

Contribution à l'étude des propriétés antioxydantes ou pro-oxydantes des phospholipides†

Brahim Saadan, Bernard Le Tutour* and Francis Quemeneur

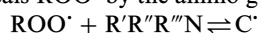
Université de Nantes, IUT de Saint-Nazaire, Laboratoire de Génie des Procédés, BP 420, 44606 Saint-Nazaire cédex, France

Oxidation properties of phospholipids: mechanistic studies. The antioxidant effects of phospholipids in the dark have been investigated by kinetic studies in a model system. The oxidation of methyl linoleate, thermally induced at 60 °C by azobisisobutyronitrile (AIBN), was performed in heptanol or in ethyl heptanoate in the presence of phosphorylated diacylglycerols. The diphenyl ester of dipalmitoyl phosphatidic acid (DPPA_{Ph}) showed no significant activity, under all experimental conditions used. In heptanol, the dibutyl phosphatidylcholine (DBPC) was slightly antioxidant, but all dipalmitoyl phospholipids (except DPPA_{Ph}) exhibited a pro-oxidant activity. However, such a negative effect did not occur in ethyl heptanoate.

The effects of phospholipids (5×10^{-4} M) on the radical scavenging activity of vitamin E (4×10^{-4} M) were investigated at 60 °C by the same kinetic studies. In heptanol, the results were closely related to the chemical class of phospholipids: compounds that contained an amino group synergistically extended the induction period arising from vitamin E, whereas other compounds were pro-oxidant or ineffective. In ethyl heptanoate, all phospholipids, except DPPA_{Ph} and DBPC, showed negative synergism when methyl linoleate and vitamin E were used simultaneously. Hence, the results were hardly affected by the fatty acid chain length within the phospholipids.

The effect of the addition of dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (DPPE, 5×10^{-4} M) together with vitamin E (4×10^{-4} M) on the non-induced oxidation of methyl linoleate was investigated at 60 °C in heptanol or in ethyl heptanoate. DPPE acted synergistically with vitamin E in both solvents.

It is suggested that the enhanced effect of aminophospholipids R'R''R'''N for vitamin E in heptanol results from the complexation of peroxy free radicals ROO· by the amino group:



yielding complexed radicals C·, which are less reactive toward vitamin E than the uncomplexed ones. In ethyl heptanoate, it is suggested that the amphiphilic phospholipid molecules aggregate to form reverse micelles, thereby enhancing the accessibility of vitamin E to linoleylperoxy radicals.

Nos recherches de substances antioxygènes naturelles dans les extraits d'algues¹ nous ont conduit à examiner les propriétés antioxydantes des phospholipides, et plus particulièrement l'effet de synergie qu'ils exercent sur les propriétés antioxydantes de la vitamine E (TH).

Une abondante littérature décrit les propriétés antioxydantes des phospholipides et leur mode d'action.²⁻¹⁶ Les phospholipides les plus étudiés ont été les phospholipides naturels extraits du soja (lécithines), ainsi que les phospholipides synthétiques: la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI) et l'acide phosphatidique (PA). Les conditions expérimentales étaient très variables, tant en ce qui concerne le substrat (linoléate de méthyle, saindoux, huile de soja, huile de tournesol, huile de poisson, etc.) que les températures de travail (de 55 à 180 °C). Aucun amorceur n'était incorporé dans le milieu réactionnel.

La plupart des auteurs s'accordent sur le fait que lorsqu'ils sont utilisés seuls, les phospholipides n'exercent qu'un léger effet. Toutefois, si les propriétés antioxydantes, même légères, de PE et PS font l'unanimité, PC, PI et PA peuvent à l'occasion se révéler pro-oxydants ou sans effet.^{6,7}

Les propriétés antioxydantes des phospholipides résident essentiellement dans la synergie qu'ils développent avec les tocophérols ou les polyphénols.^{3,6-8,10,11} Plusieurs hypothèses ont été suggérées pour expliquer le mécanisme de cette synergie:

(i) un pouvoir chélatant des cations,²⁻⁴ qui réduirait l'effet catalytique de ceux-ci sur la vitesse de décomposition des hydroperoxydes en radicaux libres;

(ii) une décomposition des hydroperoxydes sans formation de radicaux libres;^{5,6,13}

(iii) la régénération de l' α -tocophérol à partir des radicaux α -tocophéroxyles;^{3,7,11,16}

(iv) la régénération de l' α -tocophérol par réaction entre PE et l' α -tocophérylquinone.¹⁵

Certains auteurs⁸ ont mentionné la nécessité d'une température de travail assez élevée, supérieure à 80 °C, pour qu'apparaisse l'effet de synergie.

Deux études récentes^{17,18} ont été réalisées dans des systèmes modèles où l'oxydation était amorcée par la décomposition thermique d'un diazoïque. Dans ces conditions les résultats expérimentaux étaient sensiblement différents. Burlakova *et al.*¹⁷ ont montré que dans l'oxydation induite de l'éthylbenzène, PC n'avait aucune action quand elle était utilisée seule, et qu'elle réduisait les pouvoirs antioxydants du 4-*tertio*-butylphénol et du 4-méthoxyphénol. L'étude de l'oxydation induite de la vitamine E réalisée par Koga et Terao¹⁸ montrait qu'en phase homogène PE et PC n'avaient aucune influence sur la vitesse de consommation de la vitamine E, ceci dans deux milieux de polarité différente.

Nous décrivons ici une étude cinétique de l'oxydation, induite ou non par l' α,α' -azobisisobutyronitrile (AIBN), du linoléate de méthyle en présence de différents phospholipides synthétiques, seuls ou associés à la vitamine E. Nous avons aussi examiné l'oxydation induite de la vitamine E en présence

† Unité non-SI utilisée: Torr \approx 133.3 Pa.

de phosphatidyléthanamines substituées. Nous tentons, à l'aide d'un schéma cinétique détaillé, de rendre compte de quelques résultats observés.

Partie expérimentale

Tous les solvants ainsi que l'amorceur AIBN étaient des produits Fluka de pureté maximale. La teneur en eau de l'heptanoate d'éthyle, mesurée par la méthode classique de Karl-Fisher, était de 0,2 g L⁻¹. La vitamine E était le DL- α -tocophérol de pureté $\geq 98\%$ (Fluka). Le linoléate de méthyle de pureté $\approx 95\%$ provenait de chez Sigma, ainsi que tous les phospholipides (Tableau 1).

Mesure par chromatographie liquide haute performance (CLHP) de la consommation de dimyristoyl phosphatidyléthanamine (DMPE)

La DMPE était choisie plutôt que la DPPE pour des raisons de solubilité dans la phase mobile. La DMPE était dosée par chromatographie liquide haute performance sur une colonne Lichrosorb Si 60 5 μm , de longueur 25 cm et de diamètre interne 4,6 mm thermostatée à 40 °C, avec une élution à 1 mL min⁻¹ par la phase mobile CH₃CN : CH₃OH : H₃PO₄ (900 : 95 : 5 v/v/v), préchauffée à 40 °C depuis la pompe. La détection était réalisée à 210 nm.

Les autres techniques expérimentales ont été décrites précédemment,^{1,19} de même que l'estimation de la période d'inhibition t_{inh} , la détermination du coefficient d'effet cage e , et la vitesse d'amorçage R_i .

Calcul du pourcentage de synergie

Nous avons estimé l'effet de synergie par l'expression: Synergie/% = $100 \cdot [t_{\text{inh}}^{\text{TH,PL}} / (t_{\text{inh}}^{\text{TH}} + t_{\text{inh}}^{\text{PL}}) - 1]$, où $t_{\text{inh}}^{\text{TH}}$, $t_{\text{inh}}^{\text{PL}}$ et $t_{\text{inh}}^{\text{TH,PL}}$ sont les valeurs moyennes des temps d'inhibition observés respectivement en présence de vitamine E, de phospholipide, et du mélange de ces deux composés. En fait, dans cette formule, $t_{\text{inh}}^{\text{PL}} = 0$ (voir dans la partie résultats).

Résultats

Les vitesses initiales de consommation des différents réactifs, utiles à la discussion, sont rassemblées dans le Tableau 2.

Oxydation induite par l'AIBN du linoléate de méthyle en présence de phospholipides

Nous avons examiné l'influence de la concentration initiale de la dipalmitoyl phosphatidyléthanamine (DPPE) sur l'oxydation induite par l'AIBN du linoléate de méthyle dans l'heptanol à 60 °C sous 750 torr d'oxygène. Les courbes d'absorption d'oxygène représentées sur la Fig. 1 montrent

Tableau 1 Noms, sigles et structures des phospholipides étudiés

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_3-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{R}_2 \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ \text{R}_3-\text{C}-\text{O} \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$				
Nom	Sigle	R ₁	R ₂	R ₃
L- α -phosphatidyléthanamine, dilauroyl	DLPE	H	CH ₂ CH ₂ NH ₂	C ₁₁ H ₂₃
L- α -phosphatidyléthanamine, dimyristoyl	DMPE	H	CH ₂ CH ₂ NH ₂	C ₁₃ H ₂₇
L- α -phosphatidyléthanamine, dipalmitoyl	DPPE	H	CH ₂ CH ₂ NH ₂	C ₁₅ H ₃₁
L- α -phosphatidyl-N-méthyléthanamine, dipalmitoyl	DPPE(NHMe)	H	CH ₂ CH ₂ NHCH ₃	C ₁₅ H ₃₁
L- α -phosphatidyl-N,N-diméthyléthanamine, dipalmitoyl	DPPE(NMe ₂)	H	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	C ₁₅ H ₃₁
L- α -phosphatidyl-N-palmitoyléthanamine, dipalmitoyl	DPPE(N-palm)	H	CH ₂ CH ₂ NHC(O)R ₃	C ₁₅ H ₃₁
L- α -phosphatidylcholine, dibutyryl	DBPC	H	CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	C ₃ H ₇
L- α -phosphatidylcholine, dipalmitoyl	DPPC	H	CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	C ₁₅ H ₃₁
L- α -phosphatidyl-DL-glycérol, dipalmitoyl	DPPG	H	CH ₂ CHOHCH ₂ OH	C ₁₅ H ₃₁
L- α -phosphatidic acid, dipalmitoyl	DPPA	H	H	C ₁₅ H ₃₁
L- α -phosphatidyl-L-sérine, dipalmitoyl	DPPS	H	CH ₂ CH(COOH)NH ₂	C ₁₅ H ₃₁
1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol, 3-phosphate diphenyl ester	DPPA(Ph ₂)	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	C ₁₅ H ₃₁

Tableau 2 Vitesses initiales de consommation d'oxygène R_{O_2} , de linoléate de méthyle R_{RH} , de vitamine E R_{TH} , et de dimyristoyl phosphatidyléthanamine R_{DMPE} à 60 °C

Solvant	[RH] ₀ /M	[AIBN] ₀ × 10 ³ /M	[TH] ₀ × 10 ⁴ /M	[DMPE] ₀ × 10 ⁴ /M	R_{O_2} × 10 ⁶ /M s ⁻¹	R_{RH} × 10 ⁶ /M s ⁻¹	R_{TH} × 10 ⁸ /M s ⁻¹	R_{DMPE} × 10 ⁹ /M s ⁻¹
Heptanol	0,5	6,3	—	—	3,2	3,1	—	—
	0,5	6,3	—	5	5,2	3,2	—	19
	0,5	6,3	4	—	—	—	3,5	—
	0,5	6,3	4	5	—	—	2,9	≈ 0
	—	6,3	4	—	—	—	2,1	—
	—	6,3	4	5	—	—	2,1	—
	—	6,3	—	5	0,37	—	—	5
	0,5	—	4	—	^b	—	1,4	—
	0,5	—	4	5 ^a	^b	—	0,4	—
	0,5	6,3	4	—	—	—	2,9	—
Heptanoate d'éthyle	0,5	6,3	4	5	—	—	3,3	—
	—	6,3	—	5	0,15	—	—	2,2
	0,5	—	4	—	^b	—	0,017	—
	0,5	—	4	5 ^a	^b	—	0,012	—
	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—

^a DPPE au lieu de DMPE.

^b Valeurs inférieures ou égales au seuil de détection de l'appareillage (3×10^{-8} M s⁻¹).

