxydative des lipides. *Les technologies de laboratoire*, **2**, 18-21.
- RICHARD-FORGET F., GAUILLARD F., HUGUES M., THIRY J.-M., BOIVIN P., NICOLAS J., 1995. Inhibition of horse bean and germinated barley lipoygénases by some phenolic compounds. *J. Food Sci.*, **60**(6), 1325-1329.
- RIEGER P.H., 2007. *Electron spin resonance : analysis and interpretation*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 539 p.
- ROBINSON D.S., WU Z., DOMONEY C., CASEY R., 1995. Lipoygenases and the quality of foods. *Food Chem.*, **54**, 33-43.
- ROHN S., KROH L. W., 2005. Electron spin resonance - a spectroscopic method for determining the antioxidant activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, **49**, 898-907.
- ROLLAND Y., 2004. Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, **6**, 419-424.
- ROMAN O., COURTOIS F., MAILLARD M.N., RIQUET A.M., 2012. Kinetic study of hydroperoxide degradation in edible oils using electron spin resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **89**, 1409-1417.
- ROMAN O., 2012. *Mesure et prédiction de la réactivité des lipides au cours du chauffage d'huiles végétales à haute température*. Thèse – Sciences des Aliments. UMR 1145 GENIAL. AgroParisTech, Massy, 167p.
- SANDERS T.H., PATTEE H.E., SINGLETON J.A., 1975. Aerobic pentane production by soybean lipoygenase isoforms. *Lipids*, **10**, 568-570.
- SCHIEBERLE P., GROSCH W., 1989. Potent odorants resulting from the peroxidation of lemon oil. *Z Lebensm Unters Forsch*, **189**, 26-31.

- SCHWARTZ K., HUANG S.W., GERMAN J.B., TIERSCH B., HARTMANN J., FRANKEL E.N., 2000. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4874-4882.
- SEVILLA M.D., ZHU J., 1990. Kinetic Analysis of Low-Temperature Autoxidation of Unsaturated Triglycerides. *J. Phys. Chem.*, 94, 1447-1452.
- SHAN Z., YU Q., PURWAHA P., GUO B., QUIAN S.Y., 2009. A combinaison study of spin-trapping, LC / ESR and LC / MS on carbon-centred radicals formed from lipoxygénase-catalysed peroxidation of eicosapentaenoic acid. *Free Radiac Research*, 1, 1-15.
- SINGLETON J.A., PATTEE H.E., SANDERS T.H., 1976. Production of flavor volatiles in enzyme and substrate enriched peanut homogenates. *J. Food Sci.*, 41, 148-151.
- THOMSEN M. K., KRISTENSEN D., SKIBSTED L.H., 2000. Electron spin resonance spectroscopy for determination of oxidative stability of food lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 725-730.
- VAN DER MERWE G.H., DU PLESSIS L.M., TAYLOR J.R., 2004. Changes in chemical quality indices during long-term storage of palm-olein oil under heated storage and transport-type conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(1), 52-58.
- VELASCO J., ANDERSEN M.L., SKIBSTED L.H., 2004. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chem.*, 85, 623-632.
- VELASCO J., ANDERSEN M.L., SKIBSTED L.H., 2005. Electron Spin Resonance Spin Trapping for Analysis of Lipid Oxidation in Oils : Inhibiting Effect of the Spin Trap α -Phenyl-N-tert-butyl nitron on Lipid Oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1328-1336.
- VELDINK G.A., VLIEGENTHART J.F.G., BOLGINGH J., 1977. Plant lipoxygenases. *Prog. Chem. Fats Other Lipids*, 15, 131-166.
- VELDINK G.A., HILBERS M.P., NIEUWENHUISEN W.F., VLIEGENTHART J.F.G., 1998. Plant lipoxygenase : structure and mechanism. In *Eicosanoid and related compounds in plants and animals*. Portland Press, pp 69-95.
- VERHAGEN J., VELDINK G.A., EGMONT M.R., VLIEGENTHART J.F.G., BOLDINGH J., VAN DEN STAR J., 1978. Steady-state kinetics of the anaerobic reactions of soybean lipoxygénase-1 with linoleic acid and 13-L-hydroperoxylinoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 529, 369-379.
- VILLIERE A., 2005. *Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des protéines*. Thèse sciences agroalimentaires. Faculté des sciences et des techniques, Nantes. Université de Nantes, Nantes, 203p.
- VILLIERE A., GENOT C., 2006. Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsion. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 2, 152-159.
- WANASUNDARA U.N., SHAHIDI F., JABLONSKI C.R., 1995. Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils. *Food Chemistry*, 52(3), 249-253.
- WHITAKER J.R., 1991. Lipoxygenases. In *Oxidative Enzymes important in Foods*. Robinson D.S, Eskin N.A.AM. Eds., Elsevier Applied Sci Chem., London, pp.175-215.

WONG J.W., HASHIMOTO K., SHIBAMOTO T., 1995. Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2707-2712.

WRIGHT P.J., ENGLISH A.M., 2003. Scavenging with TEMPO^{*} to identify peptide- and protein-based radicals by mass spectrometry: advantages of spin scavenging over spin trapping. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 8655-8665.

YU Q., SHAN Z., NI K., QIAN S.Y., 2008. LC/ESR/MS study of spin trapped carbon-centred radicals formed from in vitro lipoxygenase-catalysed peroxidation of γ -linolenic acid. *Free Radical Research*, 42(5), 442-455.

http://wwwens.uqac.ca/chimie1/Chimie_theorique/cadres/Cadre_chap_15.htm (mai 2012). COLLIN G., 2008. La résonance magnétique. In *Chimie théorique. La molécule et sa structure*. Université du Québec à Chicoutimi.

PARTIE 1

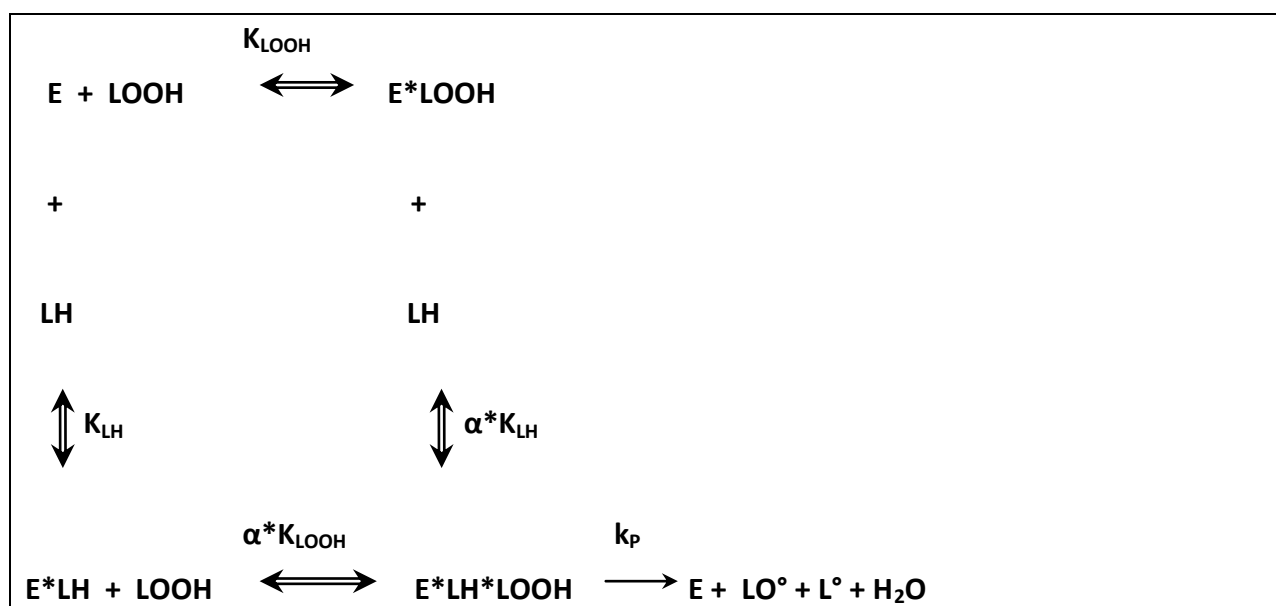
Propositions de formalisation des réactions impliquées dans la cinétique de consommation du TEMPOL lors de la réaction anaérobie de la lipoxigénase en présence ou non d'antioxydant phénolique

* Réactants initiaux :

LH = acide linoléique LOOH = Hydroperoxyde AOH = Antioxydant phénolique

T° = TEMPOL E = catalyseur (lipoxigénase du soja agissant à pH 9)

* Schéma réactionnel de la réaction enzymatique (anaérobie) :



* Equation donnant la vitesse de la réaction enzymatique (anaérobie) :

$$v_{\text{Eana}} = V_{\text{mana}} \frac{[\text{LH}] [\text{LOOH}]}{\alpha K_{\text{LH}} K_{\text{LOOH}} + \alpha K_{\text{LH}} [\text{LOOH}] + \alpha K_{\text{LOOH}} [\text{LH}] + [\text{LH}] [\text{LOOH}]} \quad (\text{Enz1})$$

* Réactions mises en jeu pour la consommation du TEMPOL pendant la réaction enzymatique anaérobie sans antioxydant :



* Calcul des concentrations au temps $t+\Delta t$ à partir des concentrations au temps t :

$$\text{LH}_{t+\Delta t} = \text{LH}_t - v_{\text{Eana}} \times \Delta t$$

$$\text{LOOH}_{t+\Delta t} = \text{LOOH}_t - v_{\text{Eana}} \times \Delta t$$

$$\text{L}^\circ_{t+\Delta t} = \text{L}^\circ_t + v_{\text{Eana}} \times \Delta t - v_1 \times \Delta t$$

$$\text{LO}^\circ_{t+\Delta t} = \text{LO}^\circ_t + v_{\text{Eana}} \times \Delta t - v_2 \times \Delta t$$

$$\text{T}^\circ_{t+\Delta t} = \text{T}^\circ_t - v_1 \times \Delta t - v_2 \times \Delta t$$

$$\text{LT}_{t+\Delta t} = \text{LT}_t + v_1 \times \Delta t$$

$$\text{LOT}_{t+\Delta t} = \text{LOT}_t + v_2 \times \Delta t$$

* Mesures effectuées :

T° par RPE (en continu)

T° , LOOH , LT , LOT par HPLC (en discontinu)

* Réactions mises en jeu pour la consommation du TEMPOL pendant la réaction enzymatique anaérobie avec antioxydant :



2 réactions sont ajoutées (le TEMPOL est considéré comme inerte vis-à-vis de AOH) :



* Calcul des concentrations au temps $t+\Delta t$ à partir des concentrations au temps t :

$$\text{LH}_{t+\Delta t} = \text{LH}_t - v_{\text{Eana}} \times \Delta t + \underline{v_{1ao} \times \Delta t}$$

$$\text{LOOH}_{t+\Delta t} = \text{LOOH}_t - v_{\text{Eana}} \times \Delta t$$

$$\text{LOH}_{t+\Delta t} = \text{LOH}_t + \underline{v_{2ao} \times \Delta t}$$

$$\text{L}^\circ_{t+\Delta t} = \text{L}^\circ_t + v_{\text{Eana}} \times \Delta t - v_1 \times \Delta t - \underline{v_{1ao} \times \Delta t}$$

$$\text{LO}^\circ_{t+\Delta t} = \text{LO}^\circ_t + v_{\text{Eana}} \times \Delta t - v_2 \times \Delta t - \underline{v_{2ao} \times \Delta t}$$

$$\text{T}^\circ_{t+\Delta t} = \text{T}^\circ_t - v_1 \times \Delta t - v_2 \times \Delta t$$

$$\text{LT}_{t+\Delta t} = \text{LT}_t + v_1 \times \Delta t$$

$$\text{LOT}_{t+\Delta t} = \text{LOT}_t + v_2 \times \Delta t$$

$$\text{AOH}_{t+\Delta t} = \text{AOH}_t - \underline{v_{1ao} \times \Delta t} - \underline{v_{2ao} \times \Delta t}$$

* Mesures effectuées :

T* par RPE (en continu)

T*, LOOH, LOH, LT, LOT, AOH par HPLC (en discontinu)

PARTIE 2

Propositions de formalisation des réactions impliquées dans la cinétique de consommation du TEMPOL lors des réactions aérobie et anaérobie de la lipoxygénase en présence ou non d'antioxydant phénolique

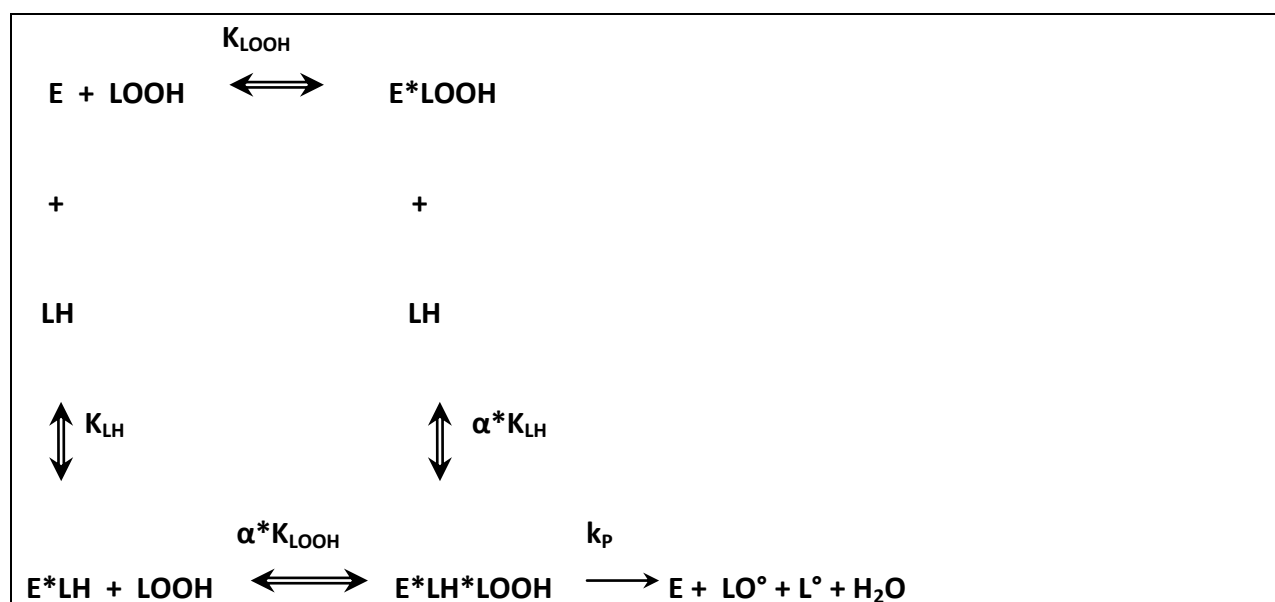
* Réactants initiaux :

LH = acide linoléique LOOH = Hydroperoxyde O₂ = Oxygène

AOH = Antioxydant phénolique T° = TEMPOL

E = catalyseur (lipoxygénase du soja agissant à pH 9)

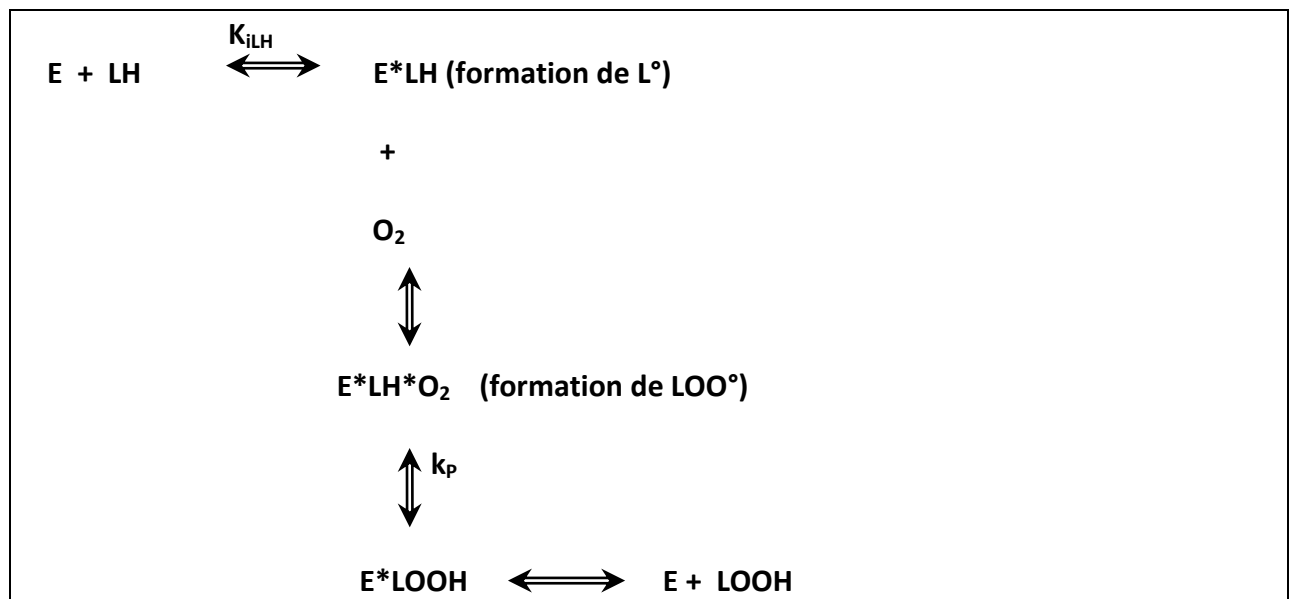
* Schéma réactionnel de la réaction enzymatique (anaérobie) :



* Equation donnant la vitesse de la réaction enzymatique (anaérobie) :

$$v_{\text{Eana}} = V_{\text{mana}} \frac{[\text{LH}] [\text{LOOH}]}{\alpha K_{\text{LH}} K_{\text{LOOH}} + \alpha K_{\text{LH}} [\text{LOOH}] + \alpha K_{\text{LOOH}} [\text{LH}] + [\text{LH}] [\text{LOOH}]} \quad (\text{Enz1})$$

* Schéma réactionnel de la réaction enzymatique (aérobie) :



* Equation donnant la vitesse de la réaction enzymatique (aérobie) :

$$v_{\text{Eaer}} = V_{\text{maer}} \frac{[\text{O}_2] * [\text{LH}]}{K_{i\text{LH}} * K_{\text{mO}_2} + K_{\text{mLH}} * [\text{O}_2] + K_{\text{mO}_2} * [\text{LH}] + [\text{O}_2] * [\text{LH}]} \quad (\text{Enz2})$$

* Réactions mises en jeu pour la consommation du TEMPOL pendant les réactions enzymatiques aérobie et anaérobie sans antioxydant :





* Calcul des concentrations au temps $t+\Delta t$ à partir des concentrations au temps t :

$$\text{LH}_{t+\Delta t} = \text{LH}_t - v_{\text{Eana}} \times \Delta t - v_{\text{Eaer}} \times \Delta t$$

$$\text{O}_{2t+\Delta t} = \text{O}_{2t} - v_0 \times \Delta t$$

$$\text{LOOH}_{t+\Delta t} = \text{LOOH}_t - v_{\text{Eana}} \times \Delta t + v'_0 \times \Delta t$$

$$\text{H}^\circ_{t+\Delta t} = \text{H}^\circ_t + v_{\text{Eaer}} \times \Delta t - v'_0 \times \Delta t$$

$$\text{L}^\circ_{t+\Delta t} = \text{L}^\circ_t + v_{\text{Eaer}} \times \Delta t + v_{\text{Eana}} \times \Delta t - v_0 \times \Delta t - v_1 \times \Delta t$$

$$\text{LO}^\circ_{t+\Delta t} = \text{LO}^\circ_t + v_{\text{Eana}} \times \Delta t - v_2 \times \Delta t$$

$$\text{LOO}^\circ_{t+\Delta t} = \text{LOO}^\circ_t + v_0 \times \Delta t - v_3 \times \Delta t - v'_0 \times \Delta t$$

$$\text{T}^\circ_{t+\Delta t} = \text{T}^\circ_t - v_1 \times \Delta t - v_2 \times \Delta t - v_3 \times \Delta t$$

$$\text{LT}_{t+\Delta t} = \text{LT}_t + v_1 \times \Delta t$$

$$\text{LOT}_{t+\Delta t} = \text{LOT}_t + v_2 \times \Delta t$$

$$\text{LOOT}_{t+\Delta t} = \text{LOOT}_t + v_3 \times \Delta t$$

* Mesures effectuées :

T° par RPE (en continu)

T° , LOOH, LT, LOT, LOOT par HPLC (en discontinu)

* Réactions mises en jeu pour la consommation du TEMPOL pendant la réaction enzymatique anaérobie avec antioxydant :



3 réactions sont ajoutées (le TEMPOL est considéré comme inerte vis-à-vis de AOH) :



* Calcul des concentrations au temps $t+\Delta t$ à partir des concentrations au temps t :

$$LH_{t+\Delta t} = LH_t - v_{Eana} \times \Delta t - v_{Eaer} \times \Delta t + \underline{v_{1ao} \times \Delta t}$$

$$O_{2t+\Delta t} = O_{2t} - v_0 \times \Delta t$$

$$LOOH_{t+\Delta t} = LOOH_t - v_{Eana} \times \Delta t + v'_0 \times \Delta t + \underline{v_{3ao} \times \Delta t}$$

$$LOH_{t+\Delta t} = LOH_t + \underline{v_{2ao} \times \Delta t}$$

$$H^\circ_{t+\Delta t} = H^\circ_t + v_{Eaer} \times \Delta t - v'_0 \times \Delta t$$

$$L^\circ_{t+\Delta t} = L^\circ_t + v_{Eaer} \times \Delta t + v_{Eana} \times \Delta t - v_0 \times \Delta t - v_1 \times \Delta t - \underline{v_{1ao} \times \Delta t}$$

$$LO^\circ_{t+\Delta t} = LO^\circ_t + v_{Eana} \times \Delta t - v_2 \times \Delta t - \underline{v_{2ao} \times \Delta t}$$

$$LOO^\circ_{t+\Delta t} = LOO^\circ_t + v_0 \times \Delta t - v_3 \times \Delta t - v'_0 \times \Delta t - \underline{v_{3ao} \times \Delta t}$$

$$T^\circ_{t+\Delta t} = T^\circ_t - v_1 \times \Delta t - v_2 \times \Delta t - v_3 \times \Delta t$$

$$LT_{t+\Delta t} = LT_t + v_1 \times \Delta t$$

$$LOT_{t+\Delta t} = LOT_t + v_2 \times \Delta t$$

$$LOOT_{t+\Delta t} = LOOT_t + v_3 \times \Delta t$$

$$AOH_{t+\Delta t} = AOH_t - \underline{v_{1ao} \times \Delta t} - \underline{v_{2ao} \times \Delta t} - \underline{v_{3ao} \times \Delta t}$$

* Mesures effectuées :

T^* par RPE (en continu)

T^* , LOOH, LOH, LT, LOT, LOOT, AOH par HPLC (en discontinu)

Résumé : L'oxydation des lipides est une cause majeure de dégradation des aliments et conduit à des pertes organoleptiques et nutritionnelles. Ceci explique le besoin de mieux comprendre l'ensemble des réactions impliquées dans ce phénomène. Dans ce contexte, la résonance paramagnétique électronique est un outil puissant pour piéger et quantifier les espèces radicalaires, composés clés des premières étapes de l'oxydation. L'objectif de notre travail est d'évaluer les vitesses de réaction impliquant les radicaux libres qui se forment pendant l'oxydation de l'acide linoléique catalysée par la lipoxygénase.

La première technique utilisée a été le « *spin trapping* » avec le POBN comme piégeur de radicaux libres. Il a ainsi été montré que la formation d'adduits radicalaires s'effectuait principalement en anaérobiose. La seconde technique utilisée a été le « *spin scavenging* » avec le TEMPOL comme piégeur. Cela a permis de déterminer le mécanisme enzymatique de la lipoxygénase ainsi que les paramètres cinétiques associés, d'étudier le mode d'inhibition d'antioxydants phénoliques, et d'étendre l'étude à d'autres lipoxygénases, tout cela ayant été effectué en aérobie et en anaérobiose.

Ces études, couplées à l'analyse par HPLC / DAD et HPLC / SM, pourront amener à la séparation, à l'identification et à la quantification des radicaux libres lipidiques formés durant l'oxydation de l'acide linoléique.

Mots clés : oxydation des lipides, radicaux libres lipidiques, lipoxygénase, acide linoléique, résonance paramagnétique électronique, antioxydants.

Abstract : Lipids oxidation is a major cause of food degradation and leads to organoleptic and nutritional losses. This explains the need to understand all the reactions involved in this phenomenon. In this context, electron spin resonance is a powerful tool for trapping and quantifying the radicals species, key molecules in the first steps of lipid oxidation. The aim of our study was to evaluate the rates of reaction involving free radicals formed during the oxidation of linoleic acid catalysed by lipoxygenase.

The first technique used was "spin trapping" with POBN as spin-trap. It has been shown that the formation of spin adducts was done mainly under anaerobic conditions. The second technique used was "spin scavenging" with TEMPOL as spin-scavenger. This allowed us to determine the enzymatic mechanism of lipoxygenase and the kinetic parameters associated, to study the mode of inhibition of phenolic antioxidants, and to extend the study to other lipoxygenases, all of this has been made in aerobic and anaerobic conditions.

These studies, coupled with analysis by HPLC / DAD and HPLC / MS, can lead to the separation, identification and quantification of free lipid radicals formed during linoleic acid oxidation.

Keywords : lipids oxidation, free lipid radicals, lipoxygenase, linoleic acid, electron spin resonance, antioxidants.