

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

KARL GIRARD-LALANCETTE

BACHELIER ÈS SCIENCES (BIOLOGIE)

ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT DE LA BIOMASSE FORESTIÈRE ET MARINE

Février 2009

## RÉSUMÉ

Depuis que les radicaux libres ont été découverts, leur implication dans certains processus physiologiques, de même que dans une multitude de pathologies, a été mise en évidence. Aussi, plusieurs méthodes ont été mises au point pour mesurer le potentiel antioxydant de molécules d'origine alimentaire, mais aussi pour en découvrir de nouvelles provenant de diverses sources. L'oxydation et la protection contre l'oxydation impliquant plusieurs modes d'action, aussi la qualification du potentiel antioxydant d'une nouvelle molécule demeure problématique. À ce jour, aucune méthode d'évaluation n'est totalement représentative du potentiel antioxydant global d'une molécule donnée; la plupart des méthodes *in vitro* ne tiennent pas compte du contexte biologique dans lequel les antioxydants seront ultimement utilisés. Aussi, ce document présente une nouvelle méthode originale, à large spectre de sensibilité, réalisé sur des cellules en culture pour détecter et mesurer le potentiel antioxydant de molécules pures ou de mélanges complexes. Cette méthode a été validée dans le cadre de ce projet de maîtrise en l'utilisant conjointement à un autre test couramment cité dans la littérature, à savoir le test ORAC. La méthode a ensuite été utilisée pour mettre en évidence le potentiel antioxydant d'extraits végétaux, plus spécifiquement des extraits de conifères de la forêt boréale. Parmi tous les extraits testés, les extraits de conifères se sont démarqués des extraits d'origine alimentaire (fruits et légumes). De plus, cette méthode originale s'est avérée adéquate pour comparer l'impact de diverses méthodes d'extraction sur le potentiel antioxydant mesuré.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier Jean Legault, mon directeur de maîtrise, pour sa supervision, sa patience, et pour les projets enrichissants auxquels il m'a assigné. Je voudrais aussi remercier mon co-directeur de maîtrise, André Pichette, qui, avec Jean Legault, a mis en place un contexte de recherche pluridisciplinaire nous ayant permis de toucher à la fois à la biologie et à la chimie. Leurs efforts à mettre en place un tel contexte en si peu de temps, et à l'entretenir, est un exploit remarquable, surtout dans une université régionale telle que la nôtre.

Je voudrais aussi remercier leurs assistants de recherche. D'abord Angélique Longtin, ancienne assistante de Jean Legault, qui m'a guidé au tout début de ma longue maîtrise et qui m'a appris la base des techniques de travail en laboratoire. Je tiens à remercier Serge Lavoie, assistant de André Pichette, avec qui j'ai beaucoup appris au niveau de la statistique et de la programmation. Je veux remercier Maxime Lebrun, ancien assistant de Jean, qui était toujours là pour répondre à mes questions, me faire de bonnes suggestions ou tout simplement m'aider quand j'en ai eu besoin. Je remercie spécialement Catherine Dussault, assistante de Jean, pour son aide précieuse tout au long de ma maîtrise. Outre les assistants de recherche, je voudrais remercier tous les chimistes du laboratoire LASEVE qui à un moment ou un autre m'ont envoyé de leurs extraits afin que j'évalue leur potentiel antioxydant. Je pense en particulier à Dominic Dufour, Vakhtang Mshvildadze, Charles Sirois et Marie-Eve Bradette-Hébert.

Je remercie Jean Mamelona, étudiant postdoctoral sous la tutelle d'Émilien Pelletier à l'Université du Québec à Rimouski, et Selim Kermasha de l'Université McGill pour leurs travaux sur les échinodermes et les extraits qu'ils m'ont fait tester.

Je tiens aussi à remercier Catherine Laprise, professeur-chercheur à l'UQAC, qui m'a accueilli dans ses laboratoires à l'hôpital de Chicoutimi lors de mon stage de maîtrise. À cause de problèmes

de santé qui sont survenus peu de temps après le début de mon stage et qui m'empêchaient alors de me déplacer, j'ai été assigné à un autre projet de nature informatique où j'ai énormément appris dans la gestion de banques de données et en programmation d'interfaces web pour accéder aux données. À cette fin, je voudrais aussi remercier Sébastien Claveau et Suzy Tremblay, assistants de recherche de Catherine Laprise, pour leur effort assidue à tester et valider mon travail de programmation.

Je veux remercier aussi les organismes subventionnaires qui ont contribué à ce projet de maîtrise, à savoir, Action Concertée FQRNT et le Fonds de la recherche forestière du Saguenay - Lac-Saint-Jean.

Enfin, je veux remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont supporté durant ma maîtrise. Je pense à ceux avec qui j'ai partagé du temps et qui ont rendu le cheminement agréable. Merci à Charles Gauthier, mon ancien colocataire durant les deux premières années de ma maîtrise, avec qui j'ai passé plusieurs soirées à discuter de science. Merci encore à Maxime Lebrun et Serge Lavoie avec qui j'ai souvent flâné après les journées au laboratoire. Finalement, je remercie mes très chers parents qui ont toujours été derrière moi quand j'en ai eu besoin, en particulier lors des deux poussées de sclérose en plaques que j'ai eues durant ma maîtrise. Je me souviendrai toute ma vie que c'est lors de cette longue maîtrise que j'ai su que j'avais cette fâcheuse maladie chronique.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
Sources endogènes d'agents oxydants.....	1
Les mécanismes de défense antioxydante.....	3
L'oxydation physiologique et l'oxydation pathologique.....	9
Oxydation-Réduction et régulation des gènes.....	9
Exemples de pathologies impliquant un stress oxydatif.....	13
Problématique.....	16
<b>Chapitre I – Techniques d'évaluation du potentiel antioxydant.....</b>	<b>18</b>
Tests <i>in vitro</i> .....	18
Tests cellulaires.....	23
Tests <i>in vivo</i> .....	26
<b>Chapitre II – Évaluation du potentiel antioxydant sur culture cellulaire.....</b>	<b>28</b>
<b>Chapitre III – Évaluation du potentiel antioxydant de végétaux de la forêt boréale.....</b>	<b>36</b>
<b>Chapitre IV – Quantification du contenu phénolique et du potentiel antioxydant     du concombre de mer nord atlantique (<i>Cucumaria frondosa</i>).....</b>	<b>54</b>
Conclusion.....	63
Références.....	67

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Enzymes mitochondriales susceptibles de générer des ROS .....	1
Tableau II : Dérivés réactifs radicalaires et non-radicalaires de l'oxygène et de l'azote.....	4
Tableau III : Exemples de fonctions cellulaires régulées par les ROS et les RNS.....	10
Tableau IV : Exemples de facteurs de transcription contrôlés par l'oxydation ou la réduction.....	12
<b>Article 1</b>	
Table 1 : Antioxydant effects of compounds, fruits and vegetable juices using the ORAC <sub>FL</sub> assay and the cell-based assay.....	33
<b>Article 2</b>	
Table 1 : Total extraction yield and cytotoxicity.....	43
<b>Article 3</b>	
Table 1 : Total phenols (mg/100 g of dry weight) in extracts and fractions obtained from digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of <i>C. frondosa</i> using separated and mixed extractions.....	58
Table 2 : Total phenols (mg/100 g of dry weight) in eluates obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions of digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of <i>C. frondosa</i> using different proportions of solvents.....	59
Table 3 : Total flavonoids (mg/100 g of dry weight) in extracts and fractions obtained from digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of <i>C. frondosa</i> using separated and mixed extractions.....	59
Table 4 : Total flavonoids (mg/100 g of dry weight) in eluates obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions of digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of <i>C. frondosa</i> using different proportions of solvent.....	59

## LISTE DES FIGURES

Figure I : Relations entre les oxydants et les antioxydants cellulaires.....	4
Figure II : Antioxydants de faible poids moléculaire .....	6
Figure III : Modèle de boucle autotoxique proposé pour les mécanismes inflammatoires des maladies neurodégénératives.....	16
Figure IV : Divers fluorochromes utilisés pour mesurer l'oxydation ou le potentiel antioxydant .....	19

### Article 1

Figure 1 : (A) Standard curve of fluorescent DCF (oxidized product of DCFH) in HBSS (200µl) (B) effect of fruit and vegetable juices on quenching of DCF fluorescence; (C) measurement, using different concentrations of DCFH-DA (0.04-20 µM), of ROS induced after incubation of L-929 cells in <i>t</i> -BuOOH (200 µM) for 0, 30, 60, and 90 minutes.....	31
Figure 2: Evaluation of antioxidant properties of Trolox against treatment with <i>t</i> -BuOOH for 90 minutes using the cell-based assay (A) and against treatment with AAPH using the ORAC <sub>FL</sub> assay (B)...	32
Figure 3 : Evaluation of the antioxidant properties of quercetin (A), caffeic acid (B), gallic acid (C) and $\alpha$ -tocopherol (D) after absorption (60 minutes) by cells and subsequent exposition (90 minutes) to 200 µM <i>t</i> -BuOOH, using the cell-based assay.....	33
Figure 4 : Evaluation of the antioxidant properties of different fruit juices (A) of vegetable juices (boiled or not) (B) after absorption for 60 minutes and subsequent exposition (90 minutes) to 200 µM <i>t</i> -BuOOH, using the cell-based assay.....	34
Figure 5 : Prooxidant effect after exposition to carrot juice, $\beta$ -carotene or mixed isomers of $\beta$ , $\alpha$ -carotene (2:1) isolated from carrots, using the cell-based assay .....	34

### Article 2

Figure 1 : Total phenol content of bark extracts from conifer of the boreal forest obtained using different conditions of extraction.....	44
Figure 2 : Antioxidant activity of conifer bark extracts using (A) ORAC assay and (B) cell-based assay.....	47
Figure 3 : Relationship between (A) ORAC values and (B) IC <sub>50</sub> values of extracts of conifer bark, and their content in phenolic compounds.....	49
Figure 4 : Relationship between (A) ORAC values and (B) IC <sub>50</sub> values of all water extracts of conifer bark, and their content in phenolic compounds.....	50

**Article 3**

Figure 1 : ORAC values of extracts and fractions obtained from different tissues of <i>C. frondosa</i> using different solvents and extraction methods.....	57
Figure 2 : ORAC values of eluates obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions using different concentration of solvents.....	58
Figure 3 : Relationship between ORAC values of all extracts and fractions and their content in phenolic compounds.....	60



## INTRODUCTION

### Sources endogènes des agents oxydants

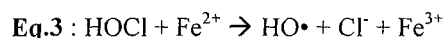
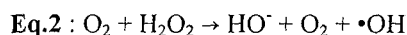
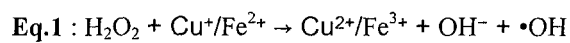
Bien avant de faire face aux radicaux libres et autres oxydants environnementaux, les cellules doivent s'acquitter de ceux qu'elles génèrent. Il existe plusieurs sources de radicaux endogènes, mais la principale rapportée dans la littérature est la mitochondrie (Diaz et al., 2003). À ce jour, neuf enzymes mitochondriales ont été identifiées comme étant capable de produire des dérivés réactifs d'oxygène (*ROS* : *Reactive Oxygen Species*) (**Tableau 1**) (revues récemment par Andreyev et al., 2005). On attribue généralement la majeure partie de la production d'anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) à la chaîne de transport d'électrons au niveau de ses complexes I et III dans une proportion se situant entre 1 et 3 pourcent de l'oxygène consommé (Diaz et al., 2003). Certains auteurs ont toutefois émis des réserves quant à la proportion d'oxygène convertie en ROS par la mitochondrie en conditions physiologique (Nohl et al., 2005), critiquant les méthodes utilisées pour quantifier cette production sur des mitochondries isolées. Toutefois, la production de radicaux au niveau de la mitochondrie demeure indéniable, mais les conditions la déterminant restent en partie incomprises.

**Tableau 1 : Enzymes et complexes enzymatiques mitochondriaux susceptibles de générer des ROS (Andreyev et al., 2005)**

<b>Enzyme (nom anglais)</b>	<b>Localisation et Note</b>
<i>Cytochrome b5 reductase</i>	ME → Oxyde le NAD(P)H cytoplasmique et réduit le Cytochrome b5
<i>Monoamine oxidase</i>	ME → Catalyse l'oxydation des amines biogéniques et libère du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>Dihydroorotate dehydrogenase</i>	MI → Catalyse la conversion du dihydroorotate en orotate (étape de synthèse des pyrimidines nucléotidiques)
<i>Dehydrogenase of α-glycerophosphate</i>	MI → Catalyse l'oxydation du glycerol-3-phosphate en dihydroxyacetone phosphate
<i>Succinate dehydrogenase</i>	MI → Oxyde le succinate en fumarate
<i>Aconitase</i>	MA → Catalyse la conversion du citrate en isocitrate
<i>α-Ketoglutarate dehydrogenase complex</i>	MI → Catalyse l'oxydation de l'α-ketoglutarate en succinyl-CoA
<i>NADH-ubiquinone oïdoreductase (Complex I)</i>	MI → Oxyde le NADH en utilisant le coenzyme Q comme accepteur d'électron
<i>Cytochrome c reductase (Complex III)</i>	MI → Oxyde le coenzyme Q en utilisant le cytochrome c comme accepteur d'électron

**Localisation** : ME=Membrane Externe; MI=Membrane Interne; MA=Matrice

Pour éliminer l'anion superoxyde, la cellule le transforme en **peroxyde d'hydrogène** ( $H_2O_2$ ) et ensuite en eau (les enzymes impliquées seront abordées à la section « Mécanismes de défenses antioxydantes »). Le peroxyde d'hydrogène est lui aussi relativement peu réactif comme agent oxydant (bien que toxique pour la cellule à plus haute dose). Toutefois, il arrive que le peroxyde d'hydrogène réagisse avec le fer ou le cuivre oxydés ( $Fe^{2+}/Cu^+$ ) pour générer l'anion hydroxyl ( $-OH$ ) et un **radical hydroxyl** ( $\bullet OH$ ). Cette réaction porte le nom de « réaction de Fenton » (**Eq. 1**) (Crichton et al., 2002; Kehrer, 2000; Nordberg et al., 2001; Neyens and Baeyens, 2003; Dunford, 2002). Le radical hydroxyle peut aussi être généré par la réaction de Haber-Weiss (**Eq.2**) (Kehrer, 2000; Dunford, 2002) et par la décomposition de l'acide hypochloreux, encore une fois par le fer oxydé (**Eq.3**) (Crichton, 2002; Nordberg et al. 2001). Le radical hydroxyl ( $\bullet OH$ ) est le plus réactif des radicaux avec une demi-vie de l'ordre des nanosecondes. Il réagit au site de formation avec toutes les biomolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines. C'est donc en éliminant l'anion superoxyde générés par la mitochondrie que les radicaux libres les plus puissants peuvent être générés.



Bien que l'anions superoxyde produit par la mitochondrie soit parmi les moins réactifs des radicaux libres (Nordberg et al. 2001), ces derniers peuvent mener à la formation d'une plus large gamme d'agents oxydants, lesquels sont listés avec leur demi-vie dans le **Tableau 2** et dont les relations sont schématisées dans la **Figure 1**.

Parallèlement à la production de dérivés réactifs d'oxygènes s'opère celle des **dérivés réactifs de l'azote** (« *Reactive Nitrogen Species* » : *RNS*). L'**oxyde nitrique** ( $NO\bullet$ ) est un radical produit par la « **Nitric Oxide Synthase** » (*NOS*) à partir de l'acide aminé arginine. Il existe trois groupes de *NOS* : la **neuronale** et l'**endothéliale**, dites constitutive, et la forme **inductible** (Bergendi et al., 1999). La forme inductible sera revue plus en détail sous la rubrique « Oxydation physiologique et oxydation pathologique ». Chacune de ces *NOS* assume des fonctions physiologiques importantes, mais les oxydes nitriques qu'elles produisent peuvent mener à la formation de dérivés toxiques. En effet, oxyde nitrique peut réagir avec l'anion superoxyde pour

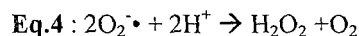
former le **peroxynitrite** ( $\text{ONOO}^-$ ), un agent oxydant non radicalaire très puissant. Ce composé est susceptible de réagir avec les protéines (au niveau des résidus tyrosines, tryptophane, méthionine et selenocystéine) et métalloprotéine, avec les lipides, l'ADN (Groves, 1999; Patel et al., 1999) et certains antioxydants comme la mélatonine (Reiter, 2003). Le peroxynitrite peut aussi réagir avec le  $\text{CO}_2$  pour former un autre composé très réactif, le **nitroso peroxocarbonate** ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ) (Nordberg and Arner, 2001).