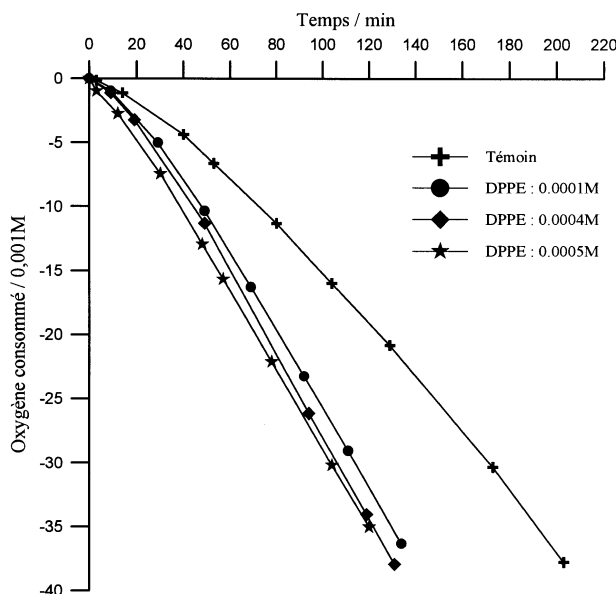


Fig. 1 Oxydation induite à 60 °C par l'AIBN du linoléate de méthyle (0,5 M) en présence de dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine (DPPE) dans l'heptanol. $[AIBN]_0 = 0,0063 \text{ M}$

que l'addition de DPPE augmentait la vitesse initiale R_{O_2} d'absorption d'oxygène par le milieu réactionnel qui passait de $3,2 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$ (témoin) à $5,2 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$ ($[DPPE] = 1-5 \times 10^{-4} \text{ M}$). On note toutefois que l'accélération était pratiquement identique pour les 3 concentrations initiales de DPPE étudiées. Pour l'ensemble des phospholipides étudiés par la suite, les essais ont été réalisés à la concentration initiale de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Nous avons successivement examiné l'action dans notre système modèle des phospholipides répertoriés dans le Tableau 1. Le solvant était l'heptanol ou l'heptanoate d'éthyle. Dans l'heptanol tous les phospholipides accélèrent plus ou moins fortement la consommation d'oxygène, sauf le DPPA Ph_2 et la DBPC (Fig. 2). En particulier, les vitesses de consommation d'oxygène observées en présence de DPPE et DPPS étaient d'environ 60% supérieures à celle du témoin.

Les mesures par chromatographie en phase gazeuse des concentrations résiduelles de linoléate de méthyle RH dans le

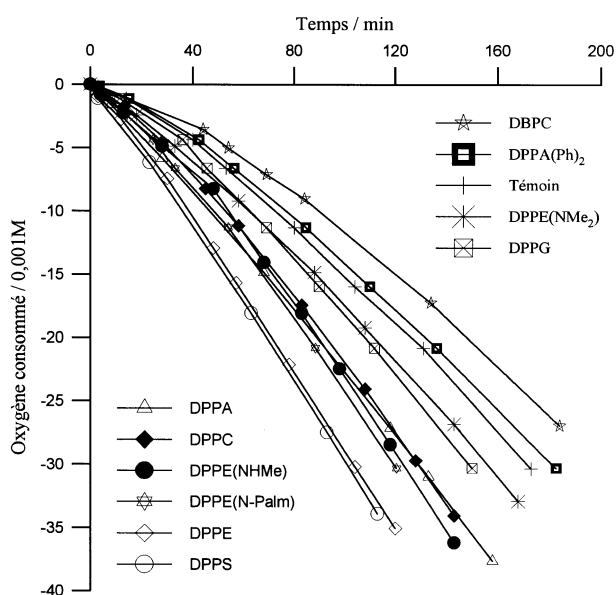


Fig. 2 Oxydation induite à 60 °C par l'AIBN du linoléate de méthyle (0,5 M) en présence de phospholipides (0,0005 M) dans l'heptanol. $[AIBN]_0 = 0,0063 \text{ M}$

milieu réactionnel permettaient d'évaluer, dans les premières heures de la réaction, les vitesses moyennes R_{RH} de consommation du substrat qui étaient pratiquement constantes et respectivement de $3,1 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$ (témoin), $3,2 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$ ($[DPPE] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$) et $3,1 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$ ($[DPPC] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$). Le coefficient de variation estimé des concentrations résiduelles était de 2%. Les coefficients de variation estimés des vitesses moyennes R_{RH} étaient donc d'environ 40% (après 2 heures de réaction), 17% (après 4 heures) et 9% (après 8 heures).

Les courbes d'absorption d'oxygène enregistrées en présence de dilauryl, dimyristoyl ou dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine (DLPE, DMPE ou DPPE) étaient superposables. La vitesse initiale R_{DMPE} de disparition de la DMPE, mesurée par chromatographie liquide haute performance, s'élevait à $1,9 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$. Par contre, alors que la dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) accélérât la consommation d'oxygène, la dibutyryl phosphatidylcholine (DBPC) la freinait légèrement: le phénomène observé dépendait donc de la longueur de la chaîne carbonée des substituants acyles.

Dans l'heptanoate d'éthyle, les phospholipides étudiés n'exerçaient aucun effet significatif, comme le montre la Fig. 3: toutes les vitesses de consommation d'oxygène restaient sensiblement égales à celle du témoin. La longueur de la chaîne carbonée des groupements acyles n'avait aucune influence.

Inhibition par les mélanges vitamine E-phospholipides de l'oxydation induite du linoléate de méthyle

L'oxydation induite par l'AIBN du linoléate de méthyle RH en présence des mélanges vitamine E-phospholipides a été étudiée dans l'heptanol et dans l'heptanoate d'éthyle, à 60 °C sous 750 torr d'oxygène. La concentration initiale $[TH]_0$ était fixée à $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ suite aux résultats que nous avons observés en présence d'extraits d'algues.¹ Les courbes d'absorption d'oxygène sont représentées sur les Fig. 4 et 5.

Alors que dans l'expérimentation précédente ils n'avaient montré aucun effet dans l'heptanoate d'éthyle, les dipalmitoyl phospholipides exerçaient ici une action pro-oxydante, à l'exception de DPPA Ph_2 qui restait toujours sans effet. La vitamine E était consommée plus rapidement en leur présence. Les mesures par chromatographie liquide haute performance des concentrations résiduelles de vitamine E dans le milieu réactionnel confirmaient ce résultat: nous avons évalué la

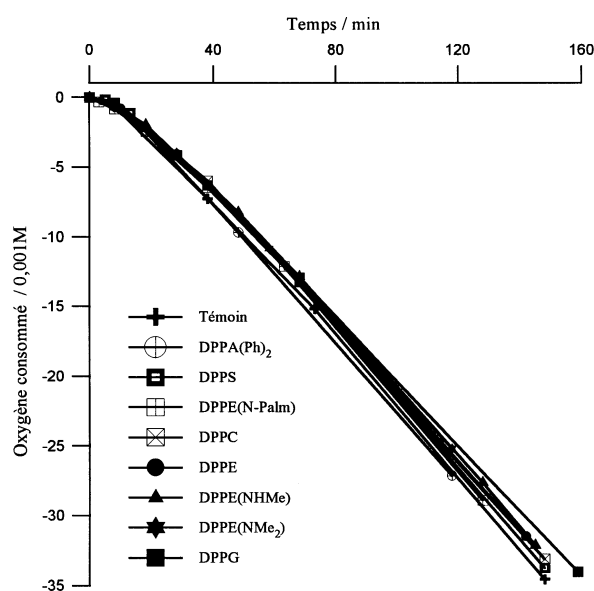


Fig. 3 Oxydation induite à 60 °C par l'AIBN du linoléate de méthyle (0,5 M) en présence de phospholipides (0,0005 M) dans l'heptanoate d'éthyle. $[AIBN]_0 = 0,0063 \text{ M}$

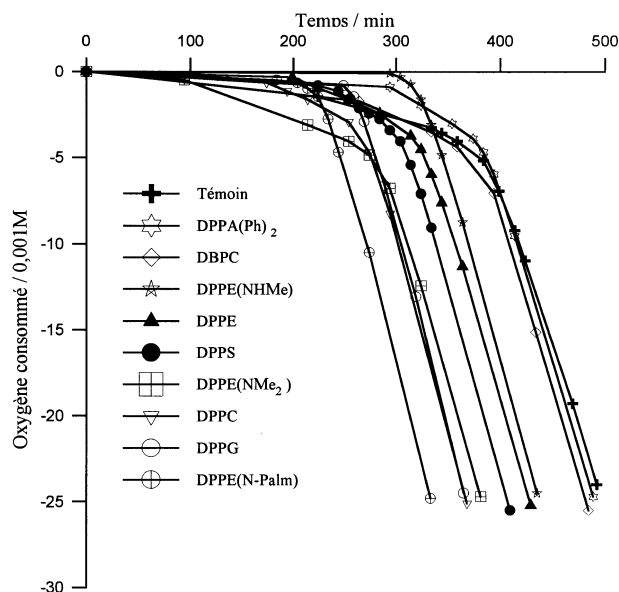


Fig. 4 Oxydation induite à 60 °C par l'AIBN du linoléate de méthyle (0,5 M) en présence de vitamine E (0,0004 M) et de phospholipides (0,0005 M) dans l'heptanoate d'éthyle. $[AIBN]_0 = 0,0063$ M

vitesse initiale R_{TH} de consommation de vitamine E à $2,9 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$ pour le témoin, et à $3,3 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$ en présence de DPPE ou DMPE ou DLPE à la concentration de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Tableau 2). La dibutyl phosphatidylcholine (DBPC) se distinguait par une absence d'effet (Fig. 4): le phénomène pro-oxydant était ici aussi dépendant de la longueur des chaînes acyles.

Dans l'heptanol, plusieurs phospholipides exerçaient un effet de synergie sur les propriétés antioxydantes de la vitamine E (Fig. 5). Cet effet était réellement sensible pour la DPPC et la DBPC (15%), la DPPE (18%), la DPPE(NHMe) (34%) et la DPPS (47%). Sur la Fig. 5, on remarque que la DBPC et la DPPC exerçaient le même effet de synergie. Par contre, à la fin de la période d'inhibition, la courbe d'absorption d'oxygène observée en présence de la DBPC était parallèle à celle du témoin, tandis que celles observées en présence de la DPPC ou des autres phospholipides présentaient une pente supérieure à celle du témoin: les dipalmitoyl

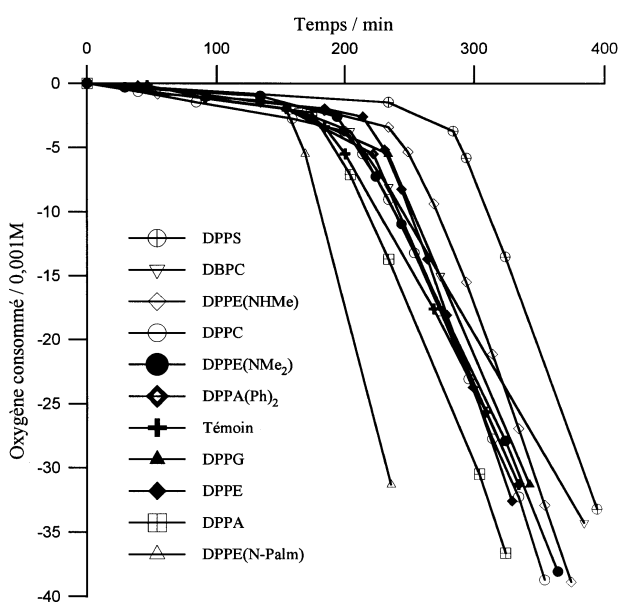


Fig. 5 Oxydation induite à 60 °C par l'AIBN du linoléate de méthyle (0,5 M) en présence de vitamine E (0,0004 M) et de phospholipides (0,0005 M) dans l'heptanol. $[AIBN]_0 = 0,0063$ M

phospholipides (hors DPPA Ph_2) présentaient leur caractère pro-oxydant après la période d'inhibition.

Les mesures de concentrations résiduelles (Fig. 6) réalisées en présence du mélange DMPE-vitamine E montraient que la vitamine E était consommée la première avec une vitesse R_{TH} égale à $2,9 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$. Pendant la période d'inhibition, la concentration du phospholipide variait peu, et la fin de la période d'inhibition coïncidait avec la disparition de la vitamine E du milieu réactionnel. A titre de comparaison, la vitesse initiale R_{TH} de consommation de la vitamine E en l'absence de DMPE était de $3,5 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$.

Sur la Fig. 7, chaque phospholipide a été placé en fonction des effets qu'il développe en présence de la vitamine E dans les deux solvants. On note bien que le DPPA Ph_2 se singularise par son absence d'effet. On peut également remarquer:

(i) que seuls les phospholipides qui contiennent une fonction amine présentent un effet de synergie dans l'heptanol (le DPPA absent du graphe ne développe aucune synergie)

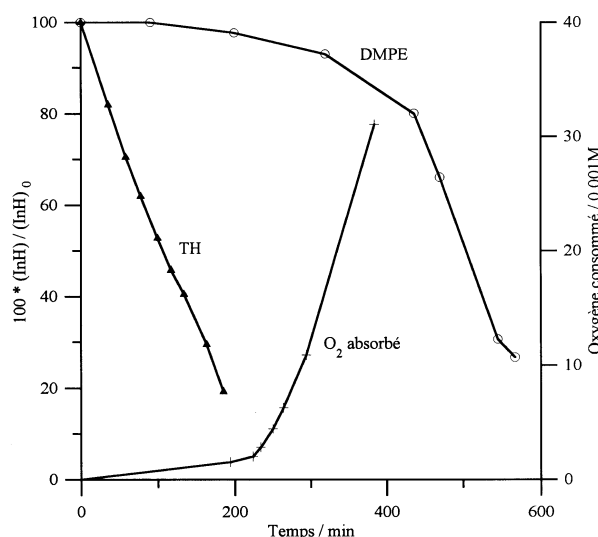


Fig. 6 Oxydation induite à 60 °C par l'AIBN du linoléate de méthyle (0,5 M) en présence de vitamine E (0,0004 M) et de phospholipides (0,0005 M) dans l'heptanol. $[AIBN]_0 = 0,0063$ M

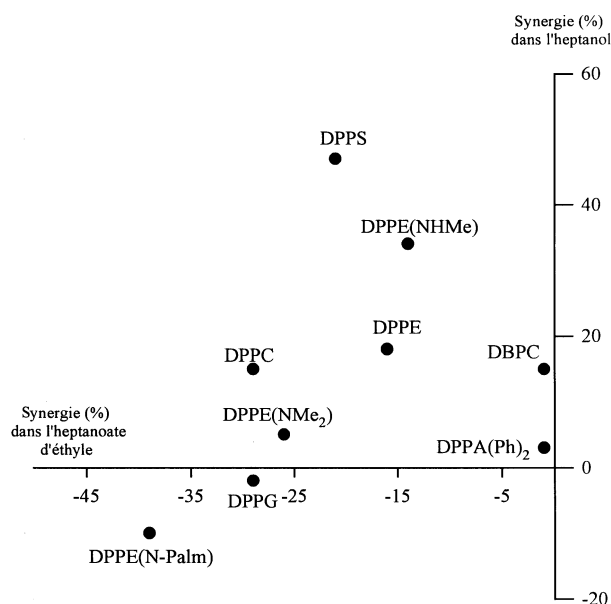


Fig. 7 Comparaison des comportements antioxydants ou pro-oxydants des phospholipides en présence de vitamine E dans l'heptanol et l'heptanoate d'éthyle

(ii) et que pour les dipalmitoyl phospholipides, le meilleur effet de synergie dans l'heptanol et la plus légère action pro-oxydante dans l'heptanoate d'éthyle sont obtenus avec DPPS, DPPE(NHMe) et DPPE, c'est à dire des substances dont la structure comporte une fonction amine primaire ou amine secondaire.

Oxydation induite par l'AIBN des mélanges DMPE (ou DPPE)-vitamine E

Nous avons mesuré les vitesses R_{TH} de disparition de la vitamine E lors de l'oxydation induite des mélanges DMPE (ou DPPE)-vitamine E dans l'heptanol à 60 °C sous 750 torr d'oxygène (Tableau 2). Le phospholipide n'avait pas d'action sur R_{TH} que nous avons évalué à $2,1 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$ en présence ou en l'absence du phospholipide. Ces résultats confirment ceux de Koga et Terao¹⁸ obtenus dans le laurate de méthyle et dans le mélange chloroforme : méthanol : acétonitrile 2 : 2 : 1 (v/v/v).

Nous avons également examiné l'oxydation induite de la DMPE en l'absence de vitamine E. Dans l'heptanol, la vitesse d'initiation R_i était de $4,6 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$. Les valeurs rapportées dans le Tableau 2 montrent que la vitesse R_{DMPE} de consommation de la DMPE était égale à $0,11 R_i$, et que la vitesse d'absorption d'oxygène était d'environ 74 fois supérieure à R_{DMPE} .

Dans l'heptanoate d'éthyle, la vitesse d'initiation R_i était de $5,6 \times 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$. La vitesse de consommation du phospholipide s'élevait alors à $0,04 R_i$ et la vitesse d'absorption d'oxygène à $68 R_{DMPE}$. L'oxydation des solvants en l'absence du phospholipide était négligeable.

Oxydation non induite par l'AIBN du linoléate de méthyle en présence du mélange DPPE-vitamine E

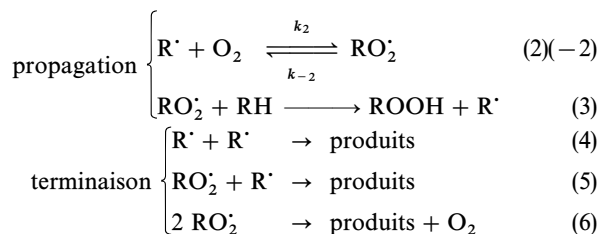
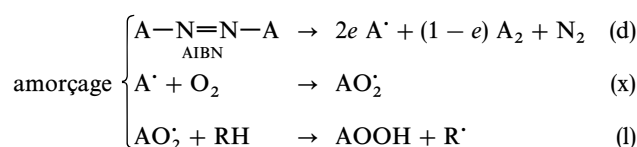
Nous avons mesuré la vitesse R_{TH} de consommation de la vitamine E lors de l'oxydation auto-induite du linoléate de méthyle en présence de vitamine E et de DPPE à 60 °C dans l'heptanol et l'heptanoate d'éthyle, sous 750 torr d'oxygène (Tableau 2). Dans ces conditions, la présence de DPPE réduisait remarquablement R_{TH} , qui passait de $1,4 \times 10^{-8}$ à $4 \times 10^{-9} \text{ M s}^{-1}$ dans l'heptanol et de $1,7 \times 10^{-10}$ à $1,2 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$ dans l'heptanoate d'éthyle. Les vitesses initiales d'absorption d'oxygène étaient alors très faibles, inférieures ou égales au seuil de détection de l'appareillage (mesures très imprécises).

L'addition de DPPE dans le milieu réactionnel produisait donc des effets totalement différents selon que la réaction d'auto-oxydation était amorcée ou non par la décomposition thermique de l'AIBN. Dans l'heptanol, l'effet de synergie était nettement supérieur, et dans l'heptanoate d'éthyle nous observions également un effet de synergie, alors que nous remarquons un effet pro-oxydant quand la réaction était induite par l'AIBN.

Discussion

Le système modèle utilisé ici a été décrit dans le détail par Rousseau-Richard *et al.*^{20,25} L'exploitation des résultats repose sur le schéma cinétique développé ci-après et déjà adopté par plusieurs auteurs.²⁰⁻²⁹

L'oxydation du linoléate de méthyle RH, induite par la décomposition thermique de l'AIBN, relève d'un mécanisme radicalaire en chaîne :



Le coefficient e est introduit dans le processus (d) d'amorçage pour tenir compte de l'effet cage. En l'absence d'inhibiteur, les vitesses d'absorption d'oxygène R_{O_2} et de consommation de linoléate de méthyle R_{RH} étaient égales, confirmant ce schéma.

Réactivité des phospholipides vis à vis des radicaux peroxydes

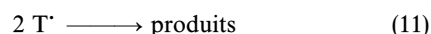
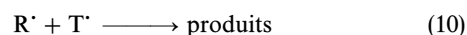
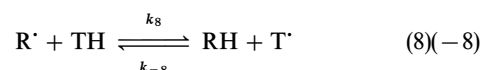
Les phospholipides n'exercent aucun effet antioxydant par eux-mêmes dans l'heptanoate d'éthyle. Ce résultat confirme celui de Burlakova *et al.*¹⁷ obtenu en milieu apolaire. Par contre, le comportement des phospholipides, observé dans l'heptanol en l'absence de vitamine E, est inédit. Tous les phospholipides dont la molécule présente nettement une structure amphiphile accélèrent la consommation d'oxygène.

En présence de linoléate de méthyle, l'augmentation de la vitesse d'absorption d'oxygène R_{O_2} due à la présence du phospholipide DMPE est de $2 \times 10^{-6} \text{ M s}^{-1}$, alors que cette vitesse R_{O_2} n'est que de $3,7 \times 10^{-7} \text{ M s}^{-1}$ en l'absence de linoléate de méthyle. Il semblerait donc que la surconsommation d'oxygène (plus 60%) observée en présence de phospholipide soit due à une oxydation plus rapide du substrat. Les mesures par chromatographie en phase gazeuse des concentrations résiduelles de substrat ne confirment pas ce résultat. Par cette dernière méthode, les valeurs des vitesses moyennes de consommation du linoléate de méthyle mesurées dans les premières heures de la réaction sont pratiquement égales. Il faut cependant noter que ces vitesses sont affectées d'incertitudes élevées, en particulier dans les deux premières heures de la réaction.

En l'absence de linoléate de méthyle, la longueur cinétique de chaîne calculée par rapport à l'oxydation de DMPE est $\lambda = R_{DMPE}/R_i \approx 0,1$ alors que le rapport R_{O_2}/R_i est d'environ 8. On comprend mal comment la DMPE pourrait fixer tant d'oxygène. L'hypothèse la plus plausible dans ce cas serait de suggérer l'oxydation du solvant, l'heptanol. L'analyse des produits d'oxydation reste cependant nécessaire pour expliciter clairement le mécanisme de la surconsommation d'oxygène observée en présence des phospholipides, et en particulier l'action de la longueur des chaînes carbonées des groupements acyles.

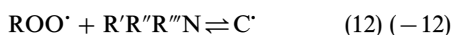
Effet de synergie en association avec la vitamine E

Les propriétés inhibitrices de la vitamine E (TH) dans l'oxydation induite des acides gras polyinsaturés ont déjà été largement décrites dans la littérature.²⁰⁻²⁴ Le schéma cinétique s'enrichit alors des étapes élémentaires suivantes :

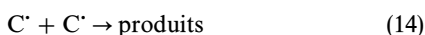
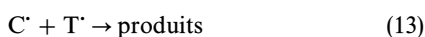


La vitamine E est un antioxydant extrêmement efficace. Les estimations de la constante d'inhibition k_7 relevées dans la littérature sont très dispersées, mais toujours très élevées.²²

Dans un travail précédent,¹⁹ nous avons évalué k_7 à $1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dans l'heptanol et à $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dans l'heptanoate d'éthyle à 60 °C. De plus, toutes conditions expérimentales identiques par ailleurs, la période d'inhibition t_{inh} observée dans l'heptanol était plus courte que celle observée dans l'heptanoate d'éthyle. Lorsqu'ils sont associés à la vitamine E, les phospholipides ont une action totalement différente de celle qu'ils présentent quand ils sont utilisés seuls. Dans l'heptanol, les phospholipides disposant d'une fonction amine exercent un effet de synergie sur les propriétés antioxydantes de la vitamine E. Dans nos conditions expérimentales, la réduction de la vitesse de consommation de vitamine E n'est significative qu'en présence de linoléate de méthyle. Cette synergie a déjà été étudiée par quelques auteurs³⁰⁻³² qui l'ont attribuée à une complexation des radicaux peroxydes ROO^\bullet par le composé aminé $\text{R}'\text{R}''\text{R}'''\text{N}$:



Cette complexation, qui donne des espèces radicalaires C^\bullet , est en compétition avec le processus (7) précédent, et conduit à de nouvelles terminaisons de chaîne qui n'introduisent pas de consommation appréciable de TH:



Dans l'heptanoate d'éthyle, l'apparition d'un effet pro-oxydant nécessite la présence de vitamine E, et une molécule de phospholipide très nettement amphiphile. Celle-ci doit au moins comprendre une fonction hydrogénophosphate (le trialkyl phosphate DPPAPh_2 n'a aucune action), et une longue chaîne carbonée pour l'acide gras qui estérifie le glycérol (la DBPC n'est pas pro-oxydante). On peut remarquer que la vitamine E possède également ce type de structure, avec la fonction phénol d'une part, et la longue chaîne phytyle d'autre part.

Les molécules amphiphiles, tels les phospholipides, sont connues pour se rassembler en agrégats sphériques dans les solvants apolaires,^{33,34} et former des micro-émulsions.³⁵ Par exemple, la DPPC forme des agrégats de 80 à 100 molécules dans le benzène, le chlorobenzène et l'*o*-dichlorobenzène, quand l'eau et le phospholipide sont dans un rapport molaire de 20 : 1.³³ La teneur en eau de l'heptanoate d'éthyle était de 0,2 g L⁻¹, ce qui donne un rapport molaire eau : phospholipide dans le milieu réactionnel d'environ 18 (non comprises éventuellement les traces d'eau contenues dans le linoléate de méthyle, qui n'ont pas été mesurées).

Les parties polaires des molécules de phospholipides sont dirigées vers l'intérieur de ces agrégats (micelles inversées), et la capacité à former des agrégats est d'autant plus grande que la chaîne carbonée des groupements acyles est longue.³⁶ Dans de tels systèmes, Frankel *et al.*³⁷ et Koga et Terao¹⁸ ont montré que la vitamine E s'orientait de façon à positionner la fonction phénol au coeur polaire de l'agrégat. Nous pensons que cet arrangement a pour principale conséquence de favoriser le couplage ultérieur des radicaux tocophéroxyles T^\bullet [réaction (11)], générés par réaction de la vitamine E avec les radicaux linoléylperoxydes ROO^\bullet (Fig. 8). Il s'en suit une consommation accélérée de la vitamine E. Le phospholipide le plus apte à former ces agrégats est la DPPE(NPalm), et c'est lui qui dispose du plus grand pouvoir pro-oxydant.

Les mécanismes que nous venons de développer expliquent également le meilleur effet de synergie de la DPPE observé dans les deux solvants en l'absence d'AIBN. Dans ce cas, l'auto-oxydation du linoléate de méthyle RH est amorcée par la décomposition des traces d'hydroperoxydes ROOH selon les processus:^{28,29,38}

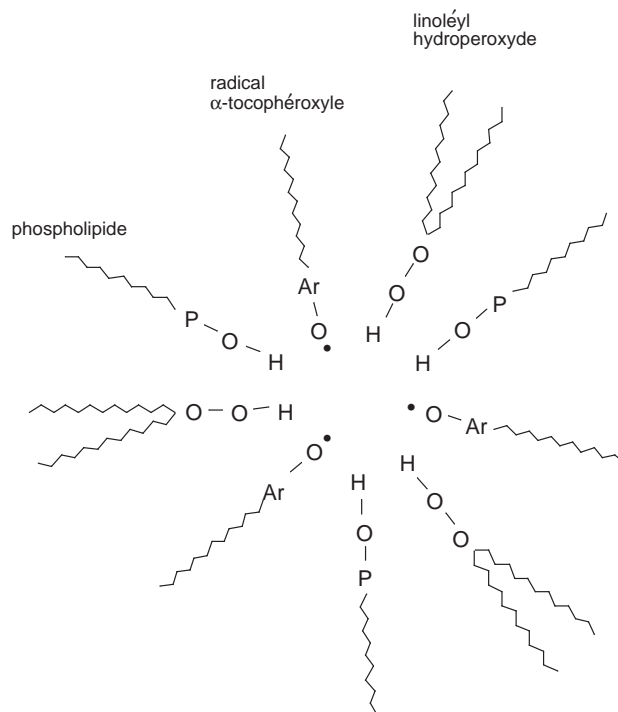
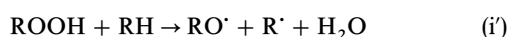


Fig. 8 Schéma d'une micromicelle inversée



Le mécanisme radicalaire se poursuit par les étapes de propagation et de terminaison décrites précédemment. En particulier, le processus de propagation (3) produit des hydroperoxydes, dont la décomposition constitue de nouveaux processus d'amorçage: la réaction est auto-accelérée.

Dans l'heptanoate d'éthyle, en présence de phospholipides, les hydroperoxydes issus du linoléate de méthyle orientent leurs groupements hydroperoxydes vers le coeur polaire de l'agrégat. La formation des radicaux libres se fait donc à proximité immédiate de la fonction phénol de la vitamine E. On pourrait penser que celle-ci serait consommée plus vite, mais en fait le phénomène d'auto-accelération de l'oxydation est supprimé (ou fortement réduit), et l'effet protecteur de la vitamine E s'en trouve prolongé. De plus, le processus (–8) de propagation de l'oxydation est rendu plus difficile, car le site réactionnel du linoléate de méthyle, en milieu de chaîne carbonée, est rendu moins accessible aux radicaux tocophéroxyles T^\bullet .

Dans l'heptanol, la valeur très élevée de la constante k_7 fait que les étapes-clés de la propagation de chaîne sont les processus (2), (7) et (–8) sous pression d'oxygène élevée. Ces processus ne consomment pas directement la vitamine E, mais les hydroperoxydes s'accumulent dans le milieu réactionnel et provoquent l'auto-accelération de l'oxydation décrite plus haut. En complexant les radicaux peroxydes ROO^\bullet par la fonction amine, la DPPE réduit la vitesse de formation des hydroperoxydes [processus (12) en compétition avec le processus (7)] et réduit donc l'auto-accelération. L'effet protecteur de la vitamine E s'en trouve prolongé.

En conclusion, sans préjuger de la validité des mécanismes déjà proposés par les chercheurs et énumérés dans l'introduction, nous estimons que l'effet de synergie exercé par les phospholipides sur les propriétés antioxydantes de la vitamine E peut être expliqué, au moins en partie, par la complexation des radicaux peroxydes ROO^\bullet par la fonction amine dans l'heptanol, et par la formation de micromicelles dans l'heptanoate d'éthyle.

La question reste de savoir si la formation de micromicelles dans l'heptanol doit également être retenue. L'effet pro-

oxydant des dipalmitoyl phospholipides ne disposant pas de fonction amine, observé en présence de vitamine E, nous incite à le penser. L'hypothèse nous a paru pour le moment trop spéculative, car les auteurs ne sont pas unanimes quant à la formation d'aggrégats par les phospholipides dans les alcools. Selon Elworthy et McIntosh,³⁹ les lécithines d'oeufs existaient sous forme de trimères dans le méthanol et formeraient des aggrégats plus volumineux dans les alcools à plus longue chaîne carbonée. D'un autre côté, Barclay *et al.*³³ n'ont pas remarqué de formation d'aggrégats par ces mêmes lécithines dans le *tertio*-butanol. La preuve expérimentale de la formation d'aggrégats par les dipalmitoyl phospholipides dans l'heptanol doit donc être apportée pour pouvoir retenir cette hypothèse. Enfin, le mécanisme de surconsommation d'oxygène en présence de phospholipide et en l'absence de vitamine E reste à éclaircir.

References

- 1 B. Le Tutour, *Phytochemistry*, 1990, **29**, 3759.
- 2 H. Sugino, M. Ishikawa, T. Nitoda, M. Koketsu, L. R. Juneja, M. Kim and T. Yamamoto, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 551.
- 3 Y. Totani, *Nihon Yukagakkaishi*, 1997, **46**, 3; *Chem. Abstr.*, 1997, **126**, 117219q.
- 4 G. Lunde, L. H. Landmark and J. Gether, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1976, **53**, 207.
- 5 J. Pokorny, H. Poskocilova and J. Davidek, *Nahrung*, 1981, **25**, K29.
- 6 B. J. F. Hudson and J. I. Lewis, *Food Chem.*, 1983, **10**, 111.
- 7 B. J. F. Hudson and M. Ghavami, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 1984, **17**, 191.
- 8 S. Z. Dziedzic and B. J. F. Hudson, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, **61**, 1042.
- 9 D. H. Hildebrand, J. Terao and M. Kito, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, **61**, 552.
- 10 Y. Ishikawa, K. Sugiyama and K. Nakabayashi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, **61**, 950.
- 11 S. Z. Dziedzic, J. L. Robinson and B. J. F. Hudson, *J. Agric. Food Chem.*, 1986, **34**, 1027.
- 12 J. Pokorny, J. Davidek, M. Vierecklova, M. Ranny and J. Sedlacek, *Nahrung*, 1990, **34**, 719.
- 13 J. Pokorny, Z. Reblova, M. Ranny, J. Kanova, J. Panek and J. Davidek, *Nahrung*, 1992, **36**, 461.
- 14 M. F. King, L. C. Boyd and B. W. Sheldon, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1992, **69**, 237.
- 15 X. C. Weng and M. H. Gordon, *Food Chem.*, 1993, **48**, 165.
- 16 T. Segawa, S. Hara and Y. Totani, *Yukagaku*, 1994, **43**, 515; *Chem. Abstr.*, 1994, 121, 81393x.
- 17 E. B. Burlakova, L. I. Mazaletskaya, N. I. Sheludchenko and L. N. Shishkina, *Russ. Chem. Bull.*, 1995, **44**, 1014.
- 18 T. Koga and J. Terao, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 1450.
- 19 B. Le Tutour, Ch. Brunel and F. Quemeneur, *New J. Chem.*, 1996, **20**, 707.
- 20 C. Rousseau-Richard, C. Richard and R. Martin, *J. Chim. Phys.*, 1988, **85**, 175.
- 21 E. Niki, T. Saito, A. Kawakami and Y. Kamiya, *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 4177.
- 22 G. W. Burton and K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 6472.
- 23 K. E. Peers, D. T. Coxon and H. W. S. Chan, *J. Sci. Food Agric.*, 1984, **35**, 813.
- 24 M. Takahashi, Y. Yoshikawa and E. Niki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1989, **62**, 1885.
- 25 C. Rousseau-Richard, C. Richard and R. Martin, *J. Chim. Phys.*, 1988, **85**, 167.
- 26 E. T. Denisov and I. V. Khudyakov, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 1313.
- 27 L. R. Mahoney, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1969, **8**, 547.
- 28 B. J. F. Hudson, *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, London, 1990.
- 29 G. Scott, *Atmospheric Oxidation and Antioxidants*, Elsevier, London, 1993, vol. I-III.
- 30 C. Rousseau, C. Richard and R. Martin, *J. Chim. Phys.*, 1988, **85**, 145.
- 31 A. Belmeliani, C. Rousseau-Richard and R. Martin, *J. Chim. Phys.*, 1990, **87**, 1583.
- 32 C. Rousseau-Richard, C. Richard and R. Martin, *New J. Chem.*, 1991, **15**, 283.
- 33 L. R. C. Barclay, J. M. MacNeil, J. A. Van Kessel, B. J. Forrest, N. A. Porter, L. S. Lehman, K. J. Smith and J. C. Ellington Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 6740.
- 34 P. L. Luisi, M. Giomini, M. P. Pileni and B. H. Robinson, *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, **947**, 209.
- 35 D. Han, O. Yi and H. Shin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1991, **68**, 740.
- 36 A. Tardieu and V. Luzzati, *J. Mol. Biol.*, 1973, **75**, 711.
- 37 E. N. Frankel, S. Huang, J. Kanner and J. B. Geman, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1054.
- 38 R. Hiatt and T. McCarrick, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 5234.
- 39 P. H. Elworthy and D. S. McIntosh, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1961, **13**, 633.

Received in Montpellier, France, 9th January 1998;
Paper 8/00530C