



Article Original

Activité Antioxydante du Sang Total, du Plasma, du Sérum et des Globules Rouges par Piégeage de l'Ion Radicalaire ABTS+

Antioxidant activity of whole blood, plasma, serum and red blood cells by trapping the radical ion ABTS+

N'negue ép. Mezui-Mbeng MA¹, Lendoye E¹, Makoyo O¹, Bekale S¹, Ella Ndong JG¹, Nguema Edzang RW¹, Ngou-Milama E¹

(1) Laboratoire de Chimie-Biochimie de la Faculté de Médecine. Université des Sciences de la Santé

Auteur correspondant :

N'Negue ép. Mezui-Mbeng Marie-Andrée

Adresse e-mail :

negmarie@yahoo.fr

Boîte postale : 4009, Libreville / Gabon

Tel:(+ 241) 77 62 27 28

Mots-clés : Capacité antioxydante totale – ABTS – Sang total – Plasma – Sérum.

Keywords: Full antioxydative capacity – ABTS - Full blood- Plasma – Serum.

RÉSUMÉ

Introduction. Les effets bénéfiques des antioxydants sur la santé humaine ont été largement démontrés. Aussi, des tests évaluant la capacité antioxydante du sang ont été développés. **Objectifs.** Mesurer l'activité antioxydante du sang par piégeage du radical libre ABTS⁺ sur des échantillons de sang total, de globules rouges, de plasma et de sérum. Ainsi, déterminer la fraction du sang qui présente un maximum d'activité antioxydante et qui est la plus adaptée à cette méthode d'évaluation par transfert d'électron. **Patients et méthodes.** Cinq échantillons de sang ont été prélevés sur les auteurs de la publication dont l'âge moyen était de 35 ans. L'activité antiradicalaire a été déterminée par spectrophotométrie UV : Spectrophotomètre V-200 (BOECO, Germany). La lecture de la densité optique a été faite à 734 nm, longueur d'onde d'absorption maximale du cation radicalaire ABTS⁺. **Résultats.** Les échantillons cellulaires présentaient une activité anti radicalaire (AAR %) plus grande (sang total : 94,40 ± 0,97 ; culot globulaire : 79,14 ± 3,02) que celles du plasma (76,54 ± 1,92) ou du sérum (72,10 ± 1,71). L'AAR du sang total était supérieur de 18% à celle du plasma et de 22% à celle du sérum. La dilution des échantillons cellulaires représente une situation de stress cellulaire aux fortes dilutions (p=0,008 et p=0,014) rendant erronée la mesure de la capacité antioxydante du sang total. L'AAR du plasma était 5 à 8% supérieure à celle du sérum. Enfin, l'activité antioxydante du plasma (76,25 ± 2,88) et du sérum (70,07 ± 2,02) restait inchangée même après 7 jours au réfrigérateur. **Conclusion.** Nous pouvons dire que le plasma et le sérum restent les composantes du sang les plus stables et les mieux adaptés pour mesurer la capacité antioxydante totale du sang par piégeage du radical libre ABTS⁺, avec un léger avantage pour le plasma.

ABSTRACT

Background. The beneficial effects of antioxidants on human health have been widely demonstrated. Also, tests evaluating the antioxidant capacity of the blood have been developed. Our aim was to measure the antioxidant activity of the blood by trapping the ABTS⁺ free radical on samples of whole blood, red blood cells, plasma and serum. Thus, determine the fraction of the blood which presents a maximum of antioxidant activity and which is the most adapted to this method of evaluation by electron transfer. **Methods.** Five blood samples were taken from the authors of the publication whose average age was 35 years. The anti-radical activity was determined by UV spectrophotometry: Spectrophotometer V-200 (BOECO, Germany). The reading of the optical density was made at 734 nm, wavelength of maximum absorption of the radical cation ABTS⁺. **Results.** The cell samples showed a greater antiradical activity (AAR%) (whole blood: 94.40 ± 0.97; red blood cells: 79.14 ± 3.02) than those of the plasma (76.54 ± 1.92) or serum (72.10 ± 1.71). The AAR of whole blood was about 18% higher than that of plasma and about 22% higher than that of serum. The dilution of cell samples represents a situation of cell stress at high dilutions (p=0.008 and p=0.014) making the measurement of the antioxidant capacity of whole blood erroneous. Plasma AAR was 5-8% higher than serum AAR. Finally, the antioxidant activity of plasma (76.25 ± 2.88) and serum (70.07 ± 2.02) remained unchanged even after 7 days in the refrigerator. **Conclusion.** Plasma and serum remain the most stable and best suited blood components to measure the total antioxidant capacity of blood by ABTS⁺ free radical scavenging, with a slight advantage for plasma.

INTRODUCTION

Dans les systèmes biologiques, la production d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS, en anglais) est contrebalancée par les systèmes antioxydants tels que l' α -tocophérol, l'acide ascorbique, et des enzymes dont les plus représentatives sont la catalase, la famille des superoxydes dismutases, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase [1-5]. Cet équilibre est rompu dans certaines conditions telles qu'une augmentation de la production des formes activées de l'oxygène (exposition à des concentrations élevées en O_2 , infection bactérienne, etc.) ou une diminution de l'efficacité des systèmes antioxydants [5]. On observe alors une augmentation des concentrations intracellulaires des ROS responsables du stress oxydant [6-8]. Chez l'être humain, les dommages oxydatifs que subissent l'ADN, les lipides et des protéines sont associés à certaines maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires [9], certains cancers [10], le diabète [11], les maladies inflammatoires, la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives [12], ainsi qu'au processus de vieillissement [5]. C'est pourquoi, une grande partie de la recherche scientifique est orientée vers les effets bénéfiques des antioxydants sur la santé [13].

Plusieurs tests ont été développés pour déterminer la capacité antioxydante des fluides biologiques comme le sang, le plasma, le sérum, les urines et la salive [13]. La capacité anti-oxydante totale du plasma peut ainsi être mise en évidence soit en dosant l'activité des enzymes antioxydantes [4; 5; 14; 15] soit en déterminant la concentration en composés antioxydants non enzymatiques tels que : les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes, l'acide urique, l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, le β -carotène, le glutathion réduit (GSH), la bilirubine, les produits de peroxydation lipidiques etc. [14-18]. Ces méthodes non enzymatiques permettent d'évaluer indirectement la capacité du plasma humain à réduire les ions cuivre et à piéger les radicaux hydroxyles [17], ou la capacité de réduction ferrique du plasma par transfert d'électrons [19; 20]. Elles permettent également de mettre en évidence *in vitro* la capacité des fluides biologiques à piéger les radicaux libres formés à partir des molécules 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [19; 21], et 2,2'-azinobis- (acide 3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) [22]. La méthode par piégeage du radical ABTS a été très utilisée pour la détermination de la capacité antioxydante du sang et du plasma [16; 18; 20-26]. Selon Fischer et al, la méthode ABTS avec le Trolox comme antioxydant de référence peut être utilisée en routine pour prédire la capacité anti-oxydante du sang, le plasma étant un meilleur substrat que sérum [16]. Cependant, ces auteurs n'ont pas évalué l'activité anti-radicalaire sur du sang total. Notre étude avait pour objectif d'évaluer d'une part l'activité anti-oxydante du sang total, du plasma, du sérum et des globules rouges de cinq échantillons de sang afin de déterminer la fraction du sang qui présente le maximum d'activité anti-oxydante et qui pourra être utilisée comme spécimen lors de la détermination de la capacité antioxydante de l'organisme. D'autre part, nous avons suivi sur un même échantillon l'activité anti-radicalaire en fonction

de la dilution du sang total, du plasma, du sérum, des globules rouges lysés et non lysés. L'activité anti-radicalaire a été mesurée par piégeage du cation radicalaire de l'acide 2,2'-azinobis [3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique] (ABTS^{•+}) selon la méthode mise au point par Re et al [22] et optimisée par N'negue *et al.* [27] avec l'acide gallique comme antioxydant de référence.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Échantillonnage

Cinq échantillons de sang ont été prélevés sur les auteurs de la publication dont l'âge moyen était de 35 ans.

L'ABTS (acide 2,2'-azinobis[3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique]), l'acide gallique, le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) et le dihydrogénophosphate de sodium hydraté ont été achetés auprès de Sigma-Adrilch (Saint-Quentin Fallavier, France). L'eau utilisée a été distillée par l'équipement du laboratoire « Milli-Q Labo » (Millipore Japan, Tokyo, Japan). Tous ces produits sont de qualité pour analyses.

L'activité anti-radicalaire a été déterminée par spectrophotométrie UV : Spectrophotomètre V-200 (BOECO, Germany). La lecture de la densité optique a été faite à 734 nm, longueur d'onde d'absorption maximale du cation radicalaire ABTS^{•+}.

Préparation des échantillons de sang

Le sang a été prélevé au niveau veineux dans des tubes secs pour l'obtention du sérum et des tubes avec anticoagulant EDTA pour l'obtention du plasma. Tous les tubes ont été centrifugés à 3000 tours/minute pendant 5 minutes. Toutefois, pour les tubes secs, un temps préalable de formation du caillot de 10 min à température ambiante est nécessaire avant la centrifugation. L'obtention des globules rouges lysés se fait par dissolution du culot de globules rouges dans du diméthylsulfoxyde « DMSO ».

Préparation des solutions d'acide gallique, « antioxydant de référence »

L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) est un composé organique aromatique, utilisé comme composé anti-radicalaire de référence. Dix solutions de travail, de concentrations décroissantes, allant de 0,5 à 5 μ M, ont été préparées par dilution de l'acide gallique dans de l'eau distillée.

Mesure de l'activité anti-radicalaire

Le principe du test de mesure de l'activité anti-radicalaire par la méthode ABTS est basé sur la diminution de l'absorbance à 734 nm du cation radicalaire ABTS^{•+} (coloration bleu-vert) en présence d'un composé potentiellement anti-radicalaire qui réduit le radical cation. La diminution de la forme radicalaire d'ABTS^{•+} entraîne une décoloration de la solution. L'ion radicalaire ABTS^{•+} est obtenu en faisant réagir la molécule d'ABTS (7 mM) avec le persulfate de potassium (2,45 mM), dans de l'eau distillée pendant 16 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution d'ABTS^{•+} obtenue est diluée avec du tampon phosphate de sodium (5 mM, pH = 7,4), afin d'obtenir une solution mère ayant une valeur initiale d'absorbance à 734 nm située entre 0,65 et 0,70. Le cation radicalaire (ABTS^{•+}) est stable pendant plus de 2 jours lorsqu'il est stocké à température ambiante et à l'abri

de la lumière. Tous les dosages ont été réalisés trois fois et l'activité anti-radicalaire est calculée selon la formule ci-après : activité anti-radicalaire (%) = $[1 - (Ar - Ab)/(Ai - Ab)] \times 100$. Avec Ar= activité restante d'ABTS⁺, Ai= activité initiale d'ABTS⁺ et Ab= Activité du blanc.

En fait, la réduction du radical cation ABTS⁺ revient donc à déterminer l'activité anti-radicalaire et au total, les propriétés anti-oxydantes du sang total, du sérum et du

plasma, comparativement aux propriétés anti-oxydantes de l'acide gallique (étalon). L'activité anti-radicalaire a été déterminée par spectrophotométrie UV dans des cuves de 1cm de trajet optique (volume réactionnel de 2 mL). Le temps d'incubation est de 6 minutes à température ambiante. Les activités anti-radicalaires des plasmas et sérums sanguins sont évaluées à J0 (jour du prélèvement) et à J7 (après 7 jours au réfrigérateur).

RÉSULTATS

Activité anti-radicalaire de l'acide gallique en fonction de la concentration

Le pourcentage d'activité anti-radicalaire augmente linéairement avec la concentration de l'antioxydant de référence : l'acide gallique (Figure 1). La valeur de l'IC₅₀ de l'acide gallique déduite de la courbe est de 2,5 µM.

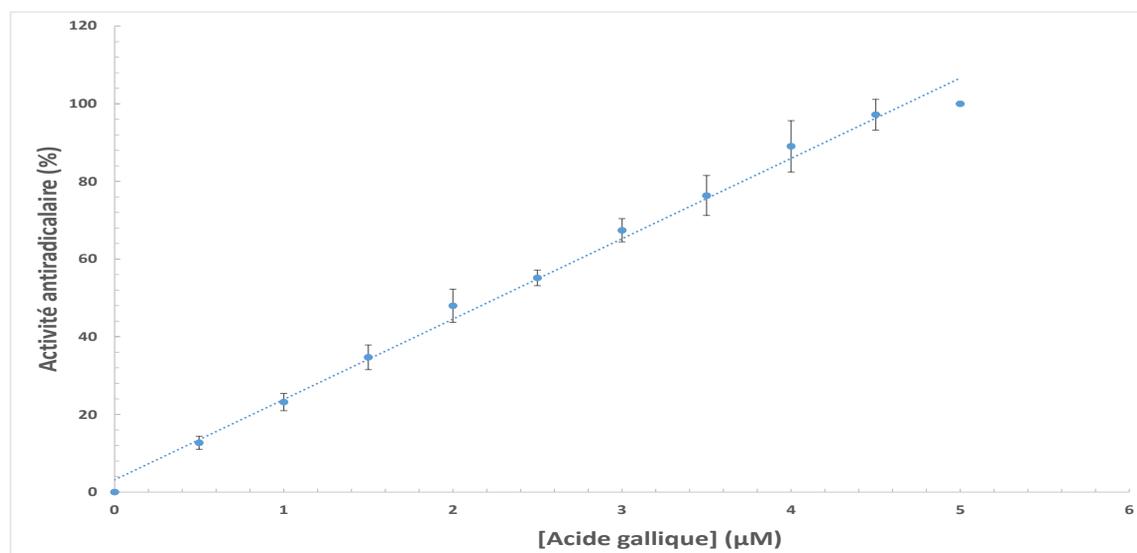


Figure 1 : Activité anti-radicalaire en fonction de la concentration de l'acide gallique après 6 minutes d'incubation.

La proportion ABTS⁺ transformée en ABTS en présence d'acide gallique est calculée à partir de la variation d'absorbance à 734 nm mesurée par spectrophotométrie. L'équation de droite est la suivante : $y = 20,697x + 3,1442$ ($R^2 = 0,993$) ; $n = 3$.

Activité anti-radicalaire de différents échantillons de sang total, de plasma et de sérum

Nos résultats (Tableau I) montrent que le pourcentage moyen d'activité anti-radicalaire sur échantillon de sang total est de $94,40 \pm 0,97$. Extrêmes de 93,37 et 95,64%.

En ce qui concerne les résultats obtenus sur plasma à J0 et J7, nous avons obtenus des résultats d'activité anti-radicalaire de $76,54 \pm 1,92$ et $76,25 \pm 2,88$ %, respectivement. Enfin, les résultats obtenus à partir de sérum, montrent une moyenne de $72,10 \pm 1,71$ % à J0. L'activité anti-radicalaire sérique est de $70,07 \pm 2,02$ à J7.

Tableau I : Évaluation de l'activité anti-radicalaire (AAR) du sang total à J0, du plasma et du sérum à J0 et J7; (n=5)

Echantillons (E)	E1	E2	E3	E4	E5	Moyenne ± ET
Sang total						
% AAR (J0)	95,64	94,61	94,91	93,46	93,37	94,40 ± 0,97
Plasma						
% AAR (J0)	76,84	75,30	77,28	74,14	79,14	76,54 ± 1,92
% AAR (J7)	77,62	71,06	79,05	75,31	78,23	76,25 ± 2,88
Sérum						
% AAR (J0)	71,09	73,38	71,34	74,38	70,3	72,10 ± 1,71
% AAR (J7)	72,70	69,38	67,93	71,65	68,67	70,07 ± 2,02

Évolution de l'activité anti-radicalaire de divers prélèvements sanguins en fonction de la dilution

D'après les résultats obtenus après 6 minutes d'incubation, on observe de manière générale que l'activité anti-radicalaire du sang total et celle du culot de globules rouges (figure 2) augmente légèrement avec la dilution, notamment aux fortes dilutions. En effet, une augmentation d'environ 7 % et 8 % de l'activité anti-radicalaire du sang total a été enregistrée après

des dilutions au 1000^{ème} ($p=0,019$) et 1500^{ème} ($p=0,008$). Cette augmentation était d'environ 10 % après une dilution au 1500^{ème} ($p=0,014$) pour le culot de globules rouges. Enfin, concernant le lysat de globules rouges, nous avons observé un effondrement initial d'environ 95 % de l'activité anti-radicalaire des globules rouges après leur lyse au DMSO. En effet, après action du DMSO, l'activité anti-radicalaire des globules rouges est passée de 80% environ à 3,59%.

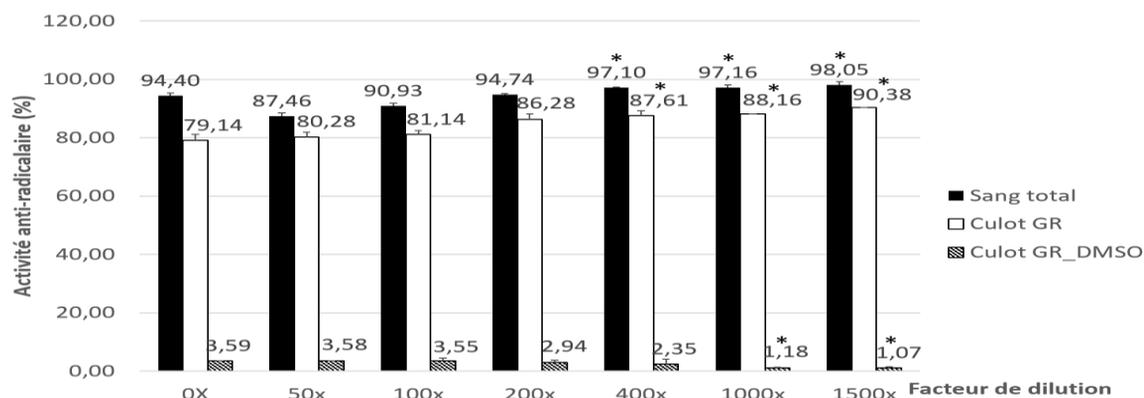


Figure 2 : Activité anti-radicalaire en fonction de la dilution d'échantillons cellulaires de sang total et de culots globulaires avec ou sans DMSO.

La proportion $ABTS^{*+}$ transformée en $ABTS^+$ en présence d'échantillons cellulaires est calculée à partir de la variation d'absorbance à 734 nm mesurée par spectrophotométrie ; Le test paramétrique T de Student a été appliqué ; $n = 2$. L'effet de la dilution est significatif aux fortes dilutions pour tous les échantillons testés. Pour le sang total : 1/400^e, $p=0,014$; 1/1000^e, $p=0,019$; 1/1500^e, $p=0,008$. Pour les culots de Globules Rouges (GR) : 1/400^e, $p=0,042$; 1/1000^e, $p=0,022$; 1/1500^e, $p=0,014$. Pour les lysats de Globules Rouges (GR_DMSO) : 1/1000^e, $p=0,002$; 1/1500^e, $p=0,014$.

Concernant le plasma, comme pour le sérum (figure 3), nous avons mis en évidence une décroissance graduelle de l'activité anti-radicalaire qui a atteint son pic de 55 % après une dilution au 1000^{ème} ($p<0,001$).

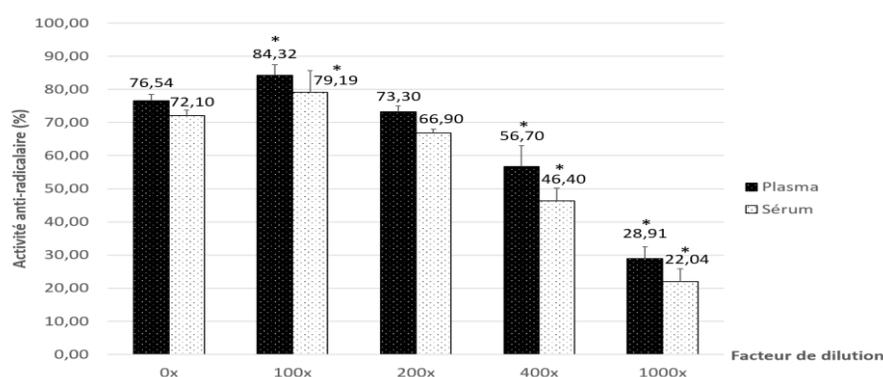


Figure 3 : Activité anti-radicalaire en fonction de la dilution de surnageants plasmiques et sériques.

La proportion $ABTS^{*+}$ transformée en $ABTS^+$ en présence d'échantillons cellulaires est calculée à partir de la variation d'absorbance à 734 nm mesurée par spectrophotométrie ; $n = 2$. Le test paramétrique T de Student a été appliqué ; $n = 2$. L'effet de la dilution est significatif aux faibles et fortes dilutions pour tous les deux types d'échantillons testés. Pour le plasma : 1/100^e, $p=0,009$; 1/400^e, $p=0,001$; 1/1000^e, $p<0,001$. Pour le sérum : 1/100^e, $p=0,05$; 1/400^e et 1/1000^e, $p<0,001$.

DISCUSSION

L'activité anti-oxydante du sang total, du plasma, du sérum et des globules rouges lysés et non lysés a été évaluée par piégeage de radicaux libres par le cation radicalaire $ABTS^{*+}$ selon la méthode de Re et al. [22] optimisée par N'negue et al. [27] avec l'acide gallique comme antioxydant de référence. Dans cette méthode, la concentration du cation radicalaire $ABTS^{*+}$ de coloration bleu vert absorbant à 734 nm, diminue en présence d'un composé antioxydant capable de piéger ledit radical et le réduire en molécule non radicalaire ABTS. Ce qui aura pour conséquence une

diminution de l'absorbance à 734 nm et une décoloration de la solution. Selon Fischer et al. [16], ce test peut être appliqué en routine pour prédire la capacité anti oxydante totale du sang. Les résultats de l'activité anti oxydante de l'acide gallique (molécule synthétique fortement anti oxydante) valident la méthode choisie. En effet, la valeur de IC_{50} de l'acide gallique déduite de nos résultats était 2,5 μM . Cette valeur est équivalente à celle obtenue par Sadat et al. [28] et N'negue et al. [27], qui ont travaillé dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus avec les prélèvements « non dilués » de sang total, de plasma et de sérum (Tableau 1) ont montré que l'activité anti-radicalaire du sang total était supérieure de 18% environ à celle du plasma et de 22% environ à celle du sérum. Les activités anti-oxydantes du plasma et du sérum étaient quasi équivalentes, avec cependant un léger avantage d'environ 5 % pour le plasma. Ces résultats confirment la présence de composés antioxydants tant dans le sang total, que dans le plasma et le sérum tel que décrit dans la littérature [16; 18; 19; 22].

Le fait que les activités anti-oxydantes du plasma et du sérum soient inférieures à celle du sang total est attendu. Nous pouvons l'expliquer par la présence d'un nombre plus important de composés à caractère anti-radicalaire contenu dans les cellules. Ces composés cellulaires sont des éléments bioactifs protéiques et non protéiques. D'autres composés non protéiques endogènes et alimentaires à faibles poids moléculaires tels que l'acide urique, l'acide ascorbique et les flavonoïdes présents dans le sang total sont impliqués dans la capacité anti-oxydante total du sang [29; 30]. A titre d'exemple, il a été rapporté que l'albumine, principale protéine du plasma contribue fortement à la capacité anti-oxydante total du plasma protéiné [29; 31]. Fischer et al, ont montré que l'activité anti-oxydante du plasma sans albumine était inférieure à celle du plasma protéiné [16]. Ces dernières données de la littérature nous permettent de comprendre la différence trouvée dans nos résultats entre le plasma et le sérum. En effet, cette différence pourrait être reliée à la perte d'antioxydants cellulaires lors de la préparation du plasma et du sérum. En effet le plasma, correspond au sang total dans lequel les globules rouges ont été extrait et le sérum correspond au sang total moins les globules rouges et certaines protéines de la coagulation telle que le fibrinogène.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des globules rouges (Figure 2) a montré une activité anti-radicalaire moyenne de 79,14 % légèrement en deçà de l'activité anti-radicalaire moyenne du sang total qui était de 94,40 %. L'extraction des globules rouges dont le caractère antioxydant est démontré ici (Figure 2) expliquerait également l'activité plus faible du plasma et du sérum par rapport au sang total. De plus, ces résultats ont montré que les globules rouges lysés perdaient la presque totalité de leur pouvoir anti-radicalaire, passant de 79,14% à 3,59%. Ceci nous permet de dire que les antioxydants anti-radicaux contenus dans le culot de globules ont été dénaturés et/ou inactivés lors de l'ajout du DMSO. Il a été décrit lors des travaux pionniers que les antioxydants n'agissaient pas seuls mais en synergie avec d'autres antioxydants en formant un réseau complexe. Pour exemple, l'ascorbate peut recycler la vitamine E oxydée et l'ascorbate oxydé peut être recyclé par l'action du glutathion [32; 33]. Ce même glutathion qui, dans sa forme réduite (glutathion réduit) protège les cellules contre l'action toxique des radicaux libres. Aussi, une destruction du glutathion lors de la lyse des globules rouges par exemple pourrait donc déstabiliser le réseau des antioxydants et entraîner une disparition de l'activité anti-oxydante totale du culot de globules rouges. Par ailleurs, la lyse des globules rouges pourrait avoir dénaturé et rendu inactives les principales enzymes anti-

oxydantes des érythrocytes à savoir : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), les glutathion peroxydase et réductase [5].

Les résultats de la figure 3 présentent, après une légère augmentation, une diminution dilution-dépendante de l'activité anti-radicalaire du plasma et du sérum. Pour une dilution au 400^{ème} l'activité anti-radicalaire est de 56,70 ± 6,3 % pour le plasma et de 46,4 ± 3,84% pour le sérum; et pour une dilution au 1000^{ème}, l'activité anti-radicalaire est 28,91 ± 3,57 % pour le plasma et de 22,04 ± 3,83% pour le sérum. Ces résultats montrent que le plasma et le sérum ont une activité anti-oxydante supérieure à celle de l'acide gallique « antioxydant de référence ». En effet, les résultats (Figures 1 et 2) montrent qu'il faut diluer environ 400 fois le sérum et un peu plus de 400 fois le plasma pour obtenir un pourcentage d'activité anti-radicalaire équivalent à celui de l'IC₅₀ de l'acide gallique (IC₅₀ = 2,5 mM). Ces mêmes résultats montrent que le plasma a une activité anti-oxydante supérieure à celle du sérum, il est donc un meilleur indicateur de l'activité anti-oxydante totale du sang comparativement au sérum.

Les résultats des figures 2 ont également montré une augmentation de l'activité anti-oxydante du sang total et des globules rouges en fonction de la dilution croissante. Nous pouvons déduire de ces résultats que la dilution représente bien une situation de stress cellulaire dans laquelle les échantillons non dilués de sang total et de globules rouges ont été placés. Ce facteur stress de la dilution n'est à considérer que pour des dilutions à partir de 1/400^e. En effet, pour des dilutions inférieures ou égales à 1/200^e, on observe des activités anti-oxydantes équivalentes à celles des échantillons non dilués. Nous avons en effet obtenu une activité de 98,05 % du sang total après dilution au 1500^{ème} contre une activité de 94,40 % avant dilution ; et une activité de 79,14 % avant dilution et de 90,38 % après dilution au 1500^{ème} du culot de globules rouges. Nous noterons que même après dilution au 1500^{ème}, l'activité anti-radicalaire du sang total reste supérieure à celle du culot de globules rouges. Sur des échantillons contenant des cellules intactes, la dilution déterminerait donc un biais pouvant être responsable d'une surestimation de la capacité anti-oxydante totale mesurée. Surestimation qui n'a pas été observée avec les échantillons de plasma ou de sérum. Enfin, nos résultats ont aussi montré que l'activité anti-radicalaire du plasma et du sérum reste quasi stable même après 7 jours au réfrigérateur (Tableau 1). De façon générale, nos résultats renforcent ceux d'autres auteurs qui ont montré que comparativement au sérum, le plasma serait le meilleur substrat pour la détermination de l'activité anti-oxydante du sang d'une part et que les échantillons de plasma conservaient leur activité anti-oxydante même après 12 mois lorsqu'ils sont stockés à -80 °C [16].

CONCLUSION

La capacité anti-oxydante totale du sang est bien évaluable par piégeage de radicaux libres du cation radicalaire ABTS⁺. La détermination de l'activité anti-radicalaire sur le sang total autorise une-dilution de celui-ci inférieure ou égale à 1/200^e. Par ailleurs, le plasma et le sérum restent les composants du sang adaptés et de manipulation aisée pour

mesurer la capacité anti-oxydante total du sang, avec un léger avantage pour le plasma. L'activité anti-radicalaire du plasma et du sérum est supérieure à celle de l'acide gallique « antioxydant de référence » et cette activité est conservée même après sept jours au réfrigérateur.

RÉFÉRENCES

- Sies H., Stahl W., and Sundquist A.R. Antioxidant functions of vitamins: vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992. 669:7-20
- Liebler D.C. The role of metabolism in the anti-oxidant function of vitamin E. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1993. 23:147-169.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 1994. 52: 253-265.
- Sharifian A, Gharavi M, Pasalar P, Aminian O. Effect of extremely low frequency magnetic field on antioxidant activity in plasma and red blood cells in spot welders. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009 Jan; 82(2): 259-66. doi: 10.1007/s00420-008-0332-2.
- Kozakiewicz M, Kornatowski M, Krzywińska O, Kędziora-Kornatowska K. Changes in the blood antioxidant defense of advanced age people. *Clin Interv Aging.* 2019 May 1; 14: 763-771. doi: 10.2147/CIA.S201250.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000. 408: 239-247.
- Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 2001. 31: 1287-1312.
- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015; 4:180-3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
- Choi S, Liu X, Pan Z. Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2018 Jul;39(7):1120-1132. doi: 10.1038/aps.2018.25. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29926844; PMCID: PMC6289396.
- Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018; 24(40): 4771-4778. doi: 10.2174/1381612825666190215121712. PMID: 30767733.
- Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol.* 2019 Dec;70(6). doi: 10.26402/jpp.2019.6.01. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32084643.
- Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1105-1121. doi: 10.3233/JAD-161088. PMID: 28059794; PMCID: PMC5409043.
- Ialongo C. Preanalytic of total antioxidant capacity assays performed in serum, plasma, urine and saliva. *Clin Biochem.* 2017 Apr;50(6):356-363. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.11.037. Epub 2016 Dec 3. PMID: 27919600.
- Feng Y, Wang X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:472932. doi: 10.1155/2012/472932. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22888398; PMCID: PMC3410354.
- Prie BE, Iosif L, Tivig I, Stoian I, Giurcaneanu C. Oxidative stress in androgenetic alopecia. *J Med Life.* 2016 Jan-Mar;9(1):79-83. PMID: 27974920; PMCID: PMC5152608.
- Fischer MA, Gransier TJ, Beckers LM, Bekers O, Bast A, Haenen GR. Determination of the antioxidant capacity in blood. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(7):735-40. doi: 10.1515/CCLM.2005.125. PMID: 16207134.
- Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Bektaşoğlu B, Bener M. Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for antioxidants in human serum and for hydroxyl radical scavengers. *Methods Mol Biol.* 2010;594:215-39. doi: 10.1007/978-1-60761-411-1_15. PMID: 20072920.
- Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004 Feb;37(2):112-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014. PMID: 14725941.
- Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Pokora I, Żebrowska A, Gdańska A, Podgórski T. Effects of medium-term green tea extract supplementation combined with CrossFit workout on blood antioxidant status and serum brain-derived neurotrophic factor in young men: a pilot study. *J Int Soc Sports Nutr.* 2019 Mar 21;16(1):13. doi: 10.1186/s12970-019-0280-0. PMID: 30898134; PMCID: PMC6429762.
- Abe S, Tanaka Y, Fujise N, Nakamura T, Masunaga H, Nagasawa T, Yagi M. An antioxidative nutrient-rich enteral diet attenuates lethal activity and oxidative stress induced by lipopolysaccharide in mice. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2007 May-Jun;31(3):181-7. doi: 10.1177/0148607107031003181. PMID: 17463142.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004 Apr;37(4):277-85. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015. PMID: 15003729.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio.Med.* 1999; 26: 1231-1237.
- Romay C, Pascual C, Lissi EA. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res.* 1996 Feb;29(2):175-83. PMID: 8731346.
- Yu TW, Ong CN. Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application, and limitation. *Anal Biochem.* 1999 Nov 15;275(2):217-23. doi: 10.1006/abio.1999.4314. PMID: 10552907.
- Gorinstein S, Caspi A, Libman I, Leontowicz H, Leontowicz M, Tashma Z, Katrich E, Jastrzebski Z, Trakhtenberg S. Bioactivity of beer and its influence on human metabolism. *Int J Food Sci Nutr.* 2007 Mar; 58(2):94-107. doi: 10.1080/09637480601108661. PMID: 17469765.
- Martínez-López S, Sarriá B, Mateos R, Bravo-Clemente L. Moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acids reduces cardiovascular risk markers: results from a randomized, cross-over, controlled trial in healthy and hypercholesterolemic subjects. *Eur J Nutr.* 2019 Mar;58(2):865-878. doi: 10.1007/s00394-018-1726-x. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29858625.
- N'Negue ép. Mezui-Mbeng, Ella Ndong J. G., Nguema Edzang R. W., Lendoye E., Ngou Milama. Cinétique d'étude de l'activité antioxydante d'un extrait aqueux de calices séchés d'*Hibiscussabdariffa* par piégeage de l'ion radicalaire ABTS⁺. *IJAR.* 2020; 6 (11): 361-367.
- Sadat L, Cakir-Kiefer C, Marie-Andrée N'Negue M.-A., Gaillard J.-L., Girardet J.-M., Miclo L. Isolation and

- identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. *Int Dairy J.* 2011. 21(4): 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.011>.
29. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond).* 1993 Apr;84(4):407-12. doi: 10.1042/cs0840407. PMID: 8482045.
 30. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994;234:279-93. doi: 10.1016/0076-6879(94)34095-1. PMID: 7808295.
 31. Schofield D, Braganza JM. Shortcomings of an automated assay for total antioxidant status in biological fluids. *Clin Chem.* 1996 Oct;42(10):1712-4. PMID: 8855160.
 32. Hopkins FG, Morgan EJ. Some relations between ascorbic acid and glutathione. *Biochem J.* 1936 Aug;30(8):1446-62. doi: 10.1042/bj0301446. PMID: 16746177; PMCID: PMC1263204.
 33. Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature.* 1979 Apr 19;278(5706):737-8. doi: 10.1038/278737a0. PMID: 431730.