### Les mécanismes de défense antioxydante

Pour contrer les effets délétères des radicaux et des oxydants en général, les cellules disposent normalement d'un système de défenses antioxydantes. Ce système de défense implique des molécules de faible poids moléculaire ainsi qu'un système enzymatique (Nordberg et Arner, 2001).

D'abord, il y a la **superoxyde dismutase** (SOD) qui produit du peroxyde d'hydrogène à partir de deux anions superoxydes (Eq.4). Il existe deux isoformes de SOD : la première étant tétramérique et se localisant dans la mitochondrie, la Mn-SOD, et la seconde étant dimérique et localisée dans le cytosol, la Cu/Zn-SOD (Nordberg et Arner, 2001). Il existe aussi une autre enzyme capable de réduire l'anion superoxyde, la *Superoxyde Reductase* (SOR), mais cette dernière est propre à certaines bactéries anaérobies (*Pyrococcus furiosus*) ou microaérophiles (*Treponema pallidus*) capables de réduire le soufre (plutôt que l'oxygène) (Nordberg et Arner, 2001).

#### SOD



Ensuite, il y a la **catalase** qui se situe principalement dans les peroxysomes des cellules mammaliennes (Nordberg et Arner, 2001) et qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Eq.5) (Zámocky et Koller, 1999; Nordberg et Arner, 2001). Cette transformation est cruciale pour éviter que le peroxyde d'hydrogène entre en contact avec le fer ou le cuivre oxydé pour générer de puissants radicaux hydroxyles. La catalase est présente des procaryotes jusqu'aux organismes supérieurs et on en distingue trois types : **catalase** (dite typique), **catalase-peroxidase** et **manganèse-catalase** (dites atypiques) (Zámocky et Koller, 1999).

#### Catalase

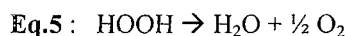


Tableau 2 : Dérivés réactifs radicalaires et non-radicalaires de l'oxygène et de l'azote

Nom français	Nom anglais	Formule	Demi-vie (sec.)
Radical hydroxyl	Hydroxyl radical	$\cdot\text{OH}$	$10^{-9}$
Radical Alcoxyl	Alcoxyl radical	$\text{RO}\cdot$	$10^{-6}$
Oxygène singulet	Singlet oxygen	$^1\text{O}_2$	$10^{-5}$
Radical Peroxyl	Peroxyl radical	$\text{ROO}\cdot$	7
Peroxyde d'hydrogène	Hydrogen peroxide	$\text{H}_2\text{O}_2$	Décomposition enzymatique
Anion superoxyde	Superoxide anion radical	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Décomposition enzymatique
Monoxyde d'azote	Nitric oxide	$\text{NO}\cdot$	1-10
Dioxyde d'azote	Nitrogen dioxide	$\text{NO}_2\cdot$	Indéterminé
Acide nitrique	Nitrous acid	$\text{HNO}_2$	Indéterminé
	Dinitrogen trioxide	$\text{N}_2\text{O}_3$	Indéterminé
	Dinitrogen tetroxide	$\text{N}_2\text{O}_4$	Indéterminé
Anion peroxyntrite	Peroxyntrite anion	$\text{ONOO}^-$	0,05-1,0
Radical semiquinone	Semiquinone radical	--	Jours

(Modifié de Bergendi et al., 1999 et Darley-Usmar et al., 1995)

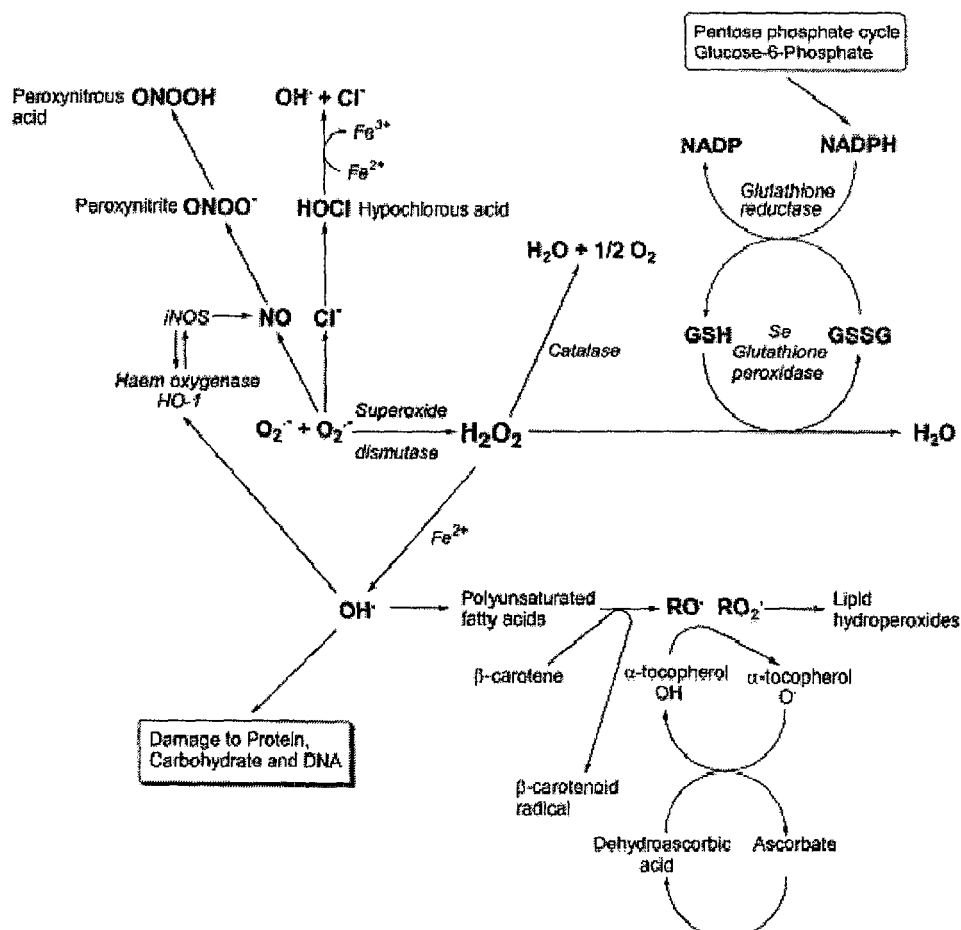


Figure 1 : Relations entre les oxydants et les antioxydants cellulaires (Crichton et al., 2002)

La **glutathion peroxydase** (GPx) catalyse aussi la transformation des peroxydes, dont le peroxyde d'hydrogène, en alcool ou en eau, en oxydant deux glutathions réduits ( $\text{GSH} + \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$ ) (Nordberg et Arner, 2001). On en retrouve au moins quatre types, chacune localisée dans des tissus plus ou moins spécifiques; les GPx1 et GPx4 qui sont cytosoliques et abondantes dans la plupart des tissus, la GPx2 qui est dite gastro-intestinale et la GPx3 localisée au niveau des reins (Nordberg et Arner, 2001).

Le **glutathion** (GSH) est un oligopeptide de trois résidus :  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-Cystéinil-Glycine. Il est le plus abondant des antioxydants intracellulaire comprenant une fonction thiol, et ce, chez tous les organismes aérobies (Nordberg et Arner, 2001). Il peut être lié aux composés époxydés par le cytochrome P450 par l'action du **glutathion S-transférase**, rendant ces composés plus faciles à éliminer. Dans les cas où il est plutôt utilisé par la glutathion peroxydase pour convertir le peroxyde d'hydrogène en eau, le glutathion réduit peut être restitué par l'action de la **glutathion réductase** (GR) à partir du glutathion oxydé ( $\text{GSSG} \rightarrow \text{GSH} + \text{GSH}$ ) (Nordberg et Arner, 2001). Le glutathion est aussi un « *scavenger* » direct du radical hydroxyle ainsi que de l'oxygène singulet (Valko et al. 2007).

Lorsque le système de défense enzymatique ne parvient pas à éliminer à la source tous les radicaux libres, interviennent les molécules antioxydantes de faible poids moléculaire (Figure 2). Celles-ci incluent la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E ( $\alpha$ -tocopherol), les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, lycopène, etc.), les ubiquinones (Pincemail et al., 2002) et l'acide lipoïque (Bast et Haenen, 2002) qui sont d'origine exogène, et l'acide urique (Pincemail et al., 2002), la mélatonine (Reiter, 2003) et la bilirubine (Pincemail et al., 2002) qui sont d'origine endogène.

La **vitamine E** est liposoluble et se distribue donc dans les membranes cellulaires ou dans les transporteurs de lipides (LDL, HDL, etc.). Elle constitue une défense directe contre les radicaux libres (Wolf et al., 1998; Tucker et Townsend, 2005), mais peut aussi terminer les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique protégeant ainsi les lipides membranaires juxtaposés (Nordberg et Arner, 2001, Wolf et al., 1998). À ce jour, huit dérivés de la vitamine E ont été identifiés, lesquels peuvent être divisés en deux groupes, soient les **tocophérols** (à chaîne aliphatique saturée) et les **tocotriénols** (à chaîne aliphatique insaturée) (Tucker et

Townsend, 2005). Chacun de ces deux groupes comporte quatre isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) parmi lesquels l' $\alpha$ -tocophérol est considéré comme étant le plus important en termes d'abondance dans les tissus animaux (Wolf et al., 1998). Une fois que les tocophérols sont oxydés en radicaux tocopheryls, ils peuvent être recyclés à leur forme originale par l'action de la **vitamine C** (sous sa forme *ascorbate*) (Tucker et Townsend, 2005; Nordberg et Arner, 2001; Wolf et al., 1998) qui elle est hydrosoluble et donc en circulation dans le sang et dans le milieu extra cellulaire. Les radicaux ascorbyls et tocopheryls peuvent aussi être recyclés par le glutathion réduit (GSH) (Nordberg et Arner, 2001; Valko et al. 2007).

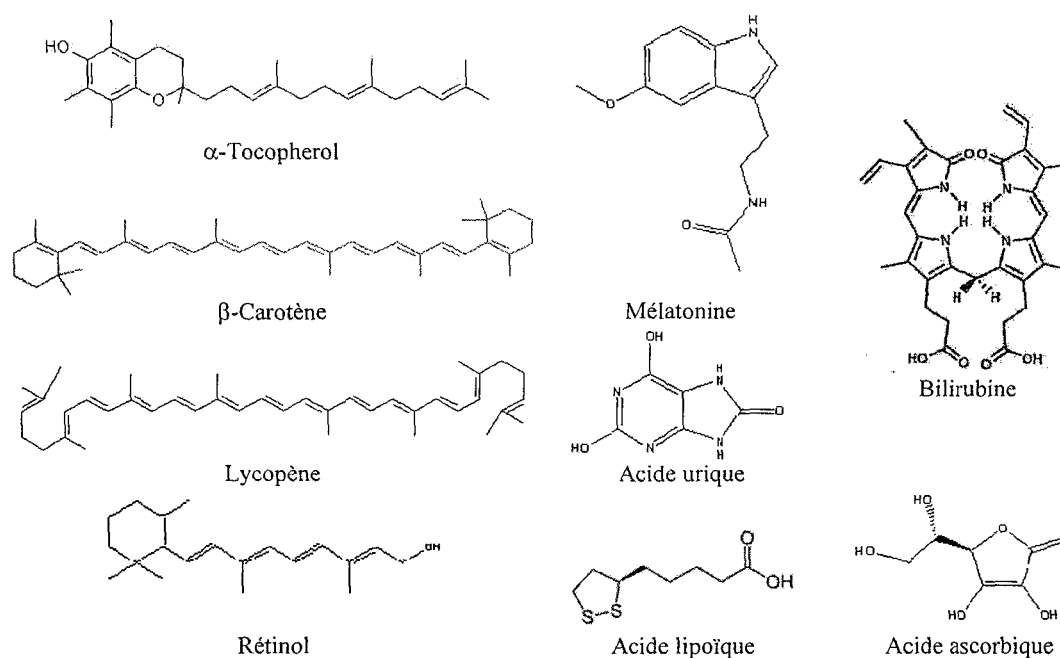


Figure 2 : Antioxydants de faible poids moléculaire

À ce jour, plus de 600 dérivés de **caroténoïdes** ont été identifiées provenant de diverses sources animales ou végétales (El-Agamey et al., 2004). Toutefois, seulement une vingtaine de ces caroténoïdes ont été détectés dans les tissus humains (El-Agamey et al., 2004). Les plus connus sont le  $\beta$ -carotène, le lycopène, la lutéine et le rétinol (El-Agamey et al., 2004). Les caroténoïdes sont liposolubles et se retrouvent ainsi dans les membranes cellulaires. Ils y protègent les lipides membranaires contre les radicaux et s'avèrent particulièrement efficace pour détoxifier l'oxygène singulet (El-Agamey et al., 2004). On attribue toutefois un caractère pro-oxydant aux caroténoïdes lorsqu'ils se retrouvent en trop grande concentration, lorsque la

pression d'oxygène est trop grande ou lorsque le système antioxydant cellulaire est déficient. Ainsi, chez les fumeurs par exemple, la faible concentration sanguine en vitamine C rend les caroténoïdes toxiques plutôt que protecteurs (El-Agamey et al., 2004).

L'**acide urique** est le produit catabolique final des purines chez l'humain et peut assumer un rôle d'antioxydant hydrosoluble (Allen et al., 2004; Chamorro et al., 2004; Reeshemah et al., 2004). On le retrouve dans le sang à des concentrations nettement plus élevées que celle des autres antioxydants (Chamorro et al., 2004). L'acide urique peut être produit par la xanthine oxydase (XO) et la xanthine déshydrogénase (XDH), toutes deux capables de produire l'acide urique à partir de la xanthine; la XO utilise l'oxygène comme accepteur d'électron et produit un anion superoxyde en formant l'acide urique, tandis que la XDH utilise le NAD<sup>+</sup> comme accepteur d'électron et ne produit donc pas d'anion superoxyde (Margaill et al., 2005). La XO et la XDH (toutes deux regroupées sous l'appellation xanthine oxydoréductase ou XOR), ont été détectés chez toutes les espèces étudiées, mais se distribue inégalement dans tous les tissus; chez les mammifères, le foie et l'intestin sont les organes qui présentent la plus grande activité de xanthine oxydo-réductase (Pristos, 2000). L'urate, la forme soluble de l'acide urique, est capable de détoxifier les anions superoxydes, les radicaux hydroxyles et est aussi un chélateur de métaux de transition (Chamorro et al., 2004).

Les propriétés antioxydantes de la **mélatonine** n'ont été découvertes que récemment. Elle est synthétisée et sécrétée par la glande pinéale et on lui attribue diverses fonctions reliées au sommeil et au cycle circadien. Il s'agit d'une molécule liposoluble qui peut franchir la barrière hémato-encéphalique (Beyer et al., 1998) et qui présente un potentiel de « *scavenger* » comparable à celui de la vitamine E et de la vitamine C, de même que le glutathion (Beyer et al., 1998). Elle peut détoxifier le radical hydroxyl, le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux, l'oxygène singulet, l'anion peroxytrite ainsi que son acide (Reiter, 2003). Elle possède aussi un potentiel antioxydant indirect en induisant la production de glutathion et en protégeant les enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase contre les attaques radicalaires (Reiter, 2003).

Il existe un autre antioxydant endogène aux multiples fonctions : l'**acide lipoïque**. Celui-ci peut détoxifier le radical hydroxyl, l'acide hypochloreux, l'oxygène singulet, mais apparemment pas le peroxyde

d'hydrogène et l'anion superoxyde en conditions physiologiques (Packer et al., 1995). Il est aussi capable, sous sa forme réduite (acide dihydrolipoïque : DHLA) de recycler directement le radical tocopheryl en tocopherol, ou indirectement et de façon plus marquée en réduisant le glutathione oxydé qui à son tour recycle efficacement la vitamine E (Nordberg et Arner, 2001; Packer et al., 1995). L'acide lipoïque est aussi un chélateur de métaux de transition tels que le fer, le cuivre et le cadmium (Packer et al., 1995) et peut aussi recycler le radical ascorbyl en vitamine C (Valko et al. 2007).

De manière toute aussi importante, d'autres protéines que celles évoquées plus haut contribuent à la gestion des agents oxydants en chélatant des métaux de transition susceptibles de générer des radicaux hydroxyles. La **ferritine**, par exemple, peut emmagasiner quelques milliers d'atomes de fer (autour de 4000), afin de prévenir les réactions de *Fenton* (Arosio et Levi, 2002; Arredondo et Núñez, 2005). Cette protéine est omniprésente chez les organismes vivants; apparue chez les bactéries et conservée jusqu'aux mammifères (Arosio et Levi, 2002). Une forme mitochondriale a même été rapportée (Arosio et Levi, 2002). Le transport du fer vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule se fait par la **transferrine** qui peut circuler dans le sang et emmagasiner deux atomes de fer. La transferrine peut être transportée par deux protéines membranaires, la **DMT1** (vers le cytosol) et **Ireg1** (vers le milieu extracellulaire) (Arredondo et Núñez, 2005).

Le cuivre, un autre métal susceptible de catalyser la production de radicaux par réaction de Fenton, a lui aussi ses transporteurs et protéines d'entreposage. Lorsqu'il est absorbé par l'intestin, le cuivre est transporté jusqu'au foie lié à la **transcuprein** ou à l'albumine (Gaetke et Chow, 2003). Une fois parvenu au foie, le cuivre peut être entreposé par les **metallothioneines** (Gaetke et Chow, 2003). Le cuivre est véhiculé du foie jusqu'aux tissus principalement par la **ceruleplasmine**, laquelle est capable d'emmagasiner jusqu'à six atomes de cuivre (Gaetke et Chow, 2003).

Chaque molécule ou protéine antioxydante agit de concert avec les autres pour prévenir les dommages induits par les radicaux; c'est-à-dire que chacune a son rôle spécifique, plus ou moins localisé, et a besoin des autres pour mener à bien une protection optimale.



## L'oxydation physiologique et l'oxydation pathologique

Plusieurs considèrent à tort que l'oxydation est néfaste dans tous les contextes. Au contraire, et on le sait particulièrement pour la phosphorylation oxydative de la chaîne de transport d'électrons, l'oxydation est un phénomène nécessaire dans le domaine du vivant. Que ce soit pour générer de l'énergie, moduler l'expression de multiples gènes ou pour se défendre contre les pathogènes, les agents oxydants sont impliqués dans de multiples mécanismes physiologiques. On parle de **stress oxydatif** seulement lorsque les défenses antioxydantes sont surpassées par l'oxydation; ce n'est que dans ce contexte que l'oxydation est indésirable et que des pathologies peuvent survenir. Les défenses antioxydantes peuvent être surpassées par les agents oxydants lorsque leur activité est déficiente, ou lorsque les agents oxydants surviennent en trop grande quantité.

Certaines cellules du système immunitaire des mammifères, dont les **macrophages** et les **neutrophiles**, génèrent des agents oxydants puissants, tel que le peroxyde d'azote ( $\text{ONOO}^-$ ), qui aident à détruire et phagocyter les envahisseurs. Ce peroxyde d'azote est produit quasi instantanément (« *diffusion-limited rate* ») par la rencontre des anions superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), générés par l'isoforme phagocytique de la NAD(P)H oxydase, et du monoxyde d'azote ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), généré par la forme inductible de la « *nitric oxide synthase* » (iNOS). Le monoxyde d'azote est la seule biomolécule connue capable de réagir plus rapidement que la superoxyde dismutase avec les anions superoxyde. Outre ses fonctions antibiotiques, le monoxyde d'azote peut faire office de vasoconstricteur, de relaxant musculaire, d'immunomodulation ou de neurotransmetteur selon le type cellulaire qui le reçoit (Joshi et al., 1999).

## Oxydation-réduction et régulation des gènes

De façon générale, par souci d'économie, les cellules n'ont pas tendance à gaspiller ou à surproduire leurs composantes fonctionnelles. Ainsi, lorsqu'un substrat n'est pas disponible, les cellules ne fabriqueront pas (ou peu) d'enzymes capable de dégrader le substrat en question. À l'inverse, la fabrication d'enzyme s'enclenche dès l'apparition du substrat. Il faut donc que la cellule dispose de récepteurs sensibles à divers stimuli pour bien réguler sa réaction face à son environnement. Il en va de même pour la réponse antioxydante.

Face aux dérivés actifs de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), la cellule peut adopter certains comportements en fonction de l'intensité du stress et sa capacité de le prendre en charge. Lorsque les ROS et RNS sont présents en quantité faible ou modéré et que les défenses antioxydantes cellulaires sont suffisantes pour compenser l'oxydation, la cellule a tendance à proliférer et donc à accroître la synthèse de composantes fonctionnelles (dont les défenses antioxydantes) (Fujino et al., 2006; Joshi et al., 1999). Face à un stress substantiel (où les mutations à l'ADN dépassent la capacité de la cellule à les corriger, ou lorsque l'intégrité mitochondriale est rompue), mais insuffisant pour contrecarrer les mécanismes apoptotiques, la cellule aura plutôt tendance à enclencher son apoptose. Et finalement, si le stress oxydatif est trop intense, la cellule n'aura pas le temps ni les moyens d'enclencher son apoptose et sera détruite par nécrose (Joshi et al., 1999). Contrairement à l'apoptose et la prolifération cellulaire, la nécrose n'est pas régulée par l'expression de gènes.

De façon générale, la réponse d'une cellule face à un stress oxydatif peut être divisée en plusieurs catégories. Bien que la réponse puisse varier grandement d'un type cellulaire à l'autre, la réponse face à un stress oxydatif peut impliquer : (i) la modulation des cytokines et des hormones, pour ce qui concerne leur production, leur sécrétion et leur action, (ii) la modulation du transport ionique, (iii) la modulation des mécanismes transcriptionnels, (iv) une neuromodulation, et tels que précédemment cité, (v) la modulation des mécanismes apoptotiques (Allen et Tresini, 2000; Lander, 1997).

**Tableau 3 : Exemples de fonctions cellulaires régulées par les ROS et les RNS**

Mécanismes	ROS/RNS	Exemples	Tissu
Cytokines	ROS	Libération d'histamine	Mastocytes
	RNS	Expression des protéines IL-1	Cellules musculaires lisses vasculaires
Transport ionique	ROS	Inhibitions des canaux $Cl^-$	Cellules pariétales (épithélium de l'estomac)
	RNS	Inhibition des canaux à $Ca^{2+}$	Monocytes ventriculaires
Transcription	ROS - RNS	Activation du NF- $\kappa$ B	Lymphocytes
Neuromodulation	RNS	Formation de connexions synaptiques	Neurones des récepteurs olfactifs
Apoptose	ROS	Apoptose associée au syndrome de Down	Neurones corticaux

(Tiré de Lander 1997)

À l'échelle moléculaire, l'état d'oxydoréduction du milieu intracellulaire peut être détecté au niveau des protéines par l'entremise de fonctions thiols (état réduit) ou sulfhydriles (état oxydé) (Valko et al, 2006). Il s'agit là d'un des mécanismes cellulaires de sensibilité de l'état d'oxydoréduction les plus courants, dans l'état actuel des connaissances à ce sujet, et est assumé par le **système thioredoxine** (Burke-Gaffney et al.,

2005). Ce système comprends les **thioredoxines**, des enzymes qui portent deux résidus cystéines au niveau de leur site actif et dont les fonctions thiols peuvent être oxydées pour former un lien disulfide, ainsi que les **thioredoxines reductases** qui peuvent réduire les thioredoxines oxydées en leur forme de départ (réduite) (World et al., 2006; Burke-Gaffney et al., 2005; Nordberg et Arner, 2001). Les thioredoxines reductases oxydées peuvent à leur tour être recyclées en réagissant avec une molécule de NADH (World et al., 2006; Burke-Gaffney et al., 2005). L'oxydation ou la réduction des fonctions thiols mène généralement à un changement de conformation de la protéine en question ce qui a pour effet, dépendant du type de protéine portant la fonction, soit de moduler l'affinité de la protéine avec l'ADN (modulation de la transcription), soit de moduler l'activité de la protéine (par la libération ou l'annexion d'unités inhibitrices), soit de moduler la formation de complexes protéiques nécessaire à la transduction de signaux intracellulaires (Allen et Tresini, 2000). Le système thioredoxine est impliqué dans plusieurs états pathologiques dont le cancer, et plus particulièrement dans la résistance des cancers face aux traitements de chimiothérapie (Gromer et al. 2004).

Le **facteur nucléaire  $\kappa\text{B}$**  (NF- $\kappa\text{B}$ ) est un bon exemple de complexe protéique dont l'activité peut être affectée par l'état d'oxydoréduction du milieu intracellulaire. NF- $\kappa\text{B}$  est un facteur de transcription que l'on retrouve dans la plupart des types cellulaires et est impliqué dans l'expression de gènes liés à la survie et la différenciation cellulaire ainsi que l'inflammation et la croissance (Valko et al. 2006) comme par exemple certaines cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), l'iNOS, certaines molécules d'adhésion (E-selectine et VCAM-1) ainsi que les complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC I et MHC II) (Nordberg et Arner, 2001). Ce facteur nucléaire est inactif lorsque lié à son unité inhibitrice (I $\kappa\text{B}$ ), mais mène à l'expression de multiple gènes lorsque cette unité inhibitrice se détache. Aussi, il fut démontré que son activité peut être stimulée par le peroxyde d'hydrogène et les radiations UV et, à l'inverse, elle peut être atténuée par l'action de divers antioxydants tels que la vitamine E, le « *Butylated hydroxy anisole* » (BHA), la « *nordihydroguaiaretic* » (NGA), la « *N-acetyl-cystein* » (NAC) et le « *pyrrolidine dithiocarbamate* » (PDTC) (Allen et Tresini, 2000, Valko et al. 2006; Valko et al. 2007). Le facteur nucléaire NF $\kappa\text{B}$  n'est pas le seul à agir de la sorte; une liste non exhaustive de facteurs nucléaires affectés par l'oxydation est présentée ci-dessous dans le **Tableau 3**.

Lorsque les radicaux libres atteignent l'ADN, il peut s'en suivre (i) un arrêt ou une induction de la transcription, (ii) une induction des voies de transduction, (iii) des erreurs de réplication et des (iv) instabilités génomiques pouvant mener à une carcinogénèse (Valko et al. 2007). Ces dommages à l'ADN consistent généralement en des bris simple ou double du brin d'ADN, en des modifications des purines et pyrimidines ou des désoxyriboses, ou encore, en des liaisons fortuites à l'intérieur du brin d'ADN (Valko et al. 2007). La lésion à l'ADN la plus étudiée est la formation de 8-hydroxyguanosine (8-OH-G), un produit mutagénique de l'oxydation des guanines, et constitue un bon marqueur de dommages à l'ADN (Valko et al. 2007).

**Tableau 4 : Exemples de facteurs de transcription contrôlés par l'oxydation ou la réduction** (Kehrer, 2000; Valko et al. 2006; Arrigo, 1999)

<b>Facteur</b>	<b>Nom</b>
Ap-1	<i>Activating protein</i>
Erg	<i>Epidermal growth factor</i>
Elk-1	<i>Extracellular-regulated kinase</i>
GABP	<i>GA-binding protein</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HSF	<i>Heat shock factor</i>
NF-1	<i>Nuclear Factor 1</i>
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i>
PAX-8	<i>Paired box transcription factor</i>
TTF-1	<i>Thyroid Transcription Factor</i>
USF	<i>Upstream Stimulatory Factor</i>

Ainsi donc, vue la vaste gamme de composantes fonctionnelles cellulaires pouvant être affectées par l'oxydation ou la réduction, il n'est pas surprenant de voir une multitude de pathologies associées directement ou indirectement à des processus oxydatifs indésirables. Parmi les pathologies les plus connues et qui impliquent une composante oxydative, on trouve l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, le diabète mellitus, l'Alzheimer, le Parkinson, la sclérose en plaque, la sclérose latérale amyotrophique et plusieurs formes de cancer (ex. : poumons, colon, sein, etc.). Que le stress oxydatif soit la cause ou la conséquence de la maladie, il s'établit souvent un déséquilibre oscillant entre l'oxydation, le dommage cellulaire et la réponse inflammatoire, qui à son tour entretient le stress oxydatif et le dommage cellulaire et ainsi de suite (**Figure 3**).

### Exemples de pathologies impliquant un stress oxydatif

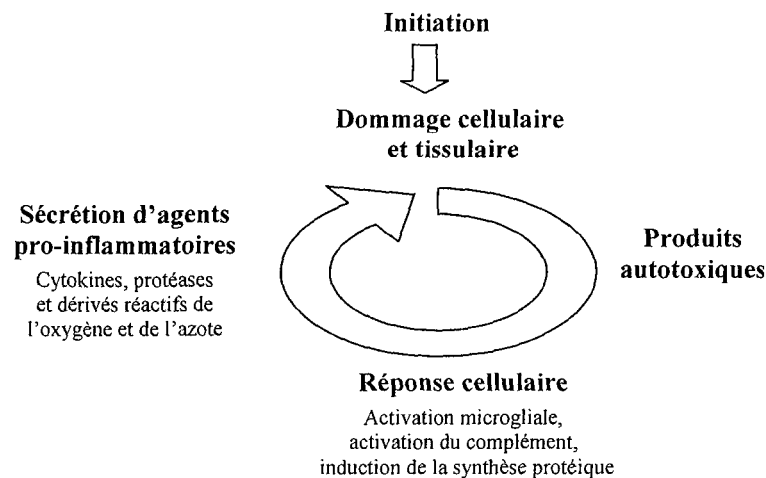
Un **cancer** se développe en une succession d'étapes, commençant par un stade d'initiation où l'ADN subit des dommages non létaux (exemple : 8-OH-G) que la cellule peut en partie réparer lors de sa division. Plusieurs études ont établi une corrélation entre la taille des tumeurs bénignes et leur taux de 8-OH-G et laissent penser que la formation de 8-OH-G pourrait déterminer la transformation de tumeurs bénignes en tumeurs malignes (Valko et al. 2006). Bien que ces lésions à l'ADN puissent aboutir en un cancer malin, les cellules disposent de mécanismes de réparation permettant de l'éviter. Ces mécanismes de réparation ont été mis en évidence sur des foies de souris irradiés où, après cessation de l'irradiation, le taux de 8-OH-G observé diminuait avec le temps (Valko et al. 2006). Lorsque les cellules en stade d'initiation continuent de subir un stress oxydatif, il s'en suit une libération du calcium intracellulaire ou une inclusion du calcium extracellulaire qui peuvent provoquer un ensemble d'évènements comme par exemple, l'expression de certains gènes (Valko et al. 2006). Si le stress oxydatif persiste et que les dommages à l'ADN s'accumulent et ne peuvent pas être corrigés, la cellule enclenchera son apoptose sous l'action de la protéine p53 (aussi responsable de la détection des dommages de l'ADN). Il est intéressant de noter que plus de la moitié des cancers affichent des défaillances des mécanismes de régulation de la protéine p53 (Valko et al. 2006) et que l'activité transcriptionnelle de cette protéine, ainsi que sa capacité à se lier à l'ADN, dépendent de l'état réduit de ses fonctions thiols (Arrigo, 1999). Ainsi, si le stress oxydatif n'est plus suffisant pour solliciter l'apoptose par l'entremise de p53, ni pour provoquer la nécrose cellulaire, il aura plutôt pour effet de promouvoir la division cellulaire (Valko et al. 2006). Ces deux premiers stades de développement d'un cancer sont réversibles, c'est-à-dire que si les agents mutagènes sont éliminés, que le stress oxydatif cesse et que la cellule parvient à réparer les dommages à l'ADN, la tumeur bénigne ne se transformera pas en tumeur maligne. Toutefois, si les conditions mentionnées précédemment persistent et qu'il s'accumule d'autres dommages à l'ADN, la tumeur bénigne deviendra maligne. À ce stade, le processus devient irréversible et se caractérise par une instabilité génétique et une rupture de l'intégrité chromosomique (Valko et al. 2006).

La **sclérose en plaques (SEP)** est également un bon exemple de désordre neurodégénératif à composante inflammatoire impliquant un stress oxydatif. Dans la majorité des cas, la SEP se caractérise par une démyélinisation multifocale du système nerveux central qui survient par épisodes successifs (phase

« poussée-rémission ») et qui éventuellement, après quelques années d'évolution, mène à une dégénérescence diffuse du parenchyme cérébral (phase progressive). La démyélinisation se produit par l'action des lymphocytes T et des macrophages, qui sont des cellules immunitaires périphériques, et des cellules microgliales, qui sont propres au système nerveux central. Durant les épisodes inflammatoires de la phase poussée-rémission, la barrière hémato-encéphalique est rompue au niveau des lésions et permet l'infiltration des cellules immunitaires périphériques (lymphocytes et macrophages). Sur les sites inflammatoires, les dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote sont impliqués autant dans les processus de démyélinisation que dans les processus de dégénérescence neuronale. De plus, les ROS et RNS ont pour effet d'activer certains facteurs de transcriptions tel que NF- $\kappa$ B, lequel mène à l'expression de divers gènes impliqués dans la SEP, comme par exemple celui du « *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  » (TNF- $\alpha$ ), de la forme inducible de la « *Nitric Oxide Synthase* » (iNOS) ainsi que de l'« *Intracellular adhesion molecule* » (ICAM-1) et du « *Vascular-cell adhesion molecule* » (VCAM-1) qui sont toutes deux impliquées dans le trafic des cellules immunitaires périphériques vers le système nerveux central (Gilgun-Sherki et al., 2004). Il fut démontré que l'activité de l'iNOS est amplifiée même chez les astrocytes (Calabrese et al. 2000). L'oxyde nitrique produit par l'iNOS et les RNS qui en découlent ont un effet inhibiteur sur les complexes II-III et IV de la chaîne de transport d'électron mitochondrial, ce qui a pour effet d'accroître la production d'anion superoxyde et, parallèlement, de mener à une déplétion d'ATP et ultimement à la mort cellulaire (Calabrese et al. 2000). L'implication de l'oxydation dans la sclérose en plaques a déjà été mise en évidence lors d'études cliniques. Par exemple, des prélèvements de liquide céphalorachidien ont montré une concentration plus élevée d'isoprostanes et de malondialdéhyde (deux marqueurs de l'oxydation) (Gilgun-Sherki et al., 2004). De plus, une augmentation de la peroxydation lipidique et du taux de glutathion oxydé ont été mis en évidence dans le sérum sanguin des patients en phase active de la maladie, en plus d'une concentration en vitamine E plus faible (Gilgun-Sherki et al., 2004). Finalement, l'étude directe des plaques à l'autopsie révèle aussi un niveau d'oxydation plus élevé et un réseau de défenses antioxydantes moins performant (Gilgun-Sherki et al., 2004).

Finalement, comme dernier exemple de pathologies impliquant une composante oxydative, on retrouve les **maladies cardiovasculaires**, incluant l'athérosclérose, l'hypertension et les défaillances cardiaques.

L'athérosclérose se produit lorsque les résidus d'acide aminés des «*Low-Density Lipoprotein*» (LDL) sont oxydés ou que leurs lipides subissent la peroxydation lipidique (Peluso, 2006). Les LDL ainsi oxydés sont capables d'initier les processus d'athérosclérose dans les parois internes des artères en s'y déposant. L'accumulation de LDL oxydés a pour effet de rétrécir le calibre des artères ainsi que de réduire l'élasticité de leurs parois et, ultimement, d'accroître la pression sanguine (Peluso, 2006). L'accumulation de plaques d'athérosclérose dans les artères peut provoquer l'inflammation qui aura pour effet d'accroître le stress oxydatif par l'intermédiaire de l'iNOS des macrophages (Peluso, 2006). Outre les oxydes nitriques générés par les macrophages, il y a aussi ceux générés par l'eNOS, une des deux formes constitutives de la «*Nitric Oxide Synthase*», qu'on retrouve dans les cellules de l'endothélium vasculaire et dont l'utilité physiologique est de moduler la relaxation musculaire et ultimement la pression sanguine (Elahi et al., 2007).



**Figure 3 :** Modèle de boucle autotoxique proposé pour les mécanismes inflammatoires des maladies neurodégénératives (Torreilles et al., 1999)

## Problématique

Depuis l'apparition des eucaryotes sur Terre, l'oxydation est devenue le compromis entre un plus haut rendement énergétique et la production de dérivés toxiques. L'oxydation étant un phénomène omniprésent dans le domaine du vivant, il n'est pas surprenant de la trouver impliquée dans une multitude de pathologies ou conditions de vie. Souvent, des problèmes de santé surviennent suite à un stress oxydatif ou provoquent celui-ci, mais dans tous les cas où une oxydation non ou mal contrôlée se produit, il pourrait être possible de rétablir la balance oxydants-antioxydants par l'usage de molécules antioxydantes d'origine exogènes.

L'utilisation d'antioxydants exogènes, sans nécessairement guérir ces pathologies, pourrait aider à mieux les contrôler, à atténuer la boucle de dégénérescence, ou encore à accentuer l'effet des médicaments actuellement disponibles. Un bon exemple d'antioxydant exogène ayant démontré son efficacité jusqu'aux études cliniques est le Pycnogenol®, un extrait standardisé d'écorce de pin maritime (Packer et al., 1999). L'écorce du pin maritime est utilisée depuis longtemps dans un contexte de médecine traditionnelle allant même jusqu'à être reconnue par Hippocrate, le père de la médecine, quatre siècles avant J.-C. Ses propriétés antioxydantes et ses propriétés immunomodulatrices ont été mises en évidence *in vitro*, *ex vivo* ainsi que *in vivo*. On reconnaît au Pycnogenol® un pouvoir *scavenger*, un pouvoir de chélateur, de même qu'une capacité à soutenir le réseau d'antioxydants intracellulaires (Packer et al., 1999). On attribue aussi au Pycnogenol® la capacité de moduler l'activité de certains enzymes ainsi que l'expression de certains gènes, comme par exemple une diminution de l'ARNm pour iNOS (Packer et al., 1999). Outre ses activités *in vitro* et *ex vivo*, le Pycnogenol® s'est montré efficace lors d'études cliniques chez l'homme pour réduire la pression systolique, de même que la concentration sanguine des ROS, des LDL et des thromboxanes (Williamson and Manach, 2005).

Parmi toutes les sources possibles de nouveaux composés pharmacologiques ou nutraceutiques potentiels, la disponibilité et l'accessibilité des ressources locales méritent que l'on s'y attarde. Ainsi, dans un contexte de valorisation des biomasses, la biodiversité végétale de la forêt boréale, qui reste encore mal connue d'un point de vue pharmacologique, constitue une réserve potentielle de composés antioxydants. Il en va de même pour la biodiversité animale et, en particulier dans le cas qui nous intéresse ici, la biodiversité marine du fleuve Saint-Laurent.



En ce sens, plusieurs espèces autres que celles disponibles localement ont déjà été étudiées pour évaluer le potentiel antioxydant. Plusieurs espèces de conifères voisines de celles qu'on retrouve dans la forêt boréale québécoise se sont avérées intéressantes avec des activités antioxydantes particulièrement marquées. On note, entre autres, diverses espèces de pins (ex.: *Pinus cembra*, *P. sibirica*), de sapins (ex. : *Abies sibirica*, *A. balsamea*), d'épinettes et de mélèzes (ex. : *Picea Abies*, *Larix decidua*) (Willför et al., 2003; Packer et al., 1999; Gülcin et al., 2003; Pinelo et al., 2004). Comme plusieurs auteurs ont déjà rapporté des potentiels antioxydants intéressants à partir de diverses composantes anatomiques de ces espèces (feuilles, écorces, bois, etc.), il est probable que les espèces présentes localement et qui font partie des mêmes genres présentent elles aussi des potentiels prometteurs. Il en va de même pour certaines espèces d'échinodermes (Matsuno et Tsushima, 1995; Haug et al., 2002) pour lesquelles la littérature scientifique est actuellement moins abondante.

Aussi, comme il existe une vaste gamme de méthodologies disponibles pour évaluer le potentiel antioxydant, un bref chapitre sera consacré à la présentation de quelques-unes de celles-ci et fera office d'introduction au chapitre qui suivra pour rapporter une méthode originale qui permet d'évaluer le potentiel antioxydant dans un contexte cellulaire sur des cellules en culture.

Dans le présent contexte où l'oxydation est reconnue pour être impliquée dans diverses pathologies, et où l'usage d'extraits antioxydant s'est avéré bénéfique lors de certaines études cliniques (avec le Pycnogenol® par exemple), le présent projet a pour objectif principal de mettre en évidence les propriétés antioxydantes d'extraits issus de la biomasse végétale et animale québécoise :

### **Objectifs**

- Élaborer et valider une méthode *ex-vivo* pour évaluer le potentiel antioxydant (Chapitre 2)
- Évaluer le potentiel antioxydant d'extraits issus de la biomasse forestière boréale (Chapitre 3)
- Évaluer le potentiel antioxydant d'extraits issus de diverses sources animales (Chapitre 4)

## CHAPITRE I

### MÉTHODES D'ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT

Il existe plusieurs méthodes qui visent soit à mesurer l'oxydation dans un système donné (chimique ou biologique), soit à évaluer le potentiel antioxydant de composés divers. Aucune de ces méthodes à elle seule n'est suffisante pour caractériser l'oxydation ou la protection contre l'oxydation, mais chacune contribue à la caractérisation globale des activités biologiques des composés ou mélanges testés. Bien que les méthodes disponibles soient sensibles et reproductibles, il reste très difficile, voir pratiquement impossible, de prédire ce qu'il adviendra ultimement chez l'humain. Ce qui suit n'est pas une liste exhaustive de tous les tests disponibles, mais plutôt un aperçu des principaux tests utilisés, en insistant davantage sur les tests *in vitro*.

#### 1.1 Tests *in vitro*

Les techniques d'évaluation *in vitro* du potentiel antioxydant constituent une première approche pour déterminer si un composé chimique peut prévenir l'oxydation. Ces méthodes sont relativement simples, rapides et peu coûteuses par opposition aux méthodes *in vivo*, mais sont moins fidèles à la réalité [biologique] du fait qu'on n'y retrouve pas toutes les variables impliquées lors de l'usage d'un modèle animal. Les méthodes *in vitro* n'impliquent pas de matériel vivant et se résument souvent à des systèmes chimiques relativement simples par rapport à la complexité du vivant. Dans la plupart des cas, il s'agit de méthodes dites indirectes, du fait qu'elles impliquent des substrats synthétiques tels que des fluorochromes comme cible de l'oxydation (Figure IV). Comme la nature chimique de ces révélateurs détermine leur réactivité face aux radicaux, il peut arriver qu'un potentiel ainsi mesuré ne soit pas applicable aux substrats de nature biologique tels que des lipides membranaires par exemple.

### 1.1.1 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

La méthode ORAC est rapportée comme étant un test pour évaluer le potentiel à réduire les radicaux peroxydes (ROO<sup>•</sup>) (Crichton et al., 2002). Originellement conçue avec la B-phycoerythrin (B-PE) comme fluorochrome, elle fut par la suite améliorée en remplaçant la B-PE par de la fluorescéine, un indicateur non protéique et plus stable. La méthode consiste à suivre la perte de fluorescence ( $\lambda$  ex. : 485 /  $\lambda$  em. : 530 nm) de la fluorescéine (3',6'-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanthen]-3-one) lorsqu'elle est oxydée par les radicaux peroxydes générés à partir du AAPH [2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride] (Ou et al., 2001). L'activité de composés testés, traduite par un délai de la perte de fluorescence, est comparée avec celle du 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) pour obtenir un indice d'activité en équivalent Trolox ( $\mu\text{mol Trolox} / \text{mg}$  de produit testé), le Trolox étant la version hydrosoluble de la vitamine E ( $\alpha$ -tocopherol liposoluble). La méthode ORAC a l'avantage d'être peu coûteuse et rapide. Cette méthode est largement utilisée.

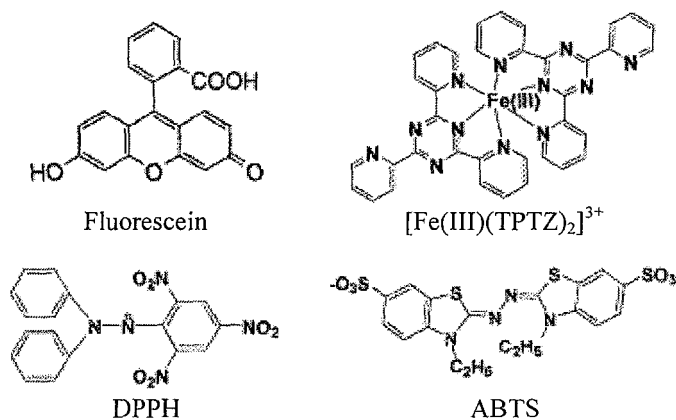


Figure IV : Divers fluorochromes utilisés pour mesurer l'oxydation ou le potentiel antioxydant

### 1.1.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

La méthode FRAP est une autre méthode rapide et peu coûteuse spécifiquement orientée sur la capacité des produits testés à réduire le fer oxydé. Elle consiste à observer durant quatre minutes le changement d'absorbance à  $\lambda$  593 nm et à pH acide, résultant de la réduction du complexe Fe<sup>III</sup>-TPTZ (*ferric-tripyridyltriazine complex*) (Benzie et Strain, 1996; Roginsky et Lissi, 2003). Originellement conçue

pour caractériser le potentiel antioxydant du plasma sanguin, cette méthode est aussi adéquate pour caractériser le potentiel de composés purs. Toutefois, le potentiel de plusieurs molécules, comme par exemple une variété de polyphénols, ne peut être mesuré précisément du fait que leur temps de réaction dépasse les quatre minutes standard de cinétique (Huang et al., 2005). De plus, il fut montré que certains produits de réactions entre le révélateur et le produit testé peuvent interférer avec la mesure d'absorbance. C'est le cas par exemple de la bilirubine qui se transforme en beliverdine lorsqu'oxydée, laquelle absorbe à 593 nm et mène à une surestimation du potentiel réducteur de la bilirubine (Huang et al., 2005). Comme cette méthode n'implique aucun substrat oxydable, elle ne renseigne en rien sur la capacité du produit testé à protéger quelconque substrat biologique contre l'oxydation (Frankel et Meyer, 2000).

### 1.1.3 DPPH

Le DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un radical azoté stable qui absorbe la lumière UV et visible avec un maximum d'absorption à  $\lambda$  515 nm. Lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène, il perd sa couleur (Huang et al., 2005). Le test en soi est relativement simple, mais présente quelques limitations. Comme le DPPH est relativement stable, il peut arriver que des antioxydants normalement efficaces contre les dérivés réactifs de l'oxygène restent inertes face au DPPH (Huang et al., 2005). De plus, certaines réactions avec le DPPH sont réversibles et peuvent mener à une sous-estimation du potentiel des produits testés. C'est le cas par exemple pour l'Eugénol® (Huang et al., 2005). Toutefois, le DPPH est plus spécifique que l'ABTS<sup>+</sup> (voir ci-dessous) du fait qu'il ne réagit pas avec les flavonoïdes (qui ne contiennent pas de fonction alcool sur le cycle B) ni avec les acides aromatiques ne contenant qu'une seule fonction alcool (Roginsky et Lissi, 2005). Finalement, le radical DPPH peut réagir avec d'autres radicaux alkyl et le ratio de concentration entre le produit testé et le DPPH peut faire varier la linéarité de la courbe de réponse (absorbance) (Frankel et Meyer, 2000).

### 1.1.4 TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) avec ABTS'

ABTS est un autre révélateur radicalaire dont le spectre d'absorption se situe entre 600 et 750 nm (bleu-vert). Lorsque ce radical réagit avec un antioxydant, il perd sa couleur et sa capacité d'absorption. Il existe plusieurs procédures de préparation du radical cationique ABTS<sup>+</sup> [*2,29-azinobis(3-ethylbenzothiozoline-6-sulphonic acid) diammonium salt*] à partir de sa forme non radicalaire: entre

autres, le AAPH, le  $K_2S_2O_8$  ainsi qu'une méthode électrochimique ont été publiées (Roginsky et Lissi, 2005). Comme avec les tests ORAC et TRAP (ci-dessous), le résultat du TEAC, comme son nom l'indique, est rapporté sur le potentiel antioxydant du Trolox (Huang et al., 2005; Roginsky et Lissi, 2005). Bien que cette méthode soit rapide et relativement aisée, elle pose toutefois certaines limitations. D'abord, l'activité mesurée dépend de la durée de l'incubation et de la proportion du produit testé par rapport à la concentration en  $ABTS^+$  (Roginsky et Lissi, 2005). De plus, la méthode reflète davantage la capacité d'un produit testé à réagir avec l' $ABTS^+$  que son potentiel antioxydant réel dans un contexte biologique. En effet, le radical artificiel  $ABTS^+$  réagit avec toutes les fonctions hydroxyles aromatiques, indépendamment de leur pouvoir antioxydant réel (Roginsky et Lissi, 2005; Frankel et Meyer, 2000). Une version plus simple et moins coûteuse a été publiée et substitue le radical  $ABTS^+$  par un autre, le  $DMPD^+$  (N,N-diméthyl-p-phenylenediamine) (Roginsky et Lissi, 2005).

### 1.1.5 TRAP

Le *Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter Assay* a été mis au point originellement avec la protéine fluorescente R-phycoerythrin (R-PE) qui perd sa fluorescence sous l'action du AAPH ou du ABAP [*2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride*]. Le potentiel antioxydant des produits ainsi mesuré est rapporté en équivalent Trolox (Huang et al., 2005). À l'inverse du test ORAC, le Trolox n'est pas administré dans un groupe contrôle indépendant, mais plutôt subséquemment au produit testé, au moment où la fluorescence est réduite de moitié par rapport à la fluorescence initiale. Ainsi, le délai d'oxydation («*lag time*»), représenté graphiquement par une absence momentanée de perte de fluorescence, est utilisé pour calculer le résultat final (plutôt que d'utiliser l'aire sous la courbe de fluorescence) (Huang et al., 2005). Cette méthode a été largement utilisée par plusieurs groupes de chercheurs et éventuellement modifiée pour utiliser la dichlorofluorescein diacétate (DCFH-DA) comme fluorochrome. La DCFH-DA est plus stable que la B-PE et contrairement à cette dernière, elle devient fluorescente lorsqu'elle est oxydée (Huang et al., 2005). Comme les radicaux sont générés par la décomposition thermique de l'AAPH ou du ABAP, cette méthode ne peut détecter l'activité des chélateurs de métaux (capables de générer des radicaux par réaction de Fenton) tels que l'urate (Frankel et Meyer, 2000).

### 1.1.6 Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont souvent rapportés comme étant de puissants antioxydants qu'on retrouve entre autres dans les vins rouges et dans les petits fruits colorés. Le dosage de ces composés n'est donc pas un test pour mesurer le potentiel antioxydant mais bien une méthode pour en faciliter la découverte. Cette méthode de dosage est souvent utilisée parallèlement à des tests de potentiel antioxydant pour estimer la contribution des composés phénoliques à l'activité antioxydante. La méthode la plus utilisée pour se faire consiste à faire réagir la solution testée avec le réactif commercial Folin-Ciocalteu pour former des complexes moléculaires qui absorbent la lumière à 758 nm (Singleton et Rossi, 1965). Le résultat de ce test est souvent exprimé en termes d'équivalents en acide gallique (Roginsky et Lissi, 2005).

Cette méthode est simple, rapide et peu coûteuse mais n'est pas absolue; c'est-à-dire que la valeur mesurée peut refléter davantage le potentiel réducteur (Huang et al., 2005) que la composition phénolique réelle et il peut donc y avoir interférence avec d'autres composés susceptibles de réagir avec le Folin-Ciocalteu comme par exemple les protéines et les sucres réducteurs (Huang et al., 2005).

Les anthocyanes sont une sous-catégorie des composés phénoliques et font partie de la famille des flavonoïdes. On les retrouve donc dans les mêmes sources que ces derniers (en particulier dans les bleuets) et pour les mêmes raisons, il peut être d'intérêt de les doser. Il existe différentes méthodes simples de dosage des anthocyanes qui consistent généralement à mesurer l'absorbance à différents pH et différentes longueurs d'ondes. Le résultat de ces méthodes est souvent rapporté en équivalent cyanidine-3O-glucoside. Bien que ces méthodes soient rapides et faciles, elles sont aussi sujettes à divers biais dus aux différents complexes que peuvent former les anthocyanes sous certaines conditions (Prodanov et al. 2005).

### 1.1.7 Liposomes

Les liposomes sont de petites vésicules lipidiques utilisés dans une variété d'expérimentations orientées vers plusieurs champs de recherche. Les liposomes peuvent être utilisés pour étudier la répartition de molécules dans une interface hydrophile-hydrophobe (Edwards et Baeumner, 2006). Ils peuvent aussi être utilisés pour protéger et transporter des médicaments dans le contexte d'un organisme

vivant (Edwards et Baeumner, 2006). Outre ces fonctions, les liposomes constituent un bon modèle lipidique pour évaluer le potentiel antioxydant de divers produits (Rackova et al., 2005).

Les liposomes peuvent être préparés avec différents substrats lipidiques et peuvent présenter des caractéristiques physico-chimiques différentes selon les méthodes de préparation. Par exemple, Gutiérrez et al. (2003) ont utilisé plusieurs méthodes pour étudier l'activité antioxydante et l'interaction membranaire du tocopherol et de composés phénoliques à l'aide de liposomes uni- et multi-lamellaires préparés avec un extrait lipidique de cerveau de bœuf. Ils ont pu montrer que l'activité antioxydante est en partie déterminée par l'hydrosolubilité des molécules, ainsi que par l'agent oxydant et la sonde utilisés pour mesurer l'effet antioxydant.

## 1.2 Tests cellulaires (*ex vivo*)

Les méthodes *ex vivo* sont réalisées sur du matériel vivant ou provenant du vivant sans pour autant utiliser d'organismes vivants complets. On parle alors d'organes, de tissus, de cultures cellulaires ou d'éléments issus de cellules comme par exemple des mitochondries. Il s'agit alors d'un compromis entre la simplicité des tests *in vitro* (strictement chimiques) et la représentativité des tests *in vivo* sur modèle animal (sans toutefois l'atteindre).

La description du pouvoir antioxydant d'une molécule donnée peut englober plusieurs paramètres. Le fait est que plusieurs molécules antioxydantes sont multifonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles peuvent agir selon différents modes d'action et chaque molécule antioxydante peut avoir une portée d'action plus ou moins limitée, ou spécifique. Certains antioxydants sont des chélateurs de métaux (qui préviennent la génération de radicaux par réaction de Fenton), tandis que d'autres sont des « *scavengers* » de radicaux. Les tests abiotiques (de nature strictement chimique) ont l'avantage de cerner un nombre limité de ces paramètres; les tests abiotiques sont généralement très spécifiques. Mais comme il fut montré plus haut, cette spécificité peut s'avérer très peu représentative du contexte biologique où les antioxydants devront éventuellement être revalidés. Par exemple, le test ORAC ne renseigne en rien sur la capacité bioprotectrice des molécules testées et le test TRAP ne peut rendre compte du pouvoir chélatant (Frankel et Meyer, 2000).

Les tests sur culture cellulaire englobent généralement plusieurs aspects de l'oxydation. Comme il en fut question dans l'introduction, les cellules disposent normalement d'un système enzymatique pour contrer

les radicaux libres, ainsi, le fait d'impliquer des cellules dans un test de potentiel antioxydant peut, selon la durée et les conditions de ce test, rendre possible la détection d'effets modulateurs de ces enzymes ou de l'expression de certains gènes induits par les molécules testées (Liu et Finley, 2005; Frankel et Meyer, 2000). De plus, le fait d'impliquer des cellules vivantes rend le test plus représentatif du contexte biologique dans lequel les antioxydants pourraient ultimement être utilisés; les cellules vivantes contiennent l'ensemble des biomolécules (protéines, lipides, acides nucléiques, etc.) susceptibles d'être protégées par les antioxydants. Les cellules vivantes comportent des compartiments aqueux ainsi que des compartiments lipidiques; on se retrouve donc avec des interfaces hydrophiles-hydrophobes typiques des contextes biologiques mais que l'on retrouve rarement dans les tests abiotiques (souvent homogènes, soit hydrophiles, soit hydrophobes) (Frankel et Meyer, 2000).

Ce qui suit concernant les tests *ex vivo* présente un exemple d'une méthode standardisée, le dosage du glutathion libre, pour ensuite enchaîner brièvement avec quelques exemples de méthodes cellulaires proposées pour diverses applications spécifiques.

### **1.2.1. Dosage du glutathion libre**

Le glutathion étant l'antioxydant de faible masse moléculaire le plus abondant dans les cellules, son dosage permet d'estimer la capacité antioxydante de celles-ci. Une des méthodes les plus utilisées à cette fin implique l'utilisation de techniques de chromatographie liquide après avoir formé un dérivé stable du glutathion extrait des cellules. Bien que cette méthode soit longue et laborieuse, elle reste relativement précise et reproductible. Une autre méthode a été publiée pour doser le glutathion avec le monochlorobimane, un indicateur non fluorescent qui devient fluorescent ( $\lambda$  ex. : 355, em. : 500 nm) lorsque lié au glutathion par une enzyme intracellulaire, la glutathion-S-transférase (Kamencic et al., 2000). Cette méthode est rapportée comme étant aussi sensible et précise que les méthodes de dosage par HPLC, mais constitue une alternative moins longue et laborieuse.

### **1.2.2 Autres méthodes non standardisés sur cultures cellulaires**

Un certain nombre d'auteurs ont déjà rapporté des potentiels antioxydants de molécules évalués par des méthodes de test sur culture cellulaires. Souvent, des cellules hépatiques sont choisies comme modèle puisque ces lignées cellulaires hépatiques (exemple : HepG2) retiennent plusieurs de leurs



fonctions détoxifiantes (métabolisation des xénobiotiques en vue de les éliminer) ainsi que leur système antioxydant enzymatique (Lima et al., 2006; Liu et Finley, 2005). Des lignées cellulaires issues de tissus digestifs, comme par exemple la lignée Caco-2 (adénocarcinome du colon), peuvent être utilisées pour évaluer l'absorption intestinale et estimer la biodisponibilité des composés testés (Liu et Finley, 2005). Bien que certaines souches cellulaires reviennent plus souvent que d'autres, la spécificité du contexte d'étude peut imposer l'usage d'autres lignées, comme par exemple des cellules endométriales (RL95-2) utilisées par Estany et al. (2007) pour évaluer le potentiel antioxydant du N-acétyl-cystéine dans un contexte d'étude sur l'oxydation dans les problèmes de fertilité. Le fait est qu'aucune lignée cellulaire ne peut couvrir tous les aspects de l'oxydation et des mécanismes de défense antioxydante (Liu et Finley, 2005).

Lima et al. (2006) ont étudié l'effet protecteur de divers composés phénoliques déjà reconnus comme des antioxydants sur des hépatomes (HepG2) soumis à un stress oxydatif induit par le *tert*-butyl hydroperoxyde (tBH). Ils ont mesuré les dommages subits par l'ADN («*Comet assay*»), la déplétion du glutathion libre et la peroxydation lipidique (avec l'acide thiobarbiturique) induits par le tBH; ils ont ensuite comparé ces résultats avec le potentiel anti-radicalaire mesuré par la méthode *in vitro* DPPH et le coefficient de partition des molécules testées. Ils ont pu mettre en évidence que l'hydrophobicité des composés antioxydants testés a autant d'importance que le potentiel anti-radicalaire sur la survie cellulaire et la protection contre les dommages à l'ADN (Lima et al., 2006); ceci reflète bien le problème de partition des molécules dans les interfaces eau-lipides exposé par Frankel et Meyer (2000).

Estany et al. (2007) ont évalué l'effet protecteur de divers antioxydants sur leur modèle cellulaire endométriale (RL95-2) soumis à un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène. Ils ont préalablement déterminé les différents degrés de toxicité du peroxyde d'hydrogène sur leur modèle cellulaire, ainsi que les spectres de concentrations non toxiques de leurs antioxydants. Ils ont ensuite testé des concentrations non toxiques d'antioxydant sur des cellules soumises à des concentrations toxiques et non toxiques de peroxyde d'hydrogène. En comparant différents modes d'administration, il on pu déterminer que le N-acétyl-cystéine prévenait la toxicité à toutes les concentrations toxiques de peroxyde d'hydrogène pour peu qu'elle soit co-administrée avec ce dernier (antioxydant administré en même temps que le stress

oxydatif). Ni le prétraitement, ni le post-traitement (antioxydant administré pour les 24 heures précédant ou suivant le stress oxydatif) ne s'est avéré efficace pour tous les antioxydants testés. Les auteurs suggèrent donc que l'effet protecteur induit par le N-acétyl-cystéine est dû à son pouvoir de «*scavenger*» (Estany et al. 2007). Ces mêmes auteurs rapportent que des potentiels antioxydants inférieurs avec le N-acétyl-cystéine ont été publiés par d'autres équipes de chercheurs utilisant des méthodologies et des lignées cellulaires différentes; ces différences soulignent bien l'impact de la méthodologie et de la lignée cellulaire sur le potentiel antioxydant mesuré.

### 1.3 Tests *in vivo*

Les méthodes *in vivo*, chez la souris ou le rat par exemple, pour évaluer le potentiel antioxydant sont les plus représentatives de la réalité pour sélectionner des composés antioxydants potentiellement actifs chez l'humain. En effet, il est possible sur modèle animal d'étudier la pharmacocinétique des molécules testées, c'est-à-dire leur absorption, leur disponibilité une fois absorbé, leur mode d'action et effets secondaires, leur métabolisation et finalement leur élimination. Une molécule pourrait par exemple avoir été reconnue comme étant très efficace lors de tous les tests *in vitro* et *ex vivo* antécédents et ne montrer aucune activité une fois testée sur modèle animal tout simplement parce qu'elle n'est pas disponible une fois absorbée par l'organisme.

#### 1.3.1 Dosage du MDA et des TBARS

Cette méthode est destinée à quantifier le malondialdéhyde (MDA :  $\text{OHC-CH}_2\text{-CHO}$ ) issu de la dégradation des peroxydes lipidiques. On retrouve le MDA à même les tissus ou le plasma et il est éliminé par les voies urinaires. Ainsi, il peut être mesuré dans l'urine de modèles animaux (mais aussi dans le surnageant de cultures cellulaires).

Plusieurs méthodes ont été publiées pour doser le MDA; certains par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) après la formation d'un dérivé avec le pentafluorophenylhydrazine (Yeo et al., 1994) et d'autres utilisant l'absorbance ou la fluorescence du MDA ayant réagi avec l'acide thiobarbiturique (Jentzsch et al., 1996). Si les méthodes utilisant le GC-MS sont plus sensibles et plus précises que les méthodes utilisant l'absorbance ou la fluorescence, elles restent beaucoup plus longues et dispendieuses que ces dernières.

Ce n'est que plus tard, après quelques décennies d'utilisation, que le terme TBARS (*ThioBarbituric Acid Reactive Substances*) est apparu car l'acide thiobarbiturique est susceptible de réagir avec d'autres molécules que le MDA. De plus, le MDA peut apparemment provenir d'autres substrats que les lipides peroxydés, et lorsque que le MDA est généré suite à une peroxydation lipidique, il n'est pas possible de déterminer quel type de lipide a originellement été oxydé.

Cette technique de dosage constitue une approche globale (par opposition aux approches plus spécifiques telles que le dosage des isoprostanes et des neuroprostanes) du fait que le malondialdéhyde peut provenir de n'importe quel tissu de l'organisme. De plus, cette méthode peut être utilisée de manière non invasive en analysant l'urine des modèles animaux utilisés.

### 1.3.2 Dosage des Isoprostanes et Neuroprostanes

Les isoprostanes, aussi appelées prostaglandines, sont des messagers chimiques issus de l'altération enzymatique (par la cyclooxygénase ou COX) ou non contrôlée (par attaque radicalaire) d'acides gras polyinsaturés (PUFAs) tels que l'acide arachidonique (C20:4) et docosahexaénoïque (C22:6) lesquels sont des constituants membranaires (Durand et al., 2004). On leur connaît quelques rôles dont l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la promotion de l'adhésion des polynucléaires neutrophiles et des monocytes et la contraction des muscles lisses. Il existe une variété de 64 isomères possibles lorsque les isoprostanes sont générés par peroxydation lipidique. Ils sont relativement stables une fois générés mais sont éliminés par les voies urinaires dans les quatre heures suivant la production. Il est possible de les mesurer à même les tissus ou à partir de fluides biologiques comme l'urine, le plasma, la bile, le liquide céphalorachidien, le liquide séminal, le liquide péricardique, etc. L'urine a l'avantage, au contraire des autres sources, de contenir très peu de lipides et est donc moins susceptible de générer de nouveaux isoprostanes par autooxydation durant les étapes d'analyse et de conservation (Cracowski et al., 2004).

Deux voies d'analyses existent actuellement, à savoir celles impliquant une chromatographie liquide ou gazeuse suivie d'une spectroscopie de masse et les méthodes immunologiques (Berdeaux et al., 2004). La première est la plus sensible et spécifique tandis que la deuxième approche est plus rapide.

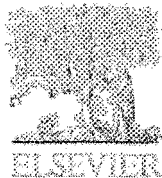
## CHAPITRE II

### ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT SUR CULTURE CELLULAIRE

*Food Chemistry* (2009), doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.002

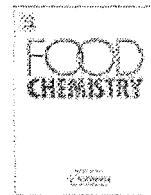
#### Résumé

Il est aujourd'hui reconnu qu'un large spectre de pathologies (dont les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ainsi que l'apparition et le développement du cancer) implique une composante oxydative. Aussi, l'usage de composés antioxydants d'origine exogène est aujourd'hui envisagé comme une solution possible pour mieux contrôler ou remédier à certaines de ces pathologies. Il importe donc de disposer de méthodologies adéquates pour mettre en évidence le potentiel antioxydant des composés issus de sources alimentaires et ceux issus de la pharmacopée végétale ou animale. Le présent travail propose donc une méthode originale sur culture cellulaire destinée à être utilisée complémentirement aux autres méthodes déjà existantes. Cette méthode s'est montrée adéquate pour mesurer le potentiel antioxydant de molécules pures ainsi que du jus de certains fruits et légumes, affichant pour chacun une relation dose-réponse avec des efficacités allant comme suit : quercétine > acide caféique > acide gallique > alpha-tocophérol, pour les produits pures et comme suit pour les extraits d'origine alimentaires : fraises > bleuets > kiwis > pêches. La méthode s'est aussi avérée capable de détecter des potentiels pro-oxydants qui demeurent indétectable avec le test ORAC. Ainsi, une réponse biphasique fut mise en évidence pour le Trolox, lequel affiche un pouvoir pro-oxydant à dose élevée et un potentiel antioxydant à plus faible dose. Un pouvoir pro-oxydant a aussi été révélé pour les extraits de carotte et de brocoli, mais a pu être complètement inhibé par la chaleur pour restituer un pouvoir antioxydant. Cet effet pro-oxydant s'est montré comparable à celui obtenu avec le beta-carotène et un mélange d'isomères de carotène. Finalement, cette méthode originale s'avère aussi sensible que le test ORAC et reste adéquate pour mettre en évidence le potentiel de molécules purifiées, hydrophiles et hydrophobes, de mélanges complexes issus d'extraits d'origine alimentaire en plus de mettre en évidence l'interaction synergétique de divers caroténoïdes.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Analytical Methods

## Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices

Karl Girard-Lalancette, André Pichette, Jean Legault\*

Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, 555 Boulevard de l'Université, Chicoutimi (Québec), Canada G7H 2B1

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 March 2007

Received in revised form 28 November 2008

Accepted 1 December 2008

Available online xxxx

## Keywords:

Vegetables

Fruits

Antioxidant

Pro-oxidant

ORAC assay

Cell-based assay

DCFH-DA

Carrot

Broccoli

 $\alpha$ , $\beta$ -Carotene

## ABSTRACT

Reactive oxygen species play a critical role in cardiovascular diseases, inflammatory diseases, neurodegenerative disorders, cancer and aging. Diets rich in foods containing antioxidants, such as fruits and vegetables, could help prevent these pathologies. It is therefore important to properly assay the antioxidant potentials of these antioxidant foods in order to have a guideline for their proper use. Actual *in vitro* methodologies are often very specific for one mode of action and do not necessarily reflect the normal biological context in which they are used. In this work, we have developed a cell-based assay using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA), a useful indicator of reactive oxygen species (ROS), in order to determine the antioxidant properties of foods, extracts and molecules. Results show a dose-dependent antioxidant activity for pure compounds (in decreasing order of activity: quercetin > caffeic acid > gallic acid >  $\alpha$ -tocopherol) and fruit juices (in decreasing order of activity: strawberries > highbush blueberries > kiwis > peaches). These results are in good agreement with results obtained using the ORAC<sub>H</sub> assay. However, the cell-based assay detected a pro-oxidant effect with broccoli and carrot juices which was not observed using the ORAC<sub>H</sub> assay. Mixed isomers of  $\beta$ , $\alpha$ -carotene isolated from carrots were also found to oxidize DCFH about 212% above control-level. Interestingly, the boiling of broccoli and carrot juices inhibits this pro-oxidant effect and restores the antioxidant properties of the juices. Moreover, the boiling of the  $\beta$ , $\alpha$ -carotene mixed isomers causes their partial degradation and significantly inhibits DCFH oxidation about 68%, suggesting that carotenoids present in broccoli and carrot juices are, in part, responsible for their pro-oxidant effects.

Crown Copyright © 2008 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are involved in such pathologies as cardiovascular diseases (atherosclerosis), inflammatory diseases (asthma, rheumatoid arthritis, allergies), neurodegenerative diseases (Parkinson and Alzheimer diseases), cancer, and aging (Stohs, 1995). The principal ROS formed in biological systems are superoxide anions, hydrogen peroxide, peroxy radicals and hydroxyl radicals (Bergendi, Benes, Durackova, & Ferencik, 1999). ROS can react with and damage many cellular components (proteins, lipids and DNA) (Halliwell, 1996). The cell has evolved many antioxidant enzymatic systems in order to protect itself against ROS. Principal antioxidant enzymes include superoxide dismutase (SOD), which dismutates the superoxide anion into hydrogen peroxide, glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) which eliminates hydrogen peroxide (Mates & Sanchez-Jimenez, 1999). Many small molecules are also involved in ROS detoxification, such as glutathione (GSH),  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C)

(Sies, 1997). In a normal healthy cell, equilibrium is maintained between the generation of ROS and their elimination by the antioxidant system. However, an unbalance can occur when ROS production is greater than the antioxidant defence capacities of the cell, or when the normal antioxidant defences of the cell are inhibited. This unbalance between the oxidant and antioxidant systems, also called oxidative stress, can lead the cellular system towards a pathological state (Sies, 1997).

Diets rich in foods containing antioxidant compounds, such as fruits and vegetables, could help prevent pathologies caused by oxidative stress (Lampe, 1999). Therefore, it is important to evaluate the antioxidant potential of fruits and vegetables in order to be certain of their quality and to develop methods for their optimal conservation. Several *in vitro* methods such as the ORAC assay (oxygen radical absorbing capacity), the TRAP method (total radical-trapping antioxidant parameter) and the TEAC method (trolox equivalent antioxidant capacity) are used for the evaluation of the antioxidant activities of fruit and vegetable extracts (Moreno-Sanchez, 2002; Pellegrini et al., 2003; Proteggente et al., 2002; Wu et al., 2004). *In vitro* tests such as the ORAC assay do not however take into account the physiological conditions of the cell, the

\* Corresponding author. Tel.: +1 418 545 5011; fax: +1 418 545 5012.  
E-mail address: [Jean.Legault@uqac.ca](mailto:Jean.Legault@uqac.ca) (J. Legault).

bioavailability of the antioxidant molecule as well as general cellular metabolism (Liu & Finley, 2005). Moreover, antioxidant molecules present in fruits and vegetables are heterogeneous and multifunctional (Frankel & Meyer, 2000). Many factors can affect their antioxidant potential, such as the affinity of the molecules for the aqueous or lipid phase, the oxidation conditions in the cell as well as the nature of the oxidizable substrate used in the assay (Frankel & Meyer, 2000). Therefore, a one-dimensional assay protocol cannot be used alone to test all relevant parameters (Frankel & Meyer, 2000). A complementary method used to evaluate the antioxidant activities of fruit and vegetable extracts directly in live mammalian cells could be useful. Unfortunately, very few studies use cell culture models to evaluate antioxidant potential. In this work, we have developed a rapid cell-based assay using 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) oxidation to assess the pro- and antioxidant potential of various pure compounds, fruits and vegetables juices.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Fluorescein sodium salt (FL), 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA), 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox), quercetin,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ , $\beta$ -carotene (1:2 mixed isomers from carrot), caffeic acid, gallic acid and 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) were all purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

### 2.2. Sample preparation

Fruits and vegetables were purchased at a local grocery store and refrigerated at once. Fruit and vegetable juices were extracted using a juice extractor. Juices were then vacuum filtered with a 0.22  $\mu$ m filter, frozen at  $-80$  °C and then lyophilized. Dry matter was solubilized in water at 400 mg/ml for the cell-based assay and 100 mg/ml for the ORAC assay. Pure chemicals were dissolved in the appropriate solvents. In order to avoid solvent toxicity in the cell-based assay, the final concentration of solvent in the culture medium was maintained at 0.25% (volume/volume). The sample concentrations tested ranged from 0.5 to  $12.5 \times 10^3$   $\mu$ g/ml for the ORAC assay and from 1 to 1000  $\mu$ g/ml for the cell-based assay.

### 2.3. ORAC<sub>FL</sub> assay

The procedure was performed as described by Ou, Hampsch-Woodill, and Prior (2001) with some modifications. Briefly, the ORAC assay was carried out in black round bottom 96-well microplates (Costar) on a Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems) equipped with an automated injector. Four concentrations of Trolox (the control standard) were used (1.56; 3.13; 6.25 and 12.5  $\mu$ M) in quadruplicate, and a gradient of 16 concentrations of the samples was prepared without replication. The experiment was conducted at 37.5 °C and in pH 7.4 phosphate buffer, with a blank sample in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence ( $\lambda$  ex.: 485 nm/em.: 530 nm) of fluorescein every minute after addition of 375 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), for a total of 35 min. The final results were calculated using the net area under the curves of the sample concentrations for which decrease of at least 95% of fluorescence was observed at 35 min and which also presented a linear dose-response pattern. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per gram ( $\mu$ mol TE/g).

### 2.4. Cell culture

The L-929 murine fibrosarcoma cell line (ATCC #CCL-1) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA). The cells were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, USA), vitamins (1X), sodium pyruvate (1X), non-essential amino acids (1X), penicillin (100 IU) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) (Mediatech Cellgro®). Cells were incubated in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.5. Fluorescence quenching assessment

The sensitivity of the fluorimeter and the curve linearity of DCF are determined with growing concentration of DCF in Hank's buffered salt solution (HBSS) ranging from 60 pM to 125 nM (Fluoroskan Ascent FL™, Labsystems; ex.: 485 nm em.: 530 nm). The DCF fluorescence quenching of each sample is previously tested by measuring fluorescence of increasing concentrations of sample ranging from 0.05 to 12.5 mg/ml with 25 nM DCF in HBSS. Intrinsic fluorescence of each sample is also measured in HBSS (without DCF). The cell-based assay is performed in concentrations of samples which are not fluorescent and which do not quench DCF fluorescence.

### 2.6. Cell-based assay

Pro- and antioxidant activities were evaluated using DCFH-DA probes. L-929 cells were plated in transparent flat bottom 96-well microplates (BD Falcon) at 10,000 cells per well and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells were washed with 150  $\mu$ l of pH 7.4 phosphate buffer saline (PBS) and incubated for 30 min with 100  $\mu$ l HBSS (pH 7.4) containing 5  $\mu$ M DCFH-DA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). The cells were then washed again with 150  $\mu$ l PBS. To assess antioxidant activity, the cells were incubated for 1 h with growing concentrations of pure compounds or extracts in the absence or presence of 200  $\mu$ M *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH). Fluorescence was measured immediately after *t*-BuOOH administration and also 90 min later on the automated plate reader (Fluoroskan Ascent FL™, Labsystems), using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. IC<sub>50</sub> were calculated using the logarithmic regression of the dose-response curve after subtraction of both blank and intrinsic sample fluorescence values. In all cases, the coefficients of determination of the regression ( $R^2$ ) were greater than 0.95. IC<sub>50</sub> are the means  $\pm$  standard deviations of three determinations.

#### 2.6.1. Statistical analysis

The values were expressed as means  $\pm$  standard deviation of three determinations. The results were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by a Student-Newman-Keuls' or Dunn's post hoc test. *P* values of 0.05 or less were considered as statistically significant.

## 3. Results and discussion

The principal objective of this work was to use a cell-based assay to measure the antioxidant potential of natural compounds and mixtures such as fruit and vegetable juices. Some researcher groups have reported the use of 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) in biological systems for the evaluation of natural antioxidants. Takamatsu et al. (2003) reported the screening of some flavonoids for their antioxidant properties on HL-60 cells using a DCFH-DA assay. However, in their assay, (-)-epigallocatechin and quercetin (both positive standards) did not show apparent

antioxidant activities. In another study, Lu et al. (2004) used a DCFH-DA assay to assess the antioxidant activities of procyanidins from grape seeds. Unfortunately, the DCFH-DA cell-based assay used by Lu et al. (2004) was not described. Moreover, Eberhardt, Kobira, Keck, Juvik, and Jeffery (2005) used a cellular assay to evaluate the antioxidant activities of broccoli extracts. However, the positive control used to validate the method was not shown. Recently, Wolfe and Liu (2007) developed a new cellular antioxidant activity assay (CAA), but the method is not very sensitive with  $EC_{50}$  ranging from 3 to 63 mg/ml for various fruit extracts. Consequently, the lack of standardization, uniformity and sensitivity of the DCFH-DA assays in the literature prompted us to develop our cell-based assay conditions to assess the antioxidant activities of natural compounds and mixtures.

### 3.1. Evaluation of pure antioxidant compounds both by a cell-based assay using DCFH oxidation and by the ORAC assay

DCFH-DA is a useful indicator of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress. The nonpolar and non-ionic DCFH-DA crosses cell membranes and is hydrolyzed by intracellular esterases to non-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH). In the presence of ROS such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), lipid hydroperoxides and peroxynitrite, DCFH is oxidized to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). The oxidation is amplified by intracellular ferrous iron ( $Fe^{2+}$ ). The reaction of  $H_2O_2$  with  $Fe^{2+}$  can generate hydroxyl radicals ( $HO\cdot$ ) which can oxidize DCFH. Superoxide anions do not directly oxidize DCFH, however, in biological systems, superoxide dismutase (SOD) transforms superoxide anions into  $H_2O_2$  which can then oxidize DCFH. In addition, DCFH can be oxidized by intracellular oxidases and oxidants formed during the reduction of  $H_2O_2$ . Altogether, these observations indicate that the oxidation of DCFH may be derived from several ROS intermediates (LeBel, Ischiropoulos, & Bondy, 1992; Wang & Joseph, 1999). Therefore, DCFH is useful to indirectly measure the effect of intracellular antioxidant activities in scavenging the ROS and in protecting the DCFH from the oxidation. However, to assess the potency of a compound to inhibit DCF formation, it is important to measure the sensitivity of the fluorimeter to avoid the saturation of the detector and DCF fluorescence quenching induced by vegetable and fruit juices. Therefore, the relative fluorescence of growing concentrations of DCF was measured first, in order to both test the sensitivity of the fluorimeter and confirm curve linearity. In Fig. 1A, results show that relative DCF fluorescence for concentrations ranging from 60 to 1950 pM is linear ( $R^2 = 0.9995$ ). Moreover, a relatively high concentration of DCF (125 nM) does not saturate the detector (data not shown). To test DCF quenching induced by various fruit and vegetable juices, DCF was incubated in the presence of growing concentrations of carrot, broccoli, peach, lemon, strawberry or blueberry juices ranging from 0.05 to 12.5 mg/ml. The results presented in Fig. 1B show that none of the juices significantly quenches DCF fluorescence at concentrations lower than 2 mg/ml except for the lemon juice which quenches about 32% of fluorescence at 0.4 mg/ml. However, at 6.25 mg/ml and more, all tested juices significantly quench DCF fluorescence. Moreover, the higher quenching values at 12.5 mg/ml were obtained with fruit juices including lemon (63%), strawberry (55%), peach (51%) and blueberry (48%) in comparison with vegetable juices such as carrot (19%) and broccoli (10%). These results indicate that a determination of DCF quenching is important before testing the antioxidant potency of fruit and vegetable juices or extracts. Indeed, at high concentrations of fruit juices or extracts a part of the decreasing of DCF fluorescence can be due to DCF quenching and not to antioxidant scavenging.

In the literature, concentrations of DCFH-DA ranging between 5 and 100  $\mu$ M were used to detect intracellular ROS produced in the

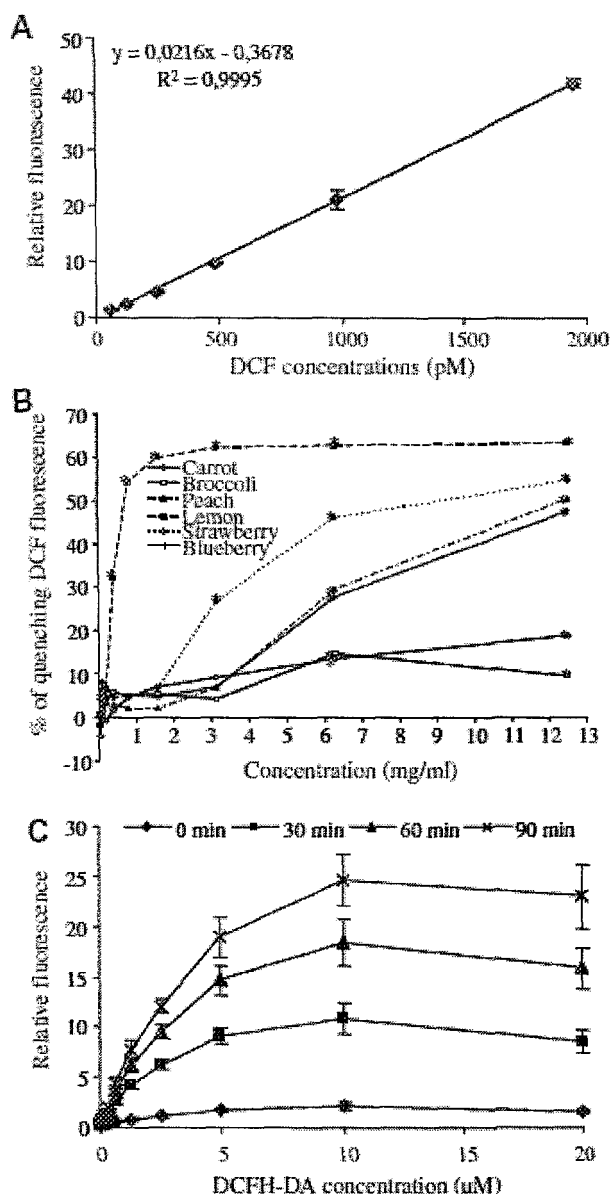


Fig. 1. (A) Standard curve of fluorescent DCF (oxidized product of DCFH) in HBSS (200  $\mu$ l); (B) effect of fruit and vegetable juices on quenching of DCF fluorescence; (C) measurement, using growing concentrations of DCFH-DA (0.04–20  $\mu$ M), of ROS induced after incubation of L-929 cells in *t*-BuOOH (200  $\mu$ M) for 0, 30, 60 and 90 min. \*Significantly different from fluorescence DCF without fruit and vegetable juice;  $p < 0.05$ .

presence of various oxidants. In our cell-based assay, *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH) was chosen as the intracellular oxidizing agent. The optimal concentration of DCFH-DA used to detect intracellular ROS induced by 200  $\mu$ M *t*-BuOOH was next evaluated on the L-929 cell line. Cells were first loaded for 30 min with growing concentrations of DCFH-DA (0.04–20  $\mu$ M), then cells washed to eliminate unloaded DCFH-DA and treated for 30, 60 or 90 min with 200  $\mu$ M *t*-BuOOH. Results presented in Fig. 1C show that the incubation of L-929 cells with 5  $\mu$ M DCFH-DA permits the optimal detection of ROS induced by *t*-BuOOH. At this concentration, relative fluorescence is not significantly different from that observed when using 10 or 20  $\mu$ M DCFH-DA.

The antioxidant activity of Trolox, a water-soluble vitamin E analogue, was then evaluated using both the cell-based assay

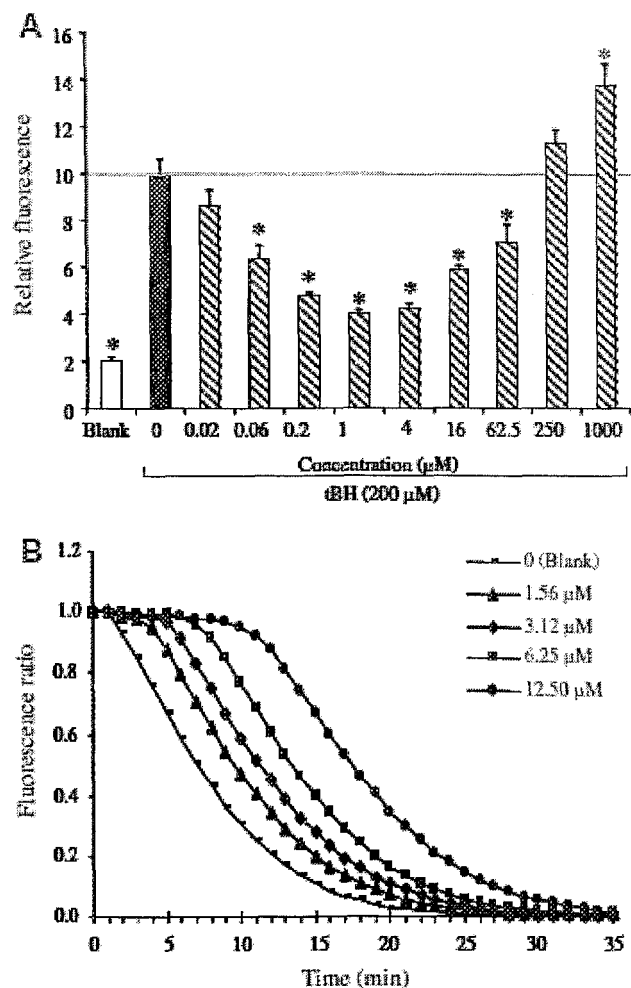


Fig. 2. Evaluation of antioxidant properties of Trolox against treatment with *t*-BuOOH for 90 min using the cell-based assay (A) and against treatment with AAPH using the ORAC<sub>FL</sub> assay (B). \*Significantly different from *t*-BH (200 µM);  $p < 0.05$ .

(Fig. 2A) and the ORAC<sub>FL</sub> assay (Fig. 2B). In Fig. 2A, L-929 cells were pre-treated for 60 min with growing concentrations of Trolox (0.02–1000 µM) and were incubated for 90 min in the presence of 200 µM *t*-BuOOH. Results show that the dose-response curve to Trolox is biphasic. In the first phase, Trolox decreases *t*-BuOOH-induced DCFH oxidation in a dose-dependent manner at doses ranging from 0.02 to 1 µM. In the second phase, Trolox increases *t*-BuOOH-induced DCFH oxidation at concentrations above 250 µM. Antioxidant and pro-oxidant properties of Trolox have already been reported during the Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation of low-density lipoproteins (Albertini & Abuja, 1999). The cell-based assay allows the detection of significant antioxidant activity for Trolox concentrations as low as 0.02 µM. In comparison, the ORAC<sub>FL</sub> assay detect Trolox antioxidant activity at doses higher than 1.56 µM (Fig. 2B). These results show that the cell-based assay is a sensitive assay which allows to detect the anti- and pro-oxidant properties of Trolox. Similar results were obtained with other cell lines including A549, DLD1, HepG2 and WS1 (data not shown).

The activities of pure antioxidant compounds such as quercetin (Fig. 3A), caffeic acid (Fig. 3B), gallic acid (Fig. 3C) and  $\alpha$ -tocopherol (Fig. 3D) were then assessed using the cell-based assay. Results show that all these antioxidant standards inhibit ROS induced by *t*-BuOOH in a dose-dependant manner. In order to compare the antioxidant activities of these standard compounds, concentrations

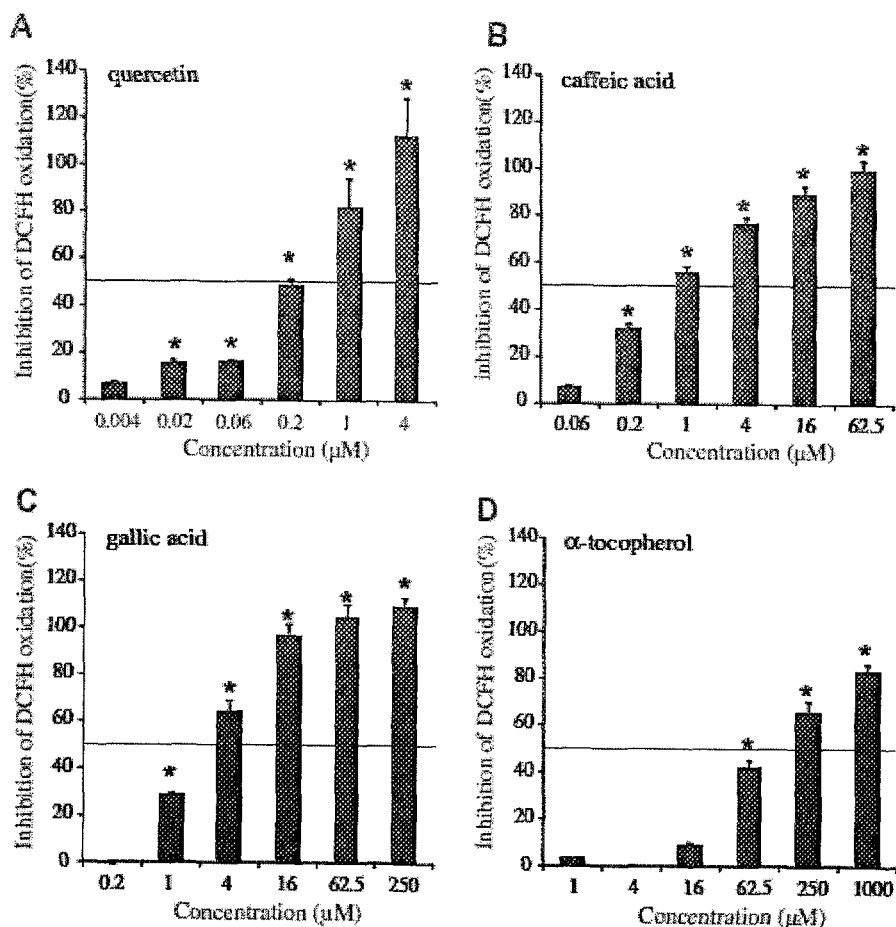
inhibiting DCFH oxidation by 50% (IC<sub>50</sub>) were calculated for each molecule. Regression coefficients ( $R^2$ ) calculated for each logarithmic curve were superior to 0.95. In Table 1, results indicate that the antioxidant potentials (IC<sub>50</sub>) of these standards are classified as such: quercetin (0.11 ± 0.08 µM) > caffeic acid (0.9 ± 0.3 µM) > gallic acid (2.6 ± 0.6 µM) >  $\alpha$ -tocopherol (119 ± 36 µM). A similar antioxidant potential classification was obtained using the ORAC<sub>FL</sub> assay. With regard of quercetin's IC<sub>50</sub>, our cell-based assay is about 50 folds more sensitive in comparison with CAA developed by Wolfe and Liu (2007). Furthermore, the antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol was detected using the cell-based assay, suggesting that DCFH is also present in the cell membranes. Indeed, a NMR chemical shift-polarity study has previously indicated that DCFH-DA and DCFH are located within the lipid bilayer (Afri, Frimer, & Cohen, 2004). This suggests that DCFH can also be used to detect the antioxidant activities of hydrophobic compounds.

### 3.2. Evaluation of the antioxidant potential of fruit and vegetable juices

The antioxidant activities of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*), kiwi, peach and strawberry juices were evaluated using the cell-based assay. The L-929 cell line was pre-treated for one hour with increasing concentrations of fruit juices (16–1000 µg/ml) and then incubated for 90 min in the presence of *t*-BuOOH. Results presented in Fig. 4A show that a low concentration of highbush blueberry juice (16 µg/ml) significantly inhibits DCFH oxidation by about 12.6 ± 0.3%, while kiwi, peach and strawberry juices are slightly pro-oxidant at this concentration. However, this result is not statistically significant in comparison with untreated cells. All fruit juices tested have antioxidant properties at concentrations ranging from 62.5 to 1000 µg/ml. In Table 1, IC<sub>50</sub> values calculated from the logarithmic curves indicate that the antioxidant activity of strawberry juice (52 ± 8 µg/ml) is the greatest, followed by highbush blueberry juice (116 ± 15 µg/ml), kiwi juice (214 ± 30 µg/ml) and finally peach juice (1119 ± 303 µg/ml). The antioxidant potential of fruit juices was also assessed using the ORAC<sub>FL</sub> assay. The ORAC<sub>FL</sub> values for strawberry, highbush blueberry, kiwi and peach juices are respectively of 190 ± 3, 125 ± 9, 70 ± 10 and 26 ± 4 µmol of TE/g of dry matter. These results are consistent with those obtained with the cell-based assay. However, comparison of these results with those from the literature is not easy because ORAC<sub>FL</sub> values for fruits vary with seasons, regions and cultivars (Wang & Lin, 2000; Wu et al., 2004). For example, ORAC<sub>FL</sub> values obtained by Wang and Lin (2000) for strawberry juice ranged from 82 to 153 µmol of TE/g of dry matter, depending on the developmental stage of the fruit (Wang & Lin, 2000). Moreover, a study on the antioxidant capacities of 30 different *Vaccinium* extracts including highbush blueberries showed that ORAC<sub>FL</sub> values ranged from 19 to 131 µmol of TE/g (Moyer, Hummer, Finn, Frei, & Wrolstad, 2002).

The antioxidant activities of two vegetable juices (broccoli and carrot) were also evaluated using both antioxidant assays. The ORAC<sub>FL</sub> values for broccolis and carrots are of 320 ± 20 and 70 ± 10 µmol of TE/g of dry matter, respectively (Table 1). These results are in good agreement with those reported in the literature. Indeed, the antioxidant capacities of different freeze-dried vegetable samples including 59 carrot samples and 130 broccoli samples were analyzed by Ou et al., and the ORAC<sub>FL</sub> values obtained ranged between 25–99 µmol of TE/g for carrot samples and 23–208 µmol of TE/g for broccoli samples (Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Deemer, 2002). Surprisingly, the results obtained with the cell-based assay show that broccoli and carrot juices are strongly pro-oxidant when tested at doses ranging between 2 and 500 µg/ml (Fig. 4B). When compared to the level of DCFH oxidation normally induced by *t*-BuOOH alone, DCFH oxidation was increased





**Fig. 3.** Evaluation of the antioxidant properties of quercetin (A), caffeic acid (B), gallic acid (C) and  $\alpha$ -tocopherol (D) after absorption (60 min) by cells and subsequent exposition (90 min) to 200  $\mu$ M *t*-BuOOH, using the cell-based assay. The horizontal line is set at 50% inhibition. Data shown are the means  $\pm$  standard deviation for three determinations and are representative of three different experiments. \*Significantly different from *t*-BH (200  $\mu$ M);  $p < 0.05$ .

**Table 1**  
Antioxidant effects of compounds, fruit and vegetable juices using the ORAC<sub>FL</sub> assay and the cell-based assay.

Samples	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μg/ml)	ORAC <sub>FL</sub> (TE μmol/g)
$\alpha$ -Tocopherol	43.6 $\pm$ 15 (119 $\pm$ 36) <sup>b</sup>	160 $\pm$ 20
Caffeic acid	0.16 $\pm$ 0.03 (0.9 $\pm$ 0.3) <sup>c</sup>	8000 $\pm$ 1000
Gallic acid	0.4 $\pm$ 0.1 (2.6 $\pm$ 0.6) <sup>c</sup>	6300 $\pm$ 300
Quercetin	0.03 $\pm$ 0.02 (0.11 $\pm$ 0.08) <sup>c</sup>	15000 $\pm$ 4000
Blueberries	118 $\pm$ 15	125 $\pm$ 9
Strawberries	52 $\pm$ 8	190 $\pm$ 3
Peaches	1319 $\pm$ 303	26 $\pm$ 4
Kiwis	214 $\pm$ 30	76 $\pm$ 10
Broccoli	14 $\pm$ 4	380 $\pm$ 20
Broccoli (boiled)	14 $\pm$ 4	210 $\pm$ 90
Carrot	57 $\pm$ 7	70 $\pm$ 7
Carrot (boiled)	57 $\pm$ 37	72 $\pm$ 5

<sup>a</sup> Concentration inhibiting DCFH oxidation induced by *t*-BuOOH by fifty percent.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub> value in micromolar (μM).

<sup>c</sup> Extrapolated value obtained from logarithmic curve.

<sup>d</sup> Pro-oxidant activity.

to 204  $\pm$  3% in cells treated with carrot juice (125  $\mu$ g/ml) and to 179  $\pm$  4% in cells treated with broccoli juice (125  $\mu$ g/ml). The effect of heat on these pro-oxidant activities was then tested by boiling both juices for 30 min at 100 °C. After boiling, both vegetable juices were found to be strongly antioxidant, with IC<sub>50</sub> values of 14  $\pm$  4  $\mu$ g/ml for broccoli juice and 57  $\pm$  37  $\mu$ g/ml for carrot juice. These results suggest that the pro-oxidant compounds are heat-

sensitive. Results presented in Table 1 show that the ORAC<sub>FL</sub> assay did not detect the pro-oxidant activity of vegetable juices and that the boiling of both samples did not significantly affect their ORAC<sub>FL</sub> values. The pro-oxidant effects of carrot and broccoli juices were also confirmed on other human cell lines including normal human fibroblasts (WS-1), a human lung adenocarcinoma cell line (A-549) and a human colon carcinoma cell line (DLD-1) (data not shown).

It is known that carrot and broccoli contain carotenoid compounds such as  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene (Cortes, Esteve, Frígola, & Torregrosa, 2004; Kuriñich et al., 1999). Moreover, it is known that  $\beta$ -carotene exhibits pro-oxidant properties in cultured cells (Palozza, Serini, Di Nicuolo, Piccioni, & Calviello, 2003). The presence of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in our carrot juice was confirmed by thin layer chromatography using a carotene standard (data not shown). The pro-oxidant effects of carrot juice,  $\beta$ -carotene and a mix of  $\beta$ - and  $\alpha$ -carotene isomers isolated from carrots were then evaluated, both before and after boiling, on L-929 cells untreated with *t*-BuOOH. DCFH oxidation in cells untreated with *t*-BuOOH was used as control. Results presented in Fig. 5 show that 4 and 16  $\mu$ g/ml of unboiled carrot juice increased DCFH oxidation by respectively 24  $\pm$  2% and 191  $\pm$  7% above the control-level. In comparison, 200  $\mu$ M *t*-BuOOH increased control-level DCFH oxidation by 384  $\pm$  4%. Boiled carrot juice was also evaluated and did not possess pro-oxidant properties. Increasing concentrations of  $\beta$ -carotene (boiled or not) were then tested on the L-929 cell line for their antioxidant properties. The results indicate that at low concentrations (4 and 16  $\mu$ g/ml)  $\beta$ -carotene is not pro-oxidant. However, 62.5  $\mu$ g/

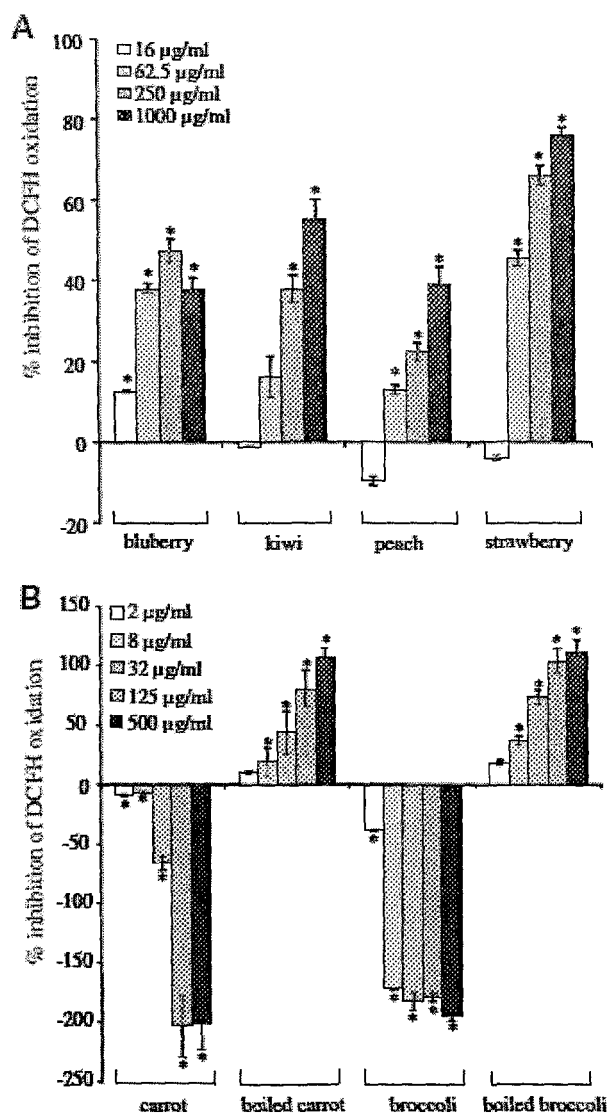


Fig. 4. Evaluation of the antioxidant properties of different fruit juices (A) or vegetable juices (boiled or not) (B) after absorption for 60 min and subsequent exposition (90 min) to 200  $\mu$ M *t*-BuOOH, using the cell-based assay. Negative values indicate a pro-oxidant effect (DCFH fluorescence levels above that of control cells treated with *t*-BuOOH only), whereas positive values indicate an antioxidant effect. Data shown are the means  $\pm$  standard deviation for three determinations and are representative of three different experiments. \*Significantly different from *t*-BH (200  $\mu$ M);  $p < 0.05$ .

ml of  $\beta$ -carotene increased control-level DCFH oxidation by  $29 \pm 2\%$ . As was observed with boiled carrot juice, the boiling of  $\beta$ -carotene significantly reduces (74%) its pro-oxidant properties. Moreover, a mixture of  $\beta$ - and  $\alpha$ -carotene isomers (2:1) isolated from carrots was evaluated on L-929 cells. The mixed isomers (13  $\mu$ g/ml) strongly increased DCFH oxidation ( $212 \pm 12\%$  above control-level), suggesting that  $\alpha$ -carotene is mostly responsible for the pro-oxidant effects of carrot juice and/or that the pro-oxidant effect is due to synergistic interactions between  $\beta$ - and  $\alpha$ -carotene. As was observed for boiled  $\beta$ -carotene, the boiling of the isomer mixture decreased DCFH oxidation from  $68 \pm 7\%$ . It is known that  $\beta$ -carotene is sensitive to thermal degradation (Mader, 1964). Thermal degradation of  $\beta$ -carotene and of the mixed isomers ( $\alpha$ , $\beta$ -carotene) isolated from carrots were evaluated using thin layer chromatography. Results indicate that both the  $\beta$ -carotene and the mixed isomers are, in part, degraded after 30 min of

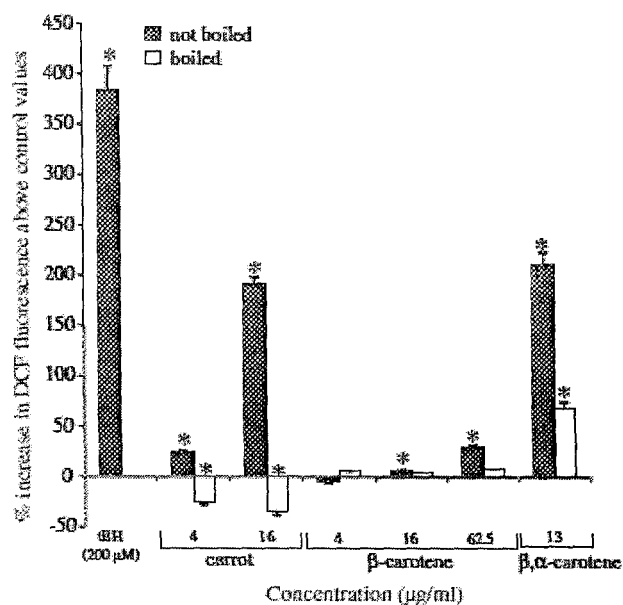


Fig. 5. Pro-oxidant effect after exposition to carrot juice,  $\beta$ -carotene or mixed isomers of  $\beta$ , $\alpha$ -carotene (2:1) isolated from carrots, using the cell-based assay. No subsequent treatment of cells with *t*-BuOOH was performed. DCFH oxidation by untreated cells were used as control (zero). Values greater than zero indicate a pro-oxidant effect, while negative values indicate an antioxidant effect. Data shown are the means  $\pm$  standard deviation for three determinations and are representative of three different experiments. \*Significantly different from blank (200  $\mu$ M);  $p < 0.05$ .

boiling (data not shown). Altogether, these results suggest that  $\beta$ - and  $\alpha$ -carotene participate in the pro-oxidant effects of carrot juice and that their thermal degradation possibly restores the antioxidant activity of the juice.

The pro-oxidant effects of broccoli and carrot juices on cultured cells and animal or human models have not been reported. Palozza (2005) stated that the administration carotenoid-containing fruits and vegetables have never been associated with procarcinogenic effects due to the carotenoids, possibly because the carotenoids are stabilized by other antioxidant nutrients. However, it is important to note that very few studies on fruit and vegetable juices were realized on cultured cells. Recently, Eberhardt et al. (2005) assessed the antioxidant activities of lipophilic and hydrophilic extracts from broccoli using the HepG2 cell line and the ORAC<sub>FL</sub> assay. ORAC<sub>FL</sub> values obtained for the hydrophilic extracts were similar to the results obtained in our study. In contrast, Eberhardt et al. found that both extracts were antioxidant on HepG2 cells. This difference could be explained by the cell line used as well as their culture conditions. Indeed, it has been demonstrated that different chemical and biological environments can modify the redox properties of carotenoids (Palozza et al., 2003). For example,  $\beta$ -carotene becomes pro-oxidant at a high oxygen pressure (Palozza et al., 2003). Therefore, vegetable juices containing carotenoids could be either antioxidant or pro-oxidant, depending on the test conditions. In this work, the cell culture conditions favored the pro-oxidant properties of the vegetable juices.

In conclusion, we have developed a sensitive cell-based assay to assess the pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures such as fruit and vegetable juices. This cell-based assay allows the evaluation, in a biological system, of the antioxidant activities of both hydrophobic and hydrophilic compounds. Altogether, our results show that antioxidant activities measured with the cell-based assay are, in general, in good agreement with values obtained using the ORAC<sub>FL</sub> assay. However, in contrast to the ORAC<sub>FL</sub> assay, the cell-based assay allowed us to reveal the pro-oxi-

dant effect of broccoli and carrot juices and to identify  $\beta,\alpha$ -carotene as the molecules possibly responsible, in part, for this effect. Finally, this work shows that a cell-based assay can bring important additional information to results obtained with the ORAC<sub>FL</sub> assay.

### Acknowledgments

We thank Angélique Longtin for her help and suggestions. The authors would like to thank Vakhtang Mshvildadze for TLC experiments. This work was supported by Action Concertée FQRNT – Fonds de la recherche forestière du Saguenay – Lac-Saint-Jean.

### References

- Afri, M., Frimer, A. A., & Cohen, Y. (2004). Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids*, 131(1), 123–133.
- Albertini, R., & Abuja, P. M. (1999). Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Research*, 30(3), 181–188.
- Bergundi, L., Benes, L., Durackova, Z., & Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65(18), 1865–1874.
- Cortes, C., Esteve, M. J., Frigola, A., & Torregrosa, F. (2004). Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2203–2212.
- Eberhardt, M. V., Kohira, K., Keck, A. S., Juvik, J. A., & Jeffery, E. H. (2005). Correlation analyses of phytochemical composition, chemical, and cellular measures of antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7421.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problem of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925–1941.
- Halliwel, B. (1996). Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, 25(1), 57–74.
- Kurilich, A. C., Tsau, G. J., Brown, A., Howard, L., Klein, R. P., Jeffery, E. H., et al. (1999). Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1576–1581.
- Lampe, J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: Assessing mechanisms of action in human experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 475S–490S.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., & Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2), 227–231.
- Liu, R. H., & Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4311–4314.
- Lu, Y., Zhao, W. Z., Chang, Z., Chen, W. X., & Li, L. (2004). Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(8), 1083–1089.
- Mader, I. (1964). Beta-carotene: Thermal degradation. *Science*, 144(3618), 533–534.
- Mates, J. M., & Sanchez-Jimenez, F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Frontiers in Bioscience*, 4, D339–345.
- Moreno-Sanchez, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 131–137.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Fmi, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *rubus*, and *ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 519–525.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122–3128.
- Palozza, P., Seifini, S., Di Nicuolo, F., Piccioni, E., & Calviella, G. (2003). Prooxidant effects of beta-carotene in cultured cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 353–362.
- Palozza, P. (2005). Can beta-carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740(2), 215–221.
- Pellegrini, N., Sarafin, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., et al. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812–2819.
- Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., et al. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36(2), 217–233.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.
- Stohs, S. J. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 6(3–4), 205–228.
- Takamatsu, S., Galal, A. M., Ross, S. A., Ferreira, D., ElSohly, M. A., Ibrