



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté par

MERINI Rania

FEROUI Fatima Zahra Nihad

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en Sciences biologiques

Spécialité : infectiologie

Thème

**Evaluation du pouvoir antioxydant de quelques acides
aminés synthétiques**

Soutenu le 11/07/2021, devant le jury composé de :

Présidente	Mme GHALEM M.	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur	Mme MEDJOUB H.	MCB	Université de Tlemcen
Co-encadreur	Mme LALLAM S.	MAA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Melle BOUALI W.	MCA	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2020-2021

Remerciement

Nous remercions **ALLAH**, le tout puissant, d'avoir nous donner le courage, la volonté et la patience de mener à terme le présent travail.

Tout d'abord, nous nous sommes très reconnaissantes, à **Mme MEDJDOUB Houria**, maître de conférences B au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, de bien vouloir porter intérêt à ce travail, pour vos encouragements, vos précieux conseils et votre patience tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier profondément **Mme BOUKLI HACENE Latefa**, maître de conférences au département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour ses efforts pour améliorer la formation en Master infectiologie.

Toutes nos gratitude s'adressent aussi à **Mme GHANEM Meriem** maitre de conférence A au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, qui ma fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.

Nous voudrions exprimer nos sincères gratitude à **Melle BOUALI Wafaa**, maître de conférences A, au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour l'honneur de bien vouloir examiner avec attention ce travail.

Nous remercions, également notre co-encadreur **Mme LALLAM**, enseignante au département des math, faculté des sciences pour son aide.

Nos remerciements s'adressent également à **Mme MEHIAOUI Khaira** ingénieur de Laboratoire de recherche LASNABIO, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour son soutien, sa disponibilité et sa gentillesse.

Par la même occasion, nous remercions infiniment tous les enseignants qui ont contribué à notre formation. Nous tenons aussi à remercier toute la promotion d'infectiologie pour le respect et la convivialité durant toutes les années de notre formation.

Dédicace

Je dédie entièrement ce travail à mon père et ma mère, mes premiers supporteurs et ma plus grande force. Merci pour votre amour, votre présence et votre soutien, merci de n'avoir jamais douté de moi.

A mes adorables sœurs et mon frère qui font de mon univers une merveille. Je leurs souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

A ma famille, mes proches et surtout mes petits enfants Firdaous, Alae et Mohammed Farid Mehdi pour leur tendresse.

A mes amies Asma et Amel qui depuis des années m'encouragent et ont toujours été à mes côtés. Que Dieu leurs donne de la santé et de la prospérité.

A tous ceux qui m'aiment

Merci !

Nihad

Dédicace

Je dédie entièrement ce travail avec un cœur plein d'humilité et de chagrin plein d'amour et de manque immense ;

A toi MAMAN<<Dr BendimeradChahrazed>> qui sans toi et sans le courage que tu m'as appris je n'aurai jamais pus continuer que Dieu le tout puissant, t'accorde sa sainte miséricorde et t'accueille en son vaste paradis.

Merci pour tout que tu m'as appris et tout se que tu m'as donné.

A mon mari qui a toujours était à mes cotés ; merci pour sa patience et son encouragement et sa présence.

A mes adorables frères qui illuminent ma vie je vous souhaite tout le bonheur du monde.

A ma fille adoré toute ma famille et ma belle famille pour leurs soutien.

Merci à ma très chère tante pour sa présence son aide et ses encouragement.

MERCI

Rania

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de valorisation des acides aminés synthétiques dans un milieu externe. Ils sont reconnus par leurs propriétés métaboliques. Dans ce cadre on a déterminé l'activité antioxydante de quelque acide aminé synthétique *in vitro* par la méthode appliquée. Celle de la réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) technique de **FRAP**.

Les résultats obtenus montrent un pouvoir antioxydant élevé au niveau de la phénylalanine par rapport à l'autre acide aminé utilisé. Ce dernier a été classé ainsi par la mesure de la concentration efficace Ec_{50} la plus faible dus à la présence du groupement hydroxyle qui peut servir de donneur d'électrons aux radicaux libre.

Mot clés

Stress oxydant - acide aminé – Ec_{50}

Abstract

This work is part of the recovery of synthetic amino acids in an external environment. They are recognized by their metabolic properties. In this context, the antioxidant activity of some synthetic amino acid was determined in vitro by the applied method. That of the reduction of ferric iron (Fe^{3+}) to ferrous iron (Fe^{2+}) technique of FRAP.

The results obtained show a high antioxidant power at the level of phenylalanine compared to the other amino acid used. The latter was thus classified by measuring the lowest effective concentration Ec_{50} due to the presence of the hydroxyl group which can serve as an electron donor for free radicals.

Word keys

Oxidative stress - amino acid - Ec_{50}

ملخص

هذا العمل هو جزء من استعادة الأحماض الأمينية الاصطناعية في بيئة خارجية. يتم التعرف عليها من خلال خصائصها الأيضية. في هذا السياق ، تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة لبعض الأحماض الأمينية الاصطناعية في المختبر بالطريقة المطبقة. أن اختزال الحديد الحديدي ($+ Fe3$) إلى حديد حديد ($+ Fe2$) بتقنية ارجاع الحديد. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها قوة عالية من مضادات الأكسدة على مستوى فينيل ألانين مقارنة مع الأحماض الأمينية الأخرى المستخدمة. وهكذا تم تصنيف هذا الأخير عن طريق قياس أدنى تركيز فعال $EC50$ نظرًا لوجود مجموعة الهيدروكسيل التي يمكن أن تكون بمثابة مانح للإلكترون للجذور الحرة.

مفتاح

الاحماض الامينية - $EC50$ - الاكسدة

Table de matière

Listes des Tableaux.....	i
Liste des Figures.....	ii
Liste des Acronymes.....	iii
Introduction général.....	1

1^{ère} partie : La synthèse bibliographique

Chapitre 1 : stress oxydatif

1- Stress oxydant et pathologies :	2
1-1-Stress oxydant :	2
1-2-Espèces réactives :	3
1-3- Espèces réactives de l'oxygène :	3
1-4-L'anion superoxyde : $O_2^{\cdot-}$	4
1-5-Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2	5
2-Oxydation et antioxydation :	5
2-1-L'oxydation :	5
2-2- Les anti-oxydants :	7
2-2-1 - Les antioxydants primaires	7
2-2-2 - Les antioxydants secondaires.....	7
2-3-Les méthodes de mesures de l'oxydation :	7
2-4-Des éléments pour lutter contre l'oxydation :	8
2-5- Les antioxydants de synthèse :	9

Chapitre 2 : Acides Aminés

1-structure générale d'un acide aminé :	11
1-1- Composition chimique :	11
2-2- Stéréochimie :	11
2- Les différents acides aminés intègres lors de la synthèse des protéines :	11
2-1- Nomenclature :	11
2-2- Caractéristiques chimiques :	13
2-2-1- Les acides aminés aliphatiques hydrophobes :	13
2-2-3- Les acides aminés amidés :	16
2-2-4- Les acides aminés aromatiques hydroxylés :	16
2-2-5- Les acides aminés hydrophiles hydroxylés :	17
2-2-6- Les acides aminés soufrés :	17
2-2-7- Les acides aminés dibasiques :	18
2-2-8 Les acides aminés diacides :	19
2-3-Echelle d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle Très hydrophile :	20
2-4-Solubilité des acides aminés :	20
2-5-Coloration et absorption de la lumière :	20
3- Quelques acides aminés et leurs effets antioxydant :	21
4-Méthodes <i>in vitro</i> pour l'évaluation de l'activité antioxydant :	23

2^{eme} Partie Expérimentale:

Matériel et Méthodes

1. Objectif :	24
2. Matériel et solutions :	24
3. Préparation des acides aminés :	25
4. Evaluation de l'activité antioxydante des acides aminés :	25
a- principe de la méthode :	26
b- Mode opératoire :	26

Résultats et Interprétation

1-Effet de l'acide ascorbique sur la réduction de Fer:	28
2-Effet de l'acide aminé phénylalanine sur la réduction de Fer :	29
3-Effet de l'acide aminé leucine sur la réduction de Fer :	29
4-Effet de l'acide aminé aspartate sur la réduction de Fer:	30
6-Effet de l'acide aminé glutamine sur la réduction de Fer :	31

Discussion

1-Acide Ascorbique :	33
2-Phénylalanine :	34
3-Leucine :	34
4-La glutamine :	34
5-Arginine :	34

Conclusion Générale	36
----------------------------------	-----------

Références bibliographiques	38
--	-----------

Liste des Tableaux

Tableau 01 : radicaux libres et leurs espèces.....	6
Tableau 02 : les abréviations des acides aminés.....	12
Tableau 03 : acides aminés aliphatiques hydrophobes.....	13
Tableau 04 : acides aminés aromatiques hydrophobes.....	15
Tableau 05 : acides aminés amidés.....	16
Tableau 06 : acides aminés aromatiques hydroxylés.....	16
Tableau 07 : acides aminés hydrophiles hydroxylés.....	17
Tableau 08 : acides aminés soufrés.....	18
Tableau 09 : acides aminés dibasiques.....	18
Tableau 10 : acides aminés diacide.....	19
Tableau 11 : Echelle d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle Très hydrophile.....	20
Tableau 12 : valeur des EC50 des extraits des acides aminés étudiés et l'acide ascorbique...	32

Liste des Figures

Figure 1 : Transfert électronique et d'hydrogène du composé AH ₂ (qui s'oxyde en A) le long de la chaîne respiratoire aboutissant à la formation d'H ₂ O à partir d'O ₂	4
Figure 2 : résidus hydroxyle.....	8
Figure 3 : French Paradox.....	8
Figure 4 : Structure chimique de la 2-BHA et de la 3-BHA.....	9
Figure 5 : Structure chimique de la BHT.....	9
Figure 6 : Structure chimique de la TBHQ.....	10
Figure 7 : différent isomère.....	11
Figure 08 : Coloration et absorption de la lumière du phénol, tyrosine et tryptophane.....	21
Figure 09 : Les solutions utilisées.....	24
Figure 10 : Spectrophotomètre.....	25
Figure 11 : Préparation des acides amines.....	25
Figure 12 : Protocole d'évaluation du pouvoir réducteur FRAP (Rohman et al., 2010).....	27
Figure 13 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide ascorbique.....	28
Figure 14 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations de l'acide aminé phénylalanine.....	29
Figure 15 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide aminé leucine.....	29
Figure 16 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide aminé L-aspartate.....	30
Figure 17 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide aminé méthionine.....	30
Figure 18 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide aminé glutamine.....	31

Liste des Abréviations :

1O₂ : Oxygène singlet.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

SOD : Superoxyde dimustase.

Cat : Catalase.

DO : Densité optique.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

Fe³⁺ : Fer ferrique.

Fe²⁺: Fer ferreux.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

FRAP : Pouvoir réducteur de fer.

GPx : Glutathions peroxydases.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion oxydé.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50 % d'une activité.

K₃Fe(CN)₆ : ferricyanure de potassium.

O₂^{-•}: Anion superoxyde.

OH[•]: Radical hydroxyl.

RL: radical libre.

RO[•]: Radical alkoxy.

ROO[•]: Radical peroxy.

ROOH: Hydroperoxyde organique.

NADPH: Nicotiamide adenine dinucleotide Phosphate.

BHA: Hydroxyanisole butyle.

ATP: Adenosine TriPhosphate.

Introduction Générale

Introduction générale

Les avancées de la médecine ont permis de mieux comprendre la physiologie du corps humain et les réactions chimiques permettant son bon fonctionnement. Dès lors, bon nombre de pathologies ont vu leurs mécanismes de survenue identifiés. L'oxydation, si elle est nécessaire à la vie, peut aussi avoir un effet délétère : le stress oxydant peut causer de sévères dommages cellulaires. Pour se protéger de ce type d'agression, notre organisme produit ou fait appel à une source exogène d'antioxydants (**Hybertson, 2011**).

L'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants est précaire. Pour maintenir cet équilibre, une alimentation variée est nécessaire. On trouve de nombreux antioxydants dans l'alimentation, que ce soit dans les fruits, les légumes ou les boissons. Une modification des habitudes alimentaires a été observée ces dernières décennies avec notamment le développement des « fast-food » et la consommation de produits surgelés qui perdent une partie de leurs vitamines. Ainsi l'apport exogène en antioxydants diminue et peut favoriser l'apparition de certaines pathologies induites par ces carences (**Kehrer, 1993**).

Notre étude s'inscrit dans le contexte de la recherche des molécules à pouvoir antioxydant et s'intéresse donc à la recherche du pouvoir antioxydant de quelques acides aminés synthétiques.

En raison de la situation sanitaire liée au COVID-19, nous avons réalisé que la technique de FRAP et cela au sein du laboratoire de recherche sur les substances naturelles et bioactives (LASNABIO).

Première Partie :

Synthèse Bibliographique

Chapitre 01:

Stress oxydatif

1- Stress oxydant et pathologies :

1-1-Stress oxydant :

De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule.

Dans les conditions physiologiques, l'oxygène produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour Réactive Oxygen Species) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire, c'est notamment le cas au niveau des mitochondries d'une cellule. De nombreux ROS sont des radicaux libres, possédant des propriétés oxydantes qui les amènent à réagir avec leurs environnements chimiques, incluant une série de substrats biologiques d'importance (lipides, protéines, ADN, sucres,..). Au niveau moléculaire, ces ROS peuvent également jouer le rôle de messagers secondaires en activant différents facteurs ou indirectement des gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies.

Initialement, la production endogène des ROS a pour but de défendre l'organisme contre des agents pathogènes (e.g. bactéries, virus). C'est le cas lors de la phagocytose d'une bactérie par un macrophage, le phagosome créé fusionne avec le lysozyme qui contient de nombreux ROS. La bactérie se trouve en contact direct avec ces espèces hautement réactives, détruisant alors l'agent pathogène (**Castaneda et al., 2017**).

Cependant, les ROS ne sont pas des espèces sélectives, elles ne sont pas capables de faire la différence entre l'agresseur et l'agressé. Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a en parallèle développé des systèmes de défense qui permettent de réguler la production de ces ROS. Ces mécanismes font intervenir un système endogène (enzymatique ou non enzymatique), mais également des molécules provenant l'alimentation incluant des vitamines et des oligoéléments (**Mittal et al., 2014**).

Il est important de noter que le stress oxydant peut être également la conséquence de l'effet de facteurs environnementaux. En effet, la vie moderne confronte notre organisme à des facteurs provoquant une surproduction de ROS tels que la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition au soleil ou encore le tabagisme. Ceci conduit soit à un affaiblissement de nos défenses antioxydants soit à la synthèse directe de ROS, pouvant engendrer des dégâts cellulaires.

En cas d'exercice intense mal maîtrisé. En parallèle de ces agressions, la situation s'aggrave du fait d'une alimentation moins saine et moins équilibrée qu'auparavant.

De ce fait, l'apport en antioxydants naturels est de plus en plus faible malgré leur rôle dans le contrôle des effets nocifs de l'oxygène.

Ainsi, chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant. Celui-ci est fonction du mode de vie, des caractéristiques génétiques mais également de l'environnement. Une bonne hygiène de vie ainsi que de bonnes habitudes alimentaires jouent également un rôle primordial dans le maintien d'un potentiel antioxydant optimal.

Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient actuellement un sujet prioritaire en termes de prévention de maladies. En effet, de nombreuses études indiquent qu'il existe une association entre l'altération des systèmes de défense antioxydants et le développement de plus de 200 physiopathologies différentes comme l'athérosclérose ou le cancer mais également le SIDA, les maladies inflammatoires, le diabète et le vieillissement (**Mittal *et al.*, 2014**).

1-2-Espèces réactives :

Les espèces réactives (pouvant être de nature radicalaire ou non) se divisent en deux catégories principales : d'une part les ROS et d'autre part les espèces réactives de l'azote (ou RNS pour Reactive Nitrogen Species).

Les radicaux libres constituent une proportion importante des ROS. Un radical libre se définit comme une espèce chimique, (e.g., atome ou molécule) possédant un ou plusieurs électron(s) célibataire(s) sur sa couche externe de valence lui conférant une grande instabilité et donc une grande réactivité. La genèse de ces radicaux libres au sein de l'organisme est un processus physiologique en réponse à un facteur exogène tel que l'agression par des microorganismes, des métaux lourds, des rayonnements ionisants, des rayons ultra-violetts ou encore la fumée de cigarette (**Carrière *et al.*, 2006**).

1-3- Espèces réactives de l'oxygène :

Les ROS sont majoritairement produits au sein de 2 sites cellulaires : d'une part la mitochondrie et d'autre part la membrane plasmique (**Leverve, 2009**).

Les ROS peuvent être générés au niveau de la chaîne mitochondriale, plus précisément au niveau de la membrane mitochondriale interne. La mitochondrie est un organite essentiel dans le métabolisme de l'oxygène. Le métabolisme de la chaîne mitochondriale consiste en

succession de transferts d'électrons catalysée par des enzymes permettant la production d'énergie sous forme d'ATP à partir de l'oxygène O₂. En cas de métabolisme incomplet ou de défaillance, certains ROS peuvent être produits et traverser la membrane mitochondriale. Du fait de l'activité importante de la chaîne respiratoire, la production mitochondriale de ROS est supérieure à celle provenant de la NADPH oxydase. Dans des conditions normales, on estime que 80% des ROS sont produites par la chaîne mitochondriale.

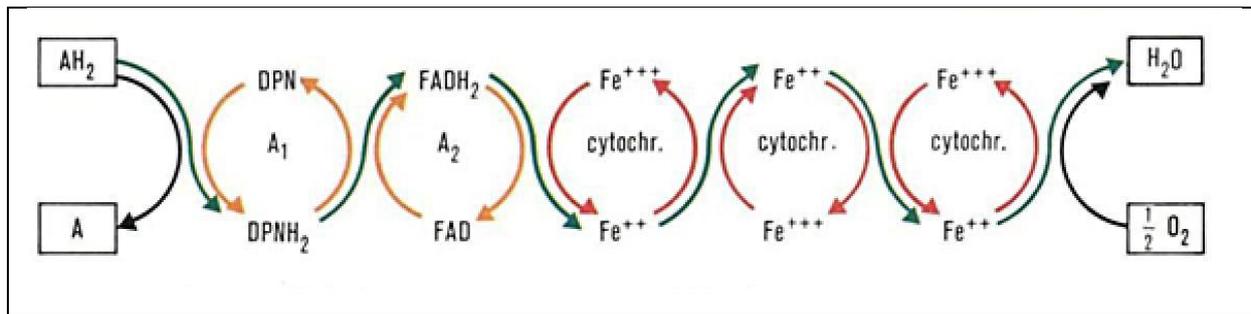
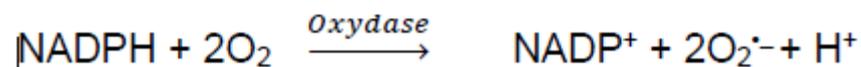


Figure 1 : Transfert électronique et d'hydrogène du composé AH₂ (qui s'oxyde en A) le long de la chaîne respiratoire aboutissant à la formation d'H₂O à partir d'O₂.

Dans la membrane plasmique se trouve une enzyme, la NADPH oxydase. Elle permet de catalyser la réduction de l'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons.

Cette réduction aboutit à la production de l'anion superoxyde O₂^{•-}.

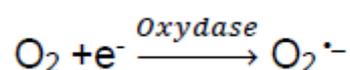


La NADPH oxydase a la particularité de présenter des domaines intra-, trans- et extra-membranaires, cette particularité va permettre la libération l'anion superoxyde à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule (**Leverve X.,2009**).

Enfin les NO synthases se présentent sous 3 isomères différents : la forme neuronale, la forme inductible et la forme endothéliale. Ces enzymes vont permettre la catalyse la synthèse de NO (**Stary et al., 1995**).

1-4-L'anion superoxyde : O₂^{•-}

L'anion superoxyde est généré par différents systèmes enzymatiques notamment des oxydases (e.x., NADPH oxydase dans la membrane lipidique et cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire mitochondriale). Cette réaction se fait grâce au transfert d'un électron du cofacteur enzymatique à l'oxygène.



La durée de vie du radical $O_2^{\bullet-}$ ainsi créé est très courte du fait de sa forte réactivité. Il va ainsi interagir rapidement avec son environnement direct (molécules de solvant). L'anion superoxyde est un souvent désigné comme une des espèces permettant la production de nombreuses autres espèces réactives de l'oxygène (**Juan *et al.*, 2015**).

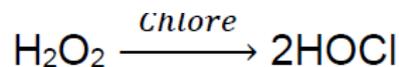
1-5-Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2

La double protonation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ peut se passer dans des conditions favorables en milieu acide. Cette réaction est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .



Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'est pas un radical libre, et présente donc une plus grande stabilité par rapport aux radicaux libres. Toutefois il est considéré comme une espèce réactive d'oxygène car il intervient comme intermédiaire de synthèse d'autres radicaux libres. Ses propriétés physico-chimiques lui permettent de traverser la membrane lipidique, il joue donc un rôle important comme vecteur et diffuseur du stress oxydant.

Le peroxyde d'hydrogène peut réagir dans les milieux intracellulaires avec des anions de chlore aboutissant ainsi à la formation d'acide hypochloreux.



Cet acide peut réagir avec les groupements amines de certains composés biologiques (e.g., protéines, lipides, ADN), entraînant leur dénaturation (**Gallard *et al.*, 1999**).

2-Oxydation et antioxydation :

2-1-L'oxydation :

Est le phénomène qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits et rancir les graisses. Il modifie le goût et la couleur des aliments. L'organisme subit également le phénomène d'oxydation, mais il est équipé pour lutter contre ces altérations : un énorme système de défense est en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes de régénération de complexes mettant en jeu par exemple l'acide ascorbique (vitamine C) ou le glutathion. Mais ce système de défense est parfois débordé. Surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de la pollution, du soleil, d'un effort physique intense, etc. Plusieurs cas peuvent engendrer des déséquilibres :

– soit dans des conditions de stress et alors l'oxydation augmente au point de ne pas pouvoir être régulée.

– soit dans des conditions de mauvaise alimentation et alors les quantités d'antioxydants apportés ne sont pas suffisantes pour rétablir l'équilibre. C'est là où il y a des dégâts.

L'oxydation est avant tout un phénomène chimique, elle est générée par des radicaux libres cellulaires parfois irréversibles entraînant la mort de la cellule (**Marc et al.,2004**).

Les réactions d'oxydation sont très rapides et se propagent en cascade. Les espèces moléculaires cibles de l'oxydation sont avant tous les corps gras comme les phospholipides des membranes cellulaires, mais aussi les protéines. Dans le cas des enzymes, l'oxydation entraîne une modification ou perte de l'activité biologique de la molécule, ce qui provoque des désorganisations touchant l'ADN ou une partie du système traduction/transduction. L'oxygène de l'air à l'état fondamental O_2 est peu réactif par rapport à la majeure partie des molécules biologiques. Par contre il existe des formes beaucoup plus réactives et donc plus toxiques (tableau1).

Tableau 01 : radicaux libres et leurs espèces.

Radicaux libres	Espèces à l'origine de radicaux libres
- $O_2^{\circ -}$: radical anion superoxyde	- 1O_2 : oxygène singulet
- OH° : radical hydroxyle	- H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
- HO_2° : radical perhydroxyle	- $ROOH$: hydroperoxyde
- RO° : radical alkoxyde (carbonyle excité)	
- ROO° : radical peroxyde	

L'oxydation se fait en trois phases distinctes, mais pratiquement simultanées :

- a. Initiation** : formations d'hydroperoxydes. L'oxygène n'oxyde pas directement les molécules. Le mécanisme réactionnel initial peut être initié par la chaleur, les UV ou les ions métalliques. De même, l'oxygène triplet, stable, peut être activé en oxygène singulet, réactif, par l'intermédiaire d'un photosensibilisateur. La phase d'initiation aboutit donc à la formation d'espèces très réactives : $ROOH$ et R^{\bullet} .

b. Propagation : destruction des hydroperoxydes et apparition des composés responsables des goûts et odeur de rance. La liaison O-O dans un hydroperoxyde est faible et peut être facilement rompue. Les deux dernières réactions sont en boucles, ce qui explique que des traces d'ions métalliques suffisent à générer une grande quantité de radicaux libres. Les espèces radicalaires produites par les premières réactions sont hautement réactives et vont à leur tour arracher un hydrogène à une autre molécule ou réagir avec un oxygène triplet.

c. Terminaison arrêt : apparition de nouvelles espèces moléculaires anarchiques. La chaîne de propagation peut s'arrêter par la formation de polymères ou au contact avec un autre radical. Les molécules créées n'ont plus de fonction biologique.

2-2- Les anti-oxydants :

Il existe deux types d'antioxydants :

2-2-1 - Les antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais, qui permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique : $AH + R^{\bullet} \rightarrow A^{\bullet} + RH$.

La molécule AH est antioxydante si le radical formé A^{\bullet} est plus stable. La stabilité du radical A^{\bullet} peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires :



2-2-2 - Les antioxydants secondaires ou préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines) ou enfin de séquestrants d'oxygène comme l'acide ascorbique.

2-3-Les méthodes de mesures de l'oxydation :

Si les mécanismes de l'oxydation sont maintenant bien décryptés et admis par tous, il n'en est pas de même pour les méthodes de mesure de l'oxydation ou du pouvoir antioxydant des principes actifs. En effet, certains composés actifs sont solubles en milieu aqueux (vitamine C, polyphénols, etc.), d'autres en milieu lipidique (vitamine E). De même, certaines molécules cibles de l'oxydation sont solubles en milieu aqueux (protéines, ADN/ARN) et d'autres en milieux lipidiques (huiles, lipides membranaires). Les formulateurs de la cosmétique ont bien saisi cet enjeu puisqu'il est d'usage maintenant de protéger les deux

phases des émulsions, qu'elles soient eau dans l'huile ou l'huile dans l'eau, l'oxydation ayant lieu initialement aux interfaces.

2-4-Des éléments pour lutter contre l'oxydation :

L'oxydation est un phénomène irréversible, mais que l'on peut et qu'il faut ralentir. Parmi les solutions, les meilleures sont sûrement issues de la nature, comme les désormais célèbres tocophérols et polyphénols, chacun dans leur domaine de polarité. Les polyphénols doivent leur activité à, comme leur nom l'indique, un très grand nombre de résidus hydroxyles, qui sont autant de munitions pour lutter contre les radicaux libres et stopper la réaction en chaîne (figures 2 et 3).

Le « French Paradox » est porté en partie par les polyphénols issus du raisin, composés de monomères, de dimères et de molécules encore plus polymérisées (figure 3). Déjà performant dans les extraits de pépins de raisin à haut pouvoir antioxydant, Burgundy a aussi développé un nouvel antioxydant répondant aux nouvelles exigences réglementaires du secteur des compléments alimentaires qui préconise des solvants d'extraction à l'eau ou à très faible degré alcoolique. Le Grapemax ExtraPure est extrait sans solvant organique, titre plus de 95 % de polyphénols, et se positionne parmi les extraits les plus efficaces dans le test ORAC.

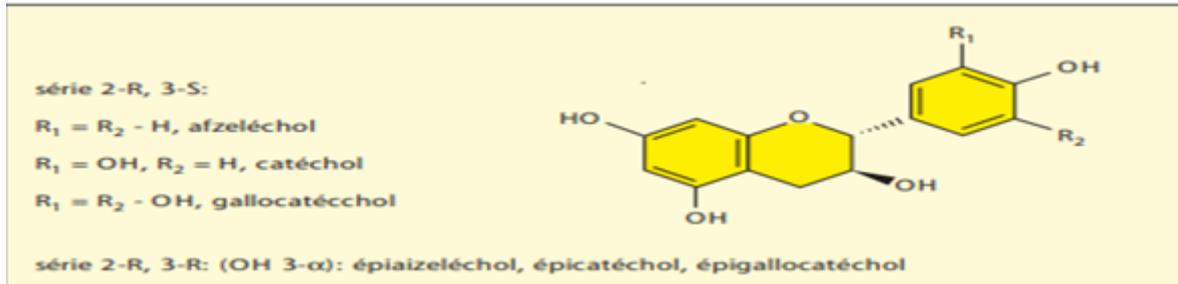


Figure 2 : résidus hydroxyle

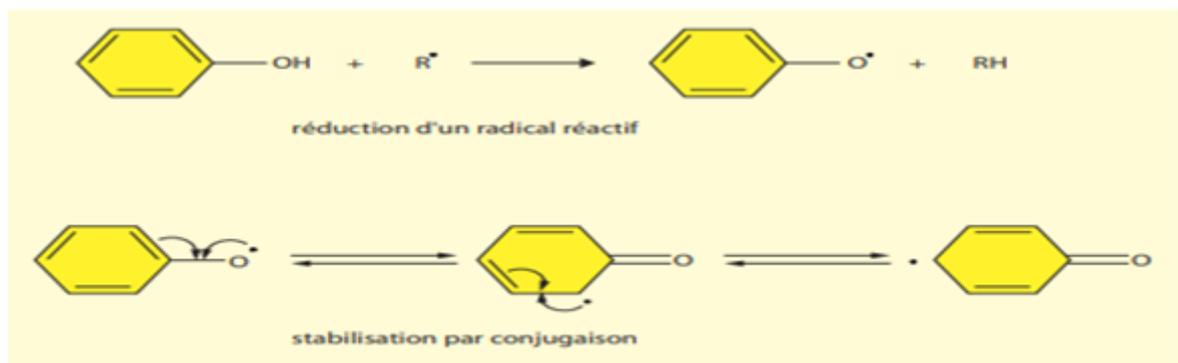


Figure 3 : French Paradox

2-5- Les antioxydants de synthèse :

Le BHA ou hydroxyanisolebutylé est un mélange de 2-tertiobutyl-4-hydroxyanisole (2-BHA) et de 3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole (3-BHA). Outre son utilisation comme antioxydant ayant pour but d'éviter aux produits lipophiles de rancir, il est également employé comme agent masquant afin de réduire ou masquer l'odeur de base d'un produit. Il est largement utilisé dans les rouges à lèvres, dans les crèmes hydratantes ou pour les fonds de teint. Le BHA est actuellement suspecté de provoquer des réactions allergiques cutanées, d'être un potentiel cancérigène voire de rentrer en compétition avec certaines fonctions hormonales. Son utilisation a donc été interdite en Europe dans la composition des parfums mais autorisée dans d'autres produits.

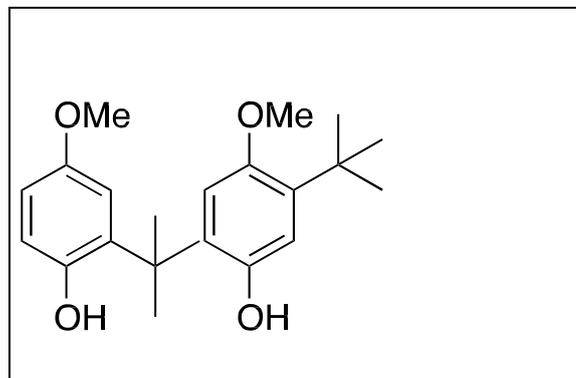


Figure 4 : Structure chimique de la 2-BHA et de la 3-BHA

-Le BHT ou 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol présente les mêmes propriétés que le BHA avec les mêmes risques pour la santé. Malgré cela, ces deux molécules sont préférées à l' α -tocophérol notamment en raison d'un coût de production moindre.

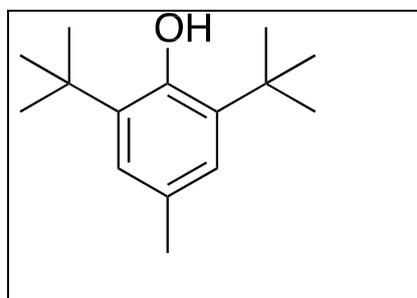


Figure 5 : Structure chimique de la BHT

- Enfin, le TBHQ ou butylhydroquinone tertiaire, il est principalement utilisé avec le BHA.

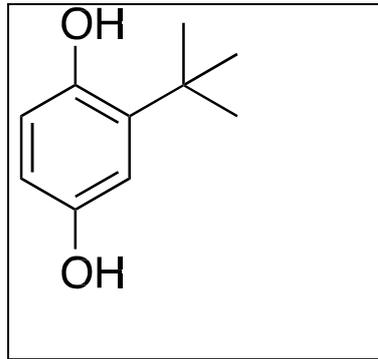


Figure 6 : Structure chimique de la TBHQ

Les acides aminés sont à la base de la constitution des protéines et autres peptides, même s'ils n'en sont pas les uniques constituants (voir par exemple l'hème, groupement prosthétique de l'hémoglobine). Cet article se propose de passer en revue les principales caractéristiques communes à tous les acides aminés, ainsi que les propriétés particulières des principaux acides aminés retrouvés dans les molécules du vivant.

3-Mécanisme d'action des antioxydants :

La présence d'antioxydants peut d'abord conduire à une diminution de la formation d'ERO et de l'azote, et à une capture des espèces réactives ou leurs précurseurs. Certains antioxydants possèdent la capacité de se lier aux ions métalliques nécessaires à la catalyse de la formation des oxydants réactifs, et d'autres peuvent réparer les dommages causés par oxydation aux biomolécules ou influencer des enzymes qui catalysent les mécanismes de réparation (**Donald et al., 2015**).

L'Oxydation des chaînes latérales des acides aminés. Tous les acides aminés sont des cibles potentielles pour les ERO (**Davies, 1987**) ; néanmoins les cibles majeures sont les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), basiques (arginine, histidine, lysine) et aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane). Citons par exemple la cystéine dont les oxydations réversibles jouent un rôle important dans la régulation de la fonction de nombreuses protéines (**Finke, 2000**).

Chapitre 2

Acides Aminée

1-structure générale d'un acide aminé :

1-1- Composition chimique :

Un acide aminé est une molécule possédant deux groupements ionisables :

L'un acide ($\text{COOH} \leftrightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$), l'autre basique ($\text{NH}_2 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_3^+$). L'atome de carbone sur lequel est fixé le groupement amine – NH_2 et le groupement acide carboxylique – COOH est appelé par convention carbone alpha.

2-2- Stéréochimie :

Le carbone alpha portant, dans la majorité des cas, quatre groupements différents, ce carbone est asymétrique. Les acides aminés sont donc des molécules chirales. On a deux isomères possibles : l'un de la série D, l'autre de la série L. Il existe une exception : la glycine.

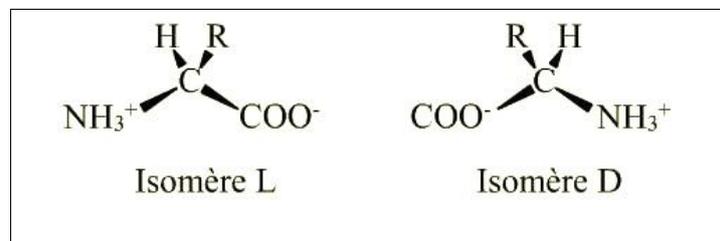


Figure 7 : différent isomère

Il se trouve que tous les acides aminés naturels trouvés dans les molécules du vivant sont de la série L.

2- Les différents acides aminés intègres lors de la synthèse des protéines :

2-1- Nomenclature :

Les acides aminés se différencient les uns des autres par leur radical. On peut donc théoriquement faire une infinité d'acides aminés. Cependant, on constate que chez l'Homme, comme chez de nombreuses espèces, seuls vingt acides aminés différents sont incorporés dans les protéines lors de la traduction. Leur masse molaire moléculaire moyenne est de 110 Da.

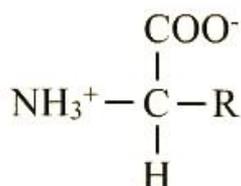
Pour plus de commodité, un code international de correspondance à une et trois lettres peut être utilisé pour désigner chacun de ces vingt acides aminés (tableau 02).

Acides Aminés

Tableau 02 : les abréviations des acides aminés

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate ou acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Le groupement R correspond à un radical variable selon l'acide aminé considéré. C'est donc lui qui détermine la nature de l'acide aminé puisque le reste est invariant.



Notons que la forme totalement non-ionisée n'existe pratiquement pas car aux pH acides pour lesquels la fonction COOH n'est pas ionisée, la fonction NH₂ l'est toujours, et inversement

aux pH basiques pour lesquels la fonction NH_2 n'est pas ionisée, la fonction COOH l'est toujours.

2-2- Caractéristiques chimiques :

Dans la liste ci-dessous (**du tableau 3 au tableau 10**) sont rassemblés quelques informations sur chacun des vingt acides aminés incorporés dans les protéines : nature du radical et quelques remarques sur les propriétés associées. Classiquement, on regroupe ces vingt acides aminés par familles, en fonction des propriétés chimiques du radical. Plusieurs types de classement sont possibles puisque certains acides aminés peuvent entrer dans plusieurs catégories.

Remarque : l'état d'ionisation des acides aminés étant dépendant des conditions de pH, il a été choisi dans cette présentation de donner les formules présentant l'état d'ionisation qui prévaut à pH physiologique (pH 7,4) (**Gilles 2004 à 2016**).

2-2-1- Les acides aminés aliphatiques hydrophobes :

Tableau 03 : acides aminés aliphatiques hydrophobes

Acide aminé	Glycine (Gly ; G)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH-H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • $\text{pK}_a = 2,3 / \text{pK}_b = 9,6 / \text{pK}_r = \text{aucun} / \text{pH}_i = 6,0$ • C'est le plus simple des acides aminés possibles. • Ne possède pas de carbone asymétrique puisque le carbone alpha porte deux hydrogènes (il faut quatre groupements différents pour avoir un carbone asymétrique).
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • $\text{pK}_a = 2,3 / \text{pK}_b = 9,6 / \text{pK}_r = \text{aucun} / \text{pH}_i = 6,0$ • C'est le plus simple des acides aminés possibles. • Ne possède pas de carbone asymétrique puisque le carbone alpha porte deux hydrogènes (il faut quatre groupements différents pour avoir un carbone asymétrique).

Acides Aminés

Acide aminé	Alanine (Ala ; A)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa = 2,3 / pKb = 9,7 / pKr = aucun / pHi = 6,0

Acide aminé	Valine (Val ; V)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa = 2,3 / pKb = 9,6 / pKr = aucun / pHi = 6,0

Acide aminé	Leucine (Leu ; L)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa = 2,4 / pKb = 9,6 / pKr = aucun / pHi = 6,0

Acide aminé	Isoleucine (Ile ; I)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa = 2,4 / pKb = 9,7 / pKr = aucun / pHi = 6,1 • Comporte deux carbones asymétriques : le carbone alpha mais aussi le carbone bêta.

Acide aminé	Proline (Pro ; P)
-------------	-------------------

Acides Aminés

2-2-3- Les acides aminés amidés :

Tableau 05 : acides aminés amidés

Acide aminé	Asparagine (Asn ; N)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O} \\ \qquad \qquad \\ \text{NH}_3^+ \qquad \text{NH}_2 \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none">• pKa = 2,0 / pKb = 8,8 / pKr = aucun / pHi = 5,4• Le groupement carboxamide terminal est polaire mais non-ionisable.

Acide aminé	Glutamine (Gln ; Q)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH}_3^+ \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none">• pKa = 2,2 / pKb = 9,1 / pKr = aucun / pHi = 5,7• Le groupement carboxamide terminal est polaire mais non-ionisable.

2-2-4- Les acides aminés aromatiques hydroxylés :

Tableau 06 : acides aminés aromatiques hydroxylés

Acide aminé	Tyrosine (Tyr ; Y)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none">• pKa = 2,2 / pKb = 9,1 / pKr = 10,1 / pHi = 5,7• La fonction hydroxyle liée au cycle aromatique est ionisable, mais non ionisée au pH physiologique (pH 7,4).

Acides Aminés

2-2-5- Les acides aminés hydrophiles hydroxylés :

Tableau 07 : acides aminés hydrophiles hydroxylés

Acide aminé	Sérine (Ser ; S)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none">• pKa = 2,2 / pKb = 9,2 / pKr = aucun / pHi = 5,7• La fonction hydroxyle est polaire mais non ionisable.

Acide aminé	Thréonine (Thr ; T)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{OH} \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none">• pKa = 2,6 / pKb = 10,4 / pKr = aucun / pHi = 6,5• La fonction hydroxyle est polaire mais non ionisable.• Comporte deux carbones asymétriques : le carbone alpha mais aussi le carbone bêta.

2-2-6- Les acides aminés soufrés :

Tableau 08 : acides aminés soufrés

Acide aminé	Cystéine (Cys ; C)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none">• pKa = 1,7 / pKb = 10,8 / pKr = 8,3 / pHi = 5,0• Le groupement thiol (-SH) est ionisable mais non ionisé au pH physiologique (pH 7,4).

Acides Aminés

	<ul style="list-style-type: none"> Deux groupements thiols sont susceptibles de s'oxyder pour former une liaison covalente Cys-S-S-Cys appelée pont disulfure.
--	---

Acide aminé	Méthionine (Met ; M)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> pKa = 2,3 / pKb = 9,2 / pKr = aucun / pHi = 5,8 Groupe aliphatique soufré donc caractère hydrophobe. <ul style="list-style-type: none"> Ne forme pas de pont disulfure.

2-2-7- Les acides aminés dibasiques :

Tableau 09 : acides aminés dibasiques

Acide aminé	Lysine (Lys ; K)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> pKa = 2,2 / pKb = 9,0 / pKr = 10,5 / pHi = 9,8

Acide aminé	Arginine (Arg ; R)
Radical	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}^+ \begin{array}{l} \diagup \text{NH}_2 \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> pKa = 2,2 / pKb = 9,0 / pKr = 12,5 / pHi = 10,8

Acides Aminés

Acide aminé	Histidine (His ; H)
Radical	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH} \\ \qquad \quad // \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \text{CH} \quad \quad \text{CH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \backslash \quad / \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{N} \end{array} $
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa = 1,8 / pKb = 9,2 / pKr = 6,0 / pHi = 7,6 • Le groupement imidazole est ionisable mais faiblement ionisé à pH physiologique (pH 7,4). • pHi proche du pH physiologique (pH 7,4).

2-2-8 Les acides aminés diacides :

Tableau 10 : acides aminés diacides

Acide aminé	Aspartate ou acide aspartique (Asp ; D)
Radical	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa = 2,2 / pKb = 9,8 / pKr = 3,9 / pHi = 3,0

Acide aminé	Glutamate ou acide glutamique (Glu ; E)
Radical	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Remarques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa = 2,2 / pKb = 9,7 / pKr = 4,3 / pHi = 3,2

2-3-Echelle d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle Très hydrophile :

Tableau 11 : Echelle d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle Très hydrophile

Arg	-4.5	Glu	-3.5
Lys	-0.8	Cys	-2.5
Thr	-3.9	His	3.2
Asn	-0.7	Phe	2.8
Gly	-3.5	Pro	-1.6
Asp	-0.4	Leu	3.8
Gln	-3.5	Tyr	-1.3
Met	1.8	Val	4.2
Trp	-0.9	Ile	4

2-4-Solubilité des acides aminés :

Les acides aminés sont solubles dans l'eau, mais très faiblement à un pH autour de leur pHi, plus fortement en milieu alcalin (formation de sels).

Ils sont plus faiblement solubles dans l'alcool. La solubilité dans les solvants apolaires dépend de leur chaîne latérale (Michel 2012).

2-5-Coloration et absorption de la lumière :

- Les solutions d'acides aminés sont incolores
- La plupart des AA absorbent à une $\lambda < 230$ nm
- Les AA aromatiques absorbent vers 280 nm (ultraviolet)
 - Utile pour repérer la présence de protéines.
 - Le tryptophane est fluorescent

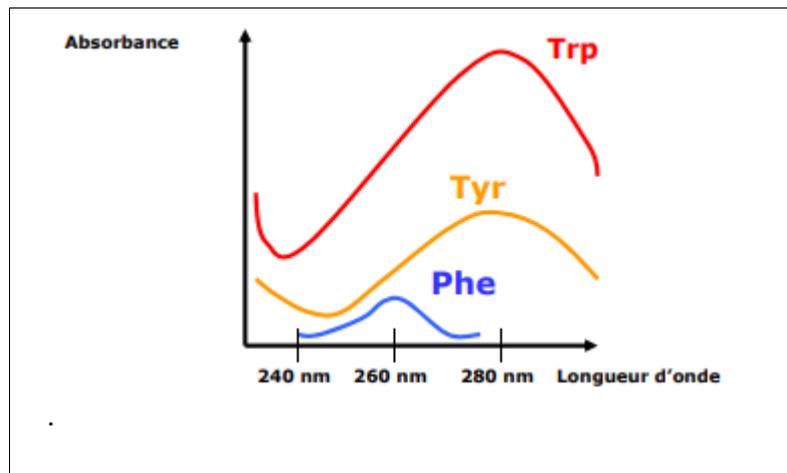


Figure 08 : Coloration et absorption de la lumière du phénol, tyrosine et tryptophane

3- Quelques acides aminés et leurs effets antioxydant :

- **La méthionine :**

C'est un anti-oxydant naturel et aide à lutter contre le vieillissement cellulaire. C'est un acide aminé essentiel, il est indispensable d'en apporter en quantité suffisante pour maintenir un bon état de santé. Cet acide aminé est unique de par sa structure soufré. La méthionine a de nombreux avantages sur la santé, elle permet de préserver le foie et d'assurer la synthèse optimale des protéines. Souvent utilisée chez le sportif ou pour ses propriétés antioxydantes.

- Acide aminé essentiel
- Se trouve dans les produits animaux en majorité (viande, poisson, produits laitiers)
- Nécessite la présence de vitamine B12 pour être synthétisée et assimilée
- Protège le foie
- Permet la synthèse protéique
- Propriétés antioxydantes
- Utilisée dans l'alimentation animale

La méthionine est un acide aminé qui a une structure sulfureuse très solide, elle est réputée pour renforcer les phanères, et notamment les cheveux et les ongles elle est à la base de la structure de toutes les protéines, ce qui la rend indispensable au bon fonctionnement de l'organisme de par sa structure soufrée et son potentiel antioxydant, la méthionine permet la régénération des cellules du foie (et des reins), et empêche les dépôts grasseeux de se former au niveau du foie et de la vésicule.

Acides Aminés

Apporter suffisamment d'acides aminés via l'alimentation permet d'assurer une bonne synthèse des protéines musculaires et un renouvellement cellulaire optimal après la séance. Sa teneur en molécules anti oxydantes permet aussi d'atténuer le stress oxydatif du aux séances de musculation souvent intensives et peut contribuer à améliorer la récupération.

(Lefebvre., 2017 , Zubiria, 2018).

- **Glutamine :**

C'est un acide aminé qualifié de conditionnellement essentiel dans les situations d'agression ou de stress sévère. Différentes études contrôlées, randomisées et des méta-analyses montrent des effets bénéfiques d'une supplémentation en glutamine par voie parentérale chez des patients de réanimation : réduction des complications infectieuses, de la durée de séjour et même de la mortalité. Ces résultats cliniques sont étayés par les données expérimentales montrant que la glutamine a des effets anti-inflammatoires, antioxydants, immunomodulateurs, induit l'expression des protéines de choc thermique, jouant un rôle dans la protection cellulaire et maintient la fonction de barrière intestinale.

De plus, un rôle favorable de la glutamine sur l'homéostasie du métabolisme du glucose a récemment été suggéré **(Aden, 2011)**.

- **Arginine :**

Les effets antioxydants peuvent faire partie des effets antiathérogènes possibles de l'acide aminé L-arginine. Ces propriétés antioxydantes ont été davantage caractérisées dans un modèle d'oxydation des lipoprotéines.

L'oxydation des lipoprotéines dans le sérum humain non fractionné a été surveillée en continu par une sonde fluorescente.

Les effets antioxydants de la L-arginine, de la N- α -acétyl-arginine et de la vitamine E en combinaison avec la L-arginine ont été mesurés après le début de la génération de radicaux libres avec du cuivre ou du chlorhydrate de 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH).

Le demi-temps de la vitesse de propagation rapide pour l'oxydation des lipoprotéines induite par le cuivre a augmenté après incubation avec la L-arginine de manière dose-dépendante ($P < 0,01$). La N- α -acétyl-arginine n'a pas montré de tels effets.

La vitamine E et la L-arginine présentent des effets différents sur l'oxydation induite par le cuivre, la première augmentant uniquement le temps de latence, la seconde augmentant uniquement la vitesse de propagation, et n'ont pas d'effets réciproques. Contrairement à l'oxydation induite par le cuivre, la L-arginine a augmenté le temps de latence de l'oxydation des lipoprotéines induite par l'AAPH ($P < 0,01$), sans effet sur la vitesse de propagation aux

concentrations physiologiques. Encore une fois, la N- α -acétyl-arginine n'a montré aucun effet antioxydant.

Les expériences fournissent une preuve supplémentaire que des mécanismes autres que le fait de servir de substrat pour la NO-synthase pourraient être impliqués dans l'effet antiathéroscléreux de la L-arginine. De plus, d'autres expériences montrent clairement que l'effet antioxydant de la L-arginine est dû à une fraction chimique différente de celle servant de substrat à la biosynthèse du NO (**Wallner *et al.*, 2002**).

4-Méthodes *in vitro* pour l'évaluation de l'activité antioxydant :

Pour détecter et doser efficacement l'activité antioxydant, plusieurs méthodes sont couramment utilisées telles que la Capacité Antioxydant Totale (CAT), qui est la capacité cumulative de composants alimentaires pour éliminer les radicaux libres, et serait utile à des fins épidémiologiques (**Labuza, 1975**). Des kits couplant une solution à mélanger avec l'échantillon à analyser et un simple appareillage de détection sont commercialisés comme le TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), l'ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), le test DPPH (DiPhenylPicrylHydrazyl) ou la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (**Benzie et Strain, 1996**).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle et unique par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise et de ce fait refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Le plus souvent il faut combiner les réponses de différents et complémentaires tests pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**Saint-Cricq de Gaulejac *et al.*, 1999 ; Tabart *et al.*, 2009**).

Deuxième partie :
Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Objectif :

L'objectif de notre étude est l'évaluation de l'activité antioxydante de quelques acides aminés synthétiques, en utilisant les tests de réduction du fer (FRAP).

L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO), université Abou BekrBelkaid.

2. Matériel et solutions :

Les acides aminés synthétiques utilisés

- ✚ Phénylalanine
- ✚ Aspartate
- ✚ Glutamine
- ✚ Méthionine
- ✚ Leucine

Ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1%)

Tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6)

Acide trichloracétique (TCA) (10 %)

Chlorure ferrique($FeCl_3$) 0,1%

Spectrophotomètre

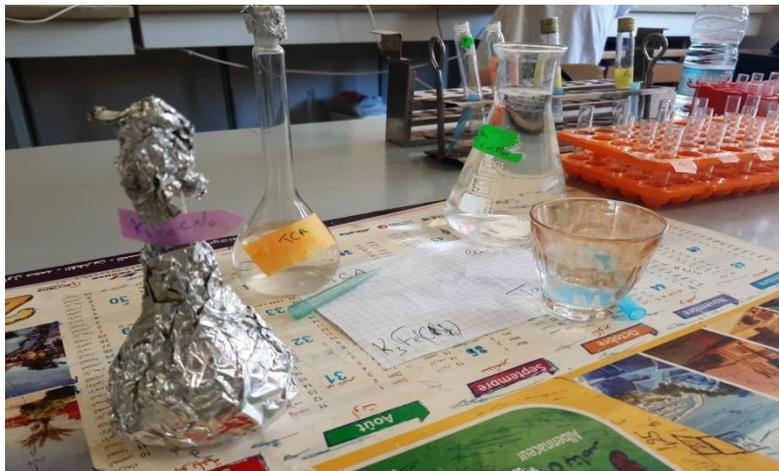


Figure 09: Les solutions utilisées

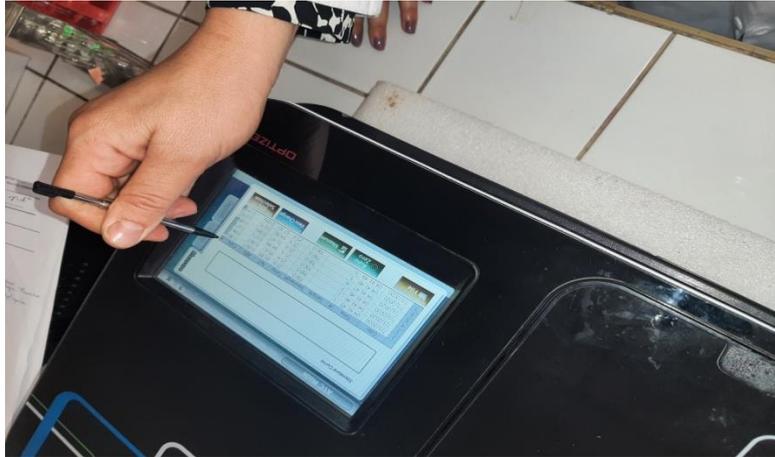


Figure 10: Spectrophotomètre

3. Préparation des acides aminés :

On prend **0,30 g** de chaque acide aminé avec **3000 µl** eau distillée et **1000 µl** d'acétone.

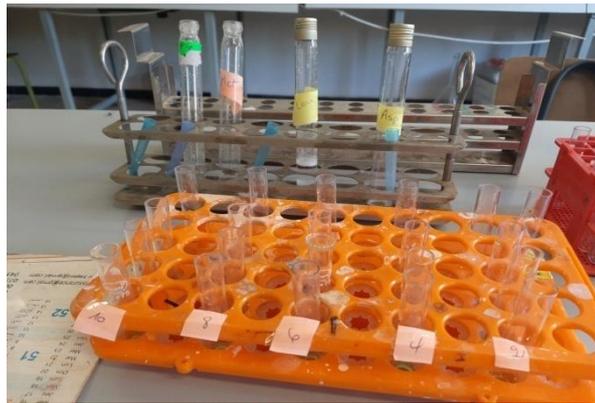


Figure 11: Préparation des acides amines

4. Evaluation de l'activité antioxydante des acides aminés :

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par la méthode **FRAP**

(**Ferric reducing antioxidant power**).

Matériel et méthodes

a- principe de la méthode :

Le test de FRAP évalue la présence des antioxydants dans différents échantillons (**Khalil *et al.*, 2012**).

Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (**Karagozler *et al.*, 2008**).

Le fer ferrique initialement jaune, se réduit et devient bleu ou vert en présence d'un donneur d'électron. L'absorbance du mélange réactionnel à 700 nm est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés (**Habibou *et al.*, 2019**).

b- Mode opératoire :

Le protocole suivi est illustré dans la figure 12:

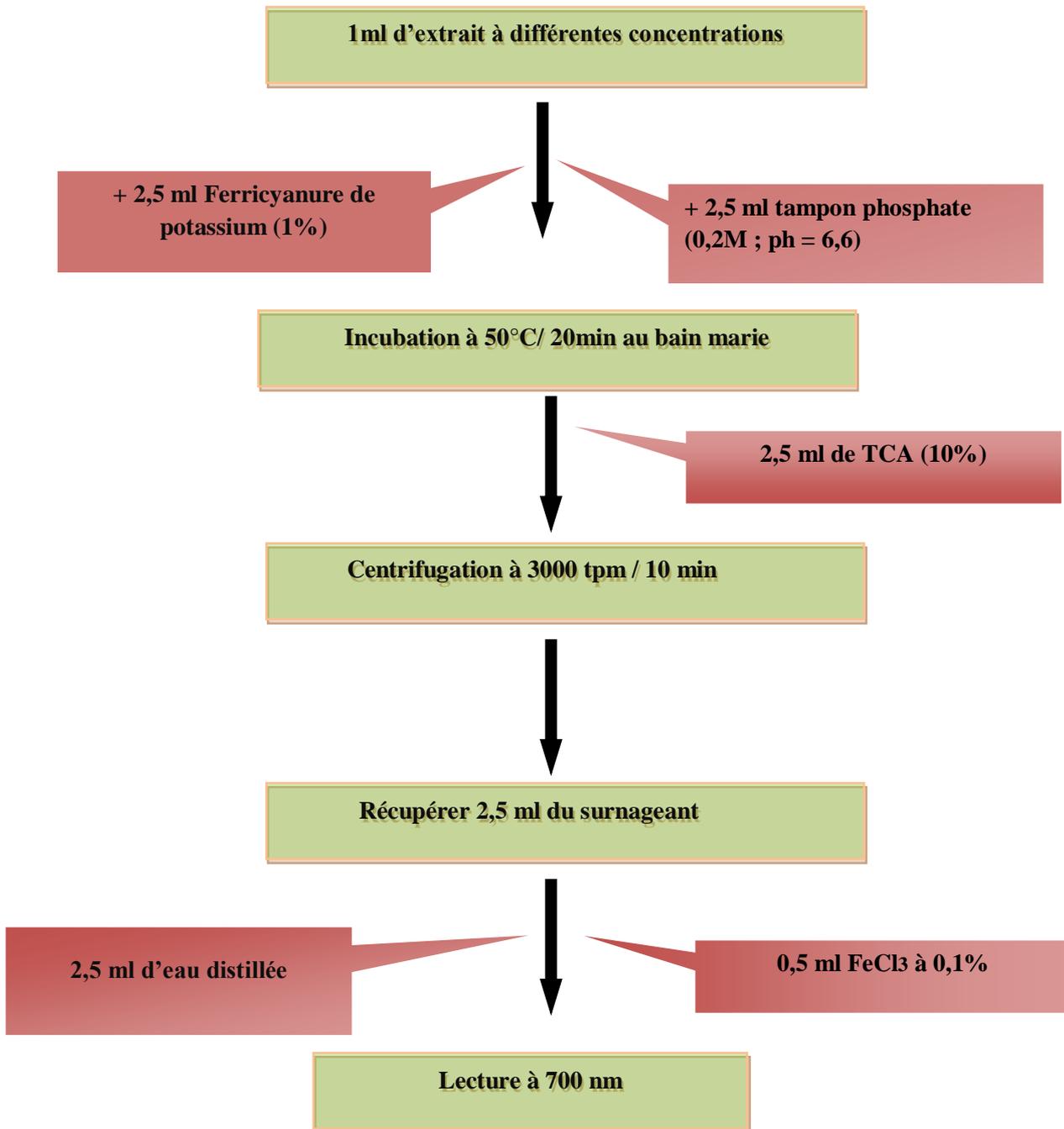


Figure 12: Protocole d'évaluation du pouvoir réducteur FRAP (Rohman et al., 2010).

*Résultats et
Interprétation*

Résultats et interprétation

L'activité antioxydante de nos acides aminés a été évaluée par la méthode de **FRAP**, qui est basée sur la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}).

Les résultats obtenus sont explorés en traçant les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées et la molécule de référence (l'acide ascorbique).

1-Effet de l'acide ascorbique sur la réduction de Fer:

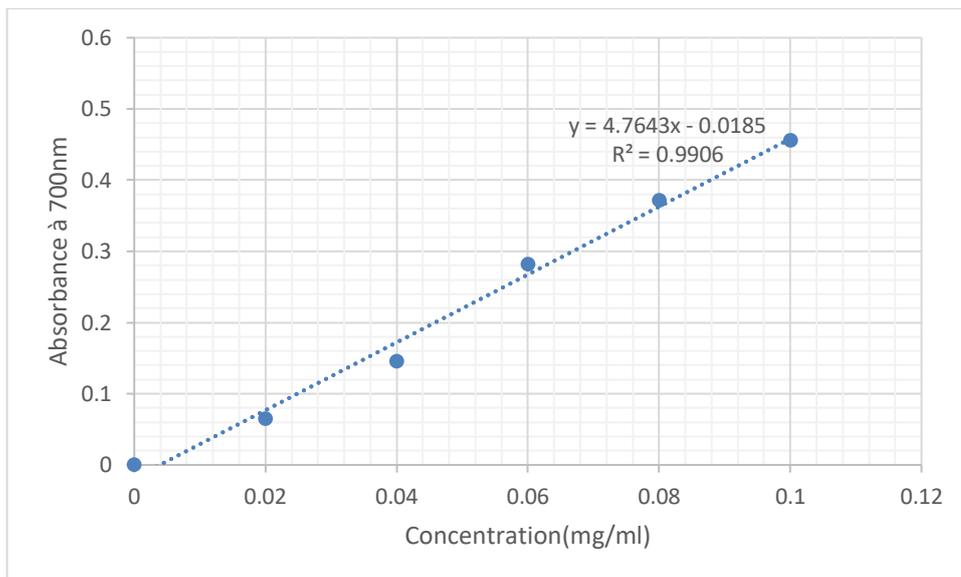


Figure 13 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide ascorbique

D'après la figure 13, on constate que l'acide ascorbique a un effet antioxydant important. La réduction de Fer est proportionnelle à concentration de l'acide ascorbique.

On dit que les absorbances sont proportionnelles aux concentrations.

2-Effet de l'acide aminé phénylalanine sur la réduction de Fer :

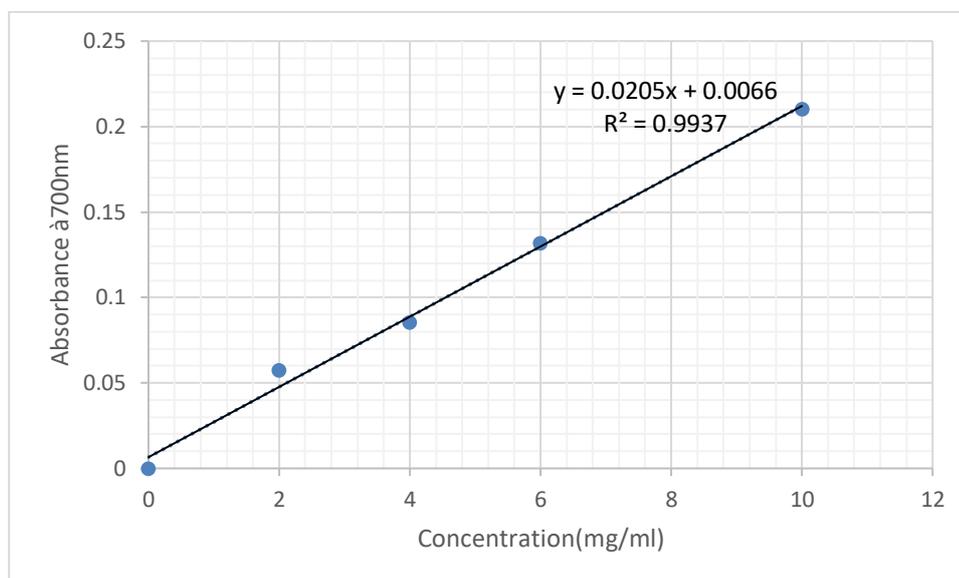


Figure 14: Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations de l'acide aminé phénylalanine

On remarque que la phénylalanine a un effet anti oxydant sur la réduction du Fer.

3-Effet de l'acide aminé leucine sur la réduction de Fer :

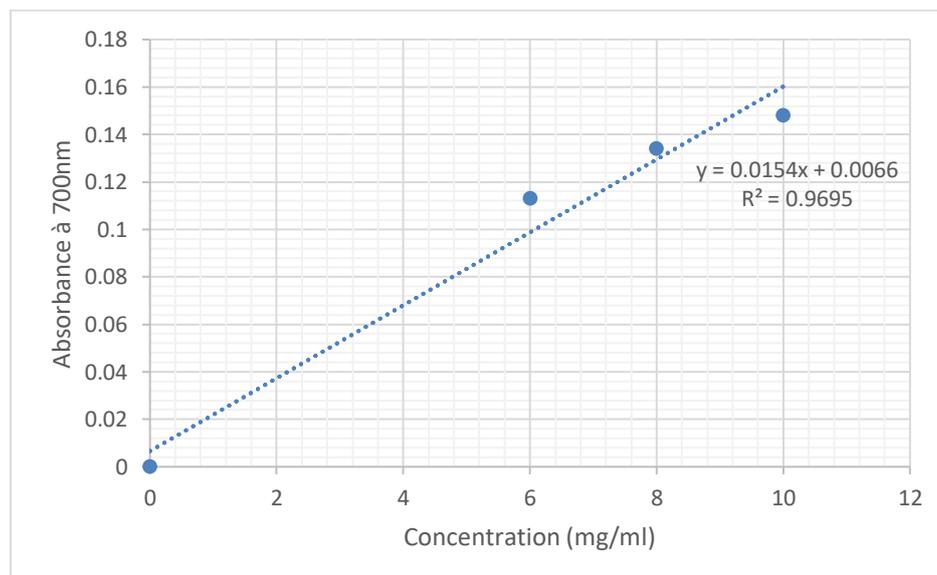


Figure 15 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide aminé leucine

Résultats et interprétation

On voit que la leucine a un effet anti oxydant moins important que celui de la phénylalanine et l'acide ascorbique.

4-Effet de l'acide aminé aspartate sur la réduction de Fer:

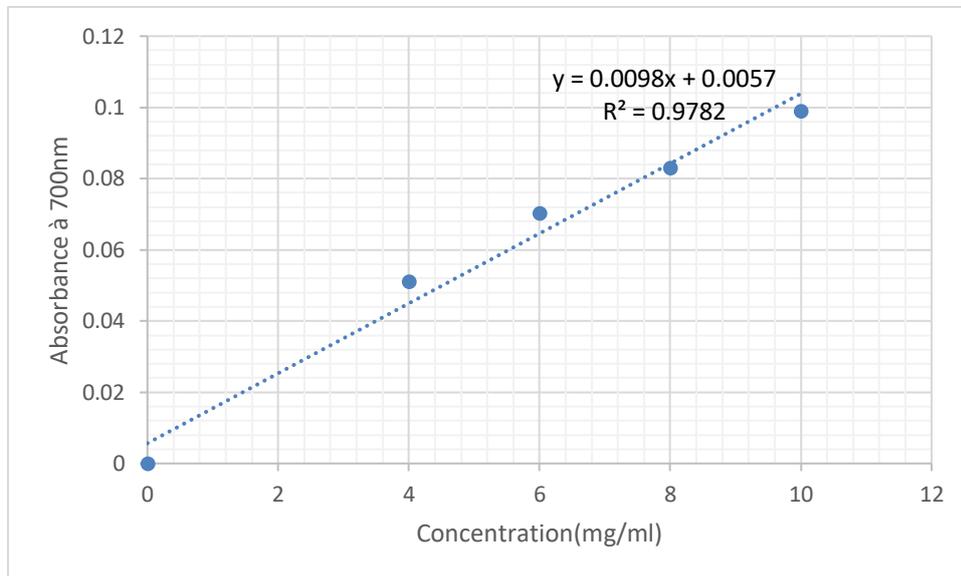


Figure 16: Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide aminé L-aspartate

On remarque que l'aspartate a un effet antioxydant moins important.

5-Effet de l'acide aminé méthionine sur la réduction de Fer :

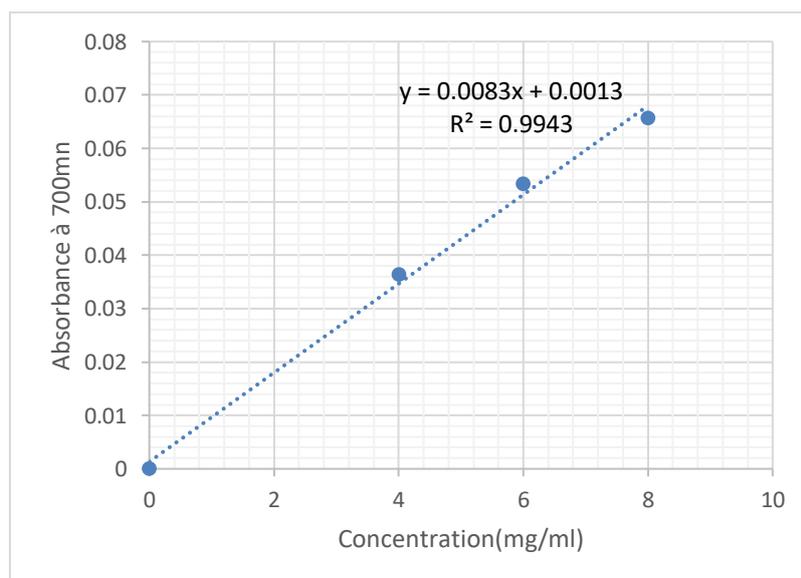


Figure 17: Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide aminé méthionine

La méthionine a un effet antioxydant moins important que l'acide ascorbique.

6-Effet de l'acide aminé glutamine sur la réduction de Fer :

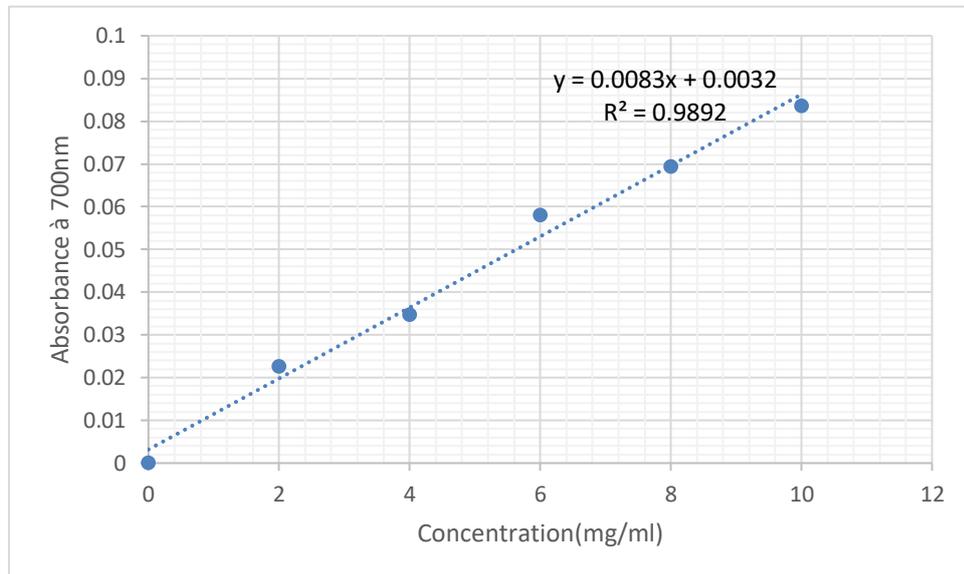


Figure 18 : Graphe représentatif de la variation des absorbances mesurées en fonction des concentrations d'acide aminé glutamine

On remarque que la glutamine a un effet anti oxydant moins important que l'acide ascorbique, ce qui indique qu'il y a réduction de Fer mais peu intéressante.

Donc, nous pouvons déduire que les acides aminés étudiés possèdent une capacité à réduire le fer, mais elle reste inférieure à celle de la molécule de référence.

Ces résultats sont confirmés par les valeurs d'EC₅₀ qui présente la concentration qui correspond à une absorbance de 0,5 (**Zhen et al., 2013**).

Cette concentration est calculée à partir de l'équation de la régression linéaire indiquée sur les figures précédentes. Plus EC₅₀ est faible plus le pouvoir réducteur est important.

Les valeurs sont résumées dans le tableau 12.

Résultats et interprétation

Tableau 12: valeur des EC₅₀ des acides aminés étudiés et l'acide ascorbique.

Acides amines	Acide ascorbique	Phénylalanine	Leucine	Aspartate	Méthionine	Glutamine
EC ₅₀ (mg/ml)	0,109	24,068	32,038	50,435	60,156	66,945

L'étude de l'activité réductrice du fer montré que l'acide ascorbique a l'EC₅₀ la plus faible (0,1 mg/ml), suivi par la phénylalanine (24,068 mg/ml), la leucine (32,038mg/ml), l'aspartate (50,435mg/ml) et la méthionine (60,156mg/ml).

Par contre, la glutamine présente la valeur d'EC₅₀ la plus élevée 66,9452 mg/ml.

Discussion

Discussion

La connaissance des acides aminés est importante, car ils sont à la base de la construction des protéines, classe majeure parmi les macromolécules du vivant. Cependant, les propriétés individuelles peuvent être plus ou moins fortement modifiées en fonction de leur environnement. A l'extrême, les fonctions acides carboxyliques et amines portées par le carbone alpha sont presque toutes mobilisées par les liaisons peptidiques. D'une façon plus subtile, l'histidine peut voir sa charge varier en fonction de son micro environnement, son pHi étant proche du pH physiologique, d'où son utilisation au niveau du site actif de certaines enzymes. Il existe également de nombreux exemples de modification chimique se déroulant après la traduction et modifiant de fait les propriétés décrites. S'il est donc essentiel de connaître le répertoire en acides aminés pour comprendre la biochimie, cette connaissance ne saurait dispenser de l'étude des nombreux cas particuliers que constituent les polymères de ces molécules, à savoir les peptides et les protéines.

L'oxydation est un phénomène complexe, qui met en jeu des espèces moléculaires très réactives et très labiles, ce qui peut rendre son étude difficile. C'est un phénomène irréversible : il convient de s'assurer de la qualité des matières premières utilisées, de lutter contre l'apparition des facteurs déclenchant (stress, UV, pollution, etc.). C'est un phénomène qui s'autoalimente : une fois que la réaction est initiée, les réactions en chaîne se poursuivent, et ne s'arrêtent qu'une fois toute la matrice oxydée. Seule l'intervention d'agents de terminaison comme des antioxydants peuvent avoir une influence.

1-Acide Ascorbique :

L'acide ascorbique est un élément nutritionnel important dans l'organisme. Elle joue un rôle essentiel dans de nombreuses réactions métaboliques. Elle favorise le tonus, stimule les défenses immunitaires, aide le métabolisme du Fer et est anti oxydante : elle interagit avec les radicaux libres $\text{OH} \cdot$; O_2^- responsable de l'altération des cellules ; et les transforme en molécules non toxique. L'agent oxydant habituel est l'oxygène (**Christen *et al.*,2004**).

Phénomène oxydation : l'acide ascorbique, très sensible a la lumière et a la chaleur, s'oxyde facilement. Cependant un milieu acide a un effet protecteur, c'est pourquoi il est mieux conserve dans les citrus: citron, orange, pamplemousse et dans les fruits acides (**Christen *et al.*,2000**).

2-Phénylalanine :

Phénylalanine est un composant de source exogène (nourritures). Il est prescrit comme un agent antidépresseur. La phénylalanine est un acide aminé essentiel. Outre son utilisation dans la synthèse des protéines, la phénylalanine est hydroxylée en tyrosine par la phénylalanine hydroxylase (EC.1.14.16.1) dans le foie. Le défaut de cette hydroxylation est responsable du syndrome biochimique d'hyperphénylalaninémie, dont la phénylcétonurie représente l'étiologie la plus fréquente.

3-Leucine :

C'est un acide aminé à chaîne ramifiée, constituant. La leucine a été la plus étudiée car son taux d'oxydation est supérieur à celui de glutamine ou de la méthionine. La leucine stimule également la synthèse des protéines dans le muscle et est étroitement associée à la libération de précurseurs gluconéogènes, tels que l'alanine, par le muscle.

4-La glutamine :

Elle est non essentielle, puisque activement synthétisée dans un certain nombre de tissus, principalement dans le muscle. Elle joue un rôle clé dans les tissus à multiplication cellulaire active comme l'intestin et le tissu immunitaire. L'intestin extrait la glutamine, qui est non seulement le premier carburant de l'entérocyte, mais aussi un précurseur de bases puriques et pyrimidiques **etc. (Motil et al., 1998).**

5-Arginine :

L'arginine est un précurseur et un activateur de l'uréogénèse dans le foie, mais elle possède une foule d'autres fonctions. Elle semble avoir un effet trophique, puisqu'elle accroît la synthèse cutanée de collagène (**Coëffier et al., 2003**). Cet effet implique vraisemblablement plusieurs mécanismes :

- La stimulation de la sécrétion d'insuline et d'hormone de croissance (donc de son médiateur, l'*insulin-like growth factor 1*, IGF-1).
- Le rôle de précurseur d'ornithine, donc des polyamines, via l'ornithine-décarboxylase.

Activité antioxydante:

Pour la méthode de FRAP, nous avons remarqué une augmentation proportionnelle de la réduction du fer avec l'augmentation des concentrations des acides aminés.

Comme nous avons pu le voir précédemment que les échantillons étudiés présentent une capacité réductrice du fer, nous pouvons les classer comme suit : Phénylalanine ($EC_{50}=24,068$ mg/ml) ; Leucine ($EC_{50}=32,038$ mg/ml) ; Aspartate ($EC_{50}= 50,435$ mg/ml) ; méthionine ($EC_{50}= 60,15$ mg/ml) et la Glutamine ($EC_{50}= 66,945$ mg/ml).

Le pouvoir réducteur de l'acide aminé synthétisé est probablement dû à la présence des groupements hydroxyles qui peuvent servir comme donneur des électrons aux radicaux libres réactifs, les convertissant en espèces non-réactives.

De même quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle **(El-haci et Atik-Bekkara, 2011)**.

Conclusion

Dans une optique d'évaluer l'activité antioxydante de quelques acides aminés synthétiques en suivant les étapes du test de **FRAP**, notre étude a été orientée sur des acides aminés synthétiques (phénylalanine, aspartate, glutamine, méthionine et leucine).

On a déduit que les acides aminés étudiés possèdent une capacité antioxydante modérée et inférieure à celle de la molécule de référence ensuite les calculs des EC_{50} de chaque acide aminé nous ont permis de les classer du plus fort au plus faible en capacité de réduction de fer dans un ordre croissant des EC_{50} de chaque acide aminé.

Nous avons obtenu un EC_{50} de 24,08mg/ml pour l'acide aminé phénylalanine et un EC_{50} de 66,94 mg/ml pour la glutamine. Nous avons conclu que la phénylalanine est la plus forte en capacité antioxydante par rapport aux autres acides aminés utilisés ; la glutamine est la plus faible.

De façon générale il sera nécessaire d'étudier tous les acides aminés synthétiques existants d'une manière détaillée et approfondie en essayant plusieurs méthodes concernant l'évaluation antioxydante.

Le sujet d'étude manque beaucoup de recherche et de sources la molécule d'un acide aminé a beaucoup de potentiel métabolique et de caractéristiques chimiques et pharmacochimiques originales qui doivent être valorisés.

Références bibliographiques

- ❖ Mittal M., RizwanSiddiqui M., Tran K., Reddy S.P., Malik A. B. ; Antioxydants & Redox Signaling 2014, 20, 1126-1167 ; dx.doi.org/10.1089/ars.2012.5149
- ❖ www.cervco.fr/fr/maladie/questions-frequentes.
- ❖ LEVERVE, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants ? Cahiers de Nutrition et de Diététique, 44(5), pp.219-224.
- ❖ Stary H. C., Chandler A. B., Dinsmore R. E., Fuster V., Glagov S., Insull W., Rosenfeld M. E., Schwartz C. J., Wagner W. D., Wissler R. W. ; Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1995, 15, 1512 ; dx.doi.org/10.1161/01.ATV.15.9.1512.
- ❖ Gallard H, De Laat, J. et Legube, B Article publié dans Revue des sciences de l'eau (savante, fonds Érudit) 1999.
- ❖ Marc, Françoise, Davin, André, Deglène-Benbrahim, Laurence, Ferrand, Carine, Baccaunaud, Michel et Fritsch, Pierre méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments article publié dans M/S : médecine sciences, 2004.
- ❖ Yohan ROLLAND BurgundyBotanicalExtracts, Actiparc de Pont de Vaux, Les Chapelles Sud, 01190 Reyssouze – France
- ❖ Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., &Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechashastata*. Food Chemistry, 111(2), 400-407
- ❖ Habibou, H. H., Idrissa, M., Ikhiri Khalid, P., & Benjamin, O. (2019) Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detariummicrocarpum*Guill. &Perr.
- ❖ Finkel T. Redox-dependent signal transduction. FEBS Lett2000 .

- ❖ El-Haci, I. A., & Bekkara, F. A. (2011). Antioxidant activity of stems and leaves organic fractions of *Ecballium elaterium* L. *Annals of Biological Research*,
- ❖ Christen B, Will JC, Byeres T (2000). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin A, C and E. *New Rev* .54.193-202
- ❖ Christen WG, Gaziano JM, Hennekens CH (2000). Design of physicians Health Study 2- A randomized trial of beta carotene and multivitamins, In prevention of cancer; 10-125-134.
- ❖ Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, et al. Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 47-53.
- ❖ Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987.
- ❖ Juan Pablo Saucedo-Vázquez, Peter M. H. Kroneck, Martha Elena Sosa-Torres. The role of molecular oxygen in the iron(iii)-promoted oxidative dehydrogenation of amines 2015.
- ❖ Michel Sever .Les acides aminés : Propriétés Physico-chimiques Université Joseph Fourier de Grenoble 2012.
- ❖ Department of Internal Medicine, University of Graz (S. Wallner, T. C. Wascher); Department of Biochemistry, Technical University of Graz (A. Hermetter, B. Mayer), Austria. Correspondence to: Thomas C. Wascher, MD, Professor of Internal Medicine, Department of Internal Medicine, Auenbrug .
- ❖ Wilcken, D. E., & Wilcken, B. (1976). The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism.
- ❖ K.J. Motil et al. Whole body leucine and lysine metabolism studied with C leucine and [alpha-15N]lysine: response in healthy young men given excess energy intake.
- ❖ M. Coëffier et al. 2003. Modulating effect of glutamine on IL-1beta-induced cytokine production by human gut.
- ❖ Castaneda O.A., Lee S.-C., Ho C.-T., Huang T.-C. ; *Journal of Food and Drug Analysis* 2017, 25, 111-118 ; dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.006.
- (42) Yehye W. A., Rahman N. A., Ariffin A., Abd Hamid S. B., Alhadi A. A., Kadir F. A.,
- ❖ Yaeghoobi M. ; *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 101, 295-312 ; dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026.

❖ Carochó M., Ferreira I. C. ;*Food and Chemical Toxicology* 2013, 51, 15-25 ;
[dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021).

❖ Mittal M., RizwanSiddiqui M., Tran K., Reddy S.P., Malik A. B. ;*Antioxydants & Redox Signaling*, 2014, 20, 1126-1167 ; [dx.doi.org/10.1089/ars.2012.5149](https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149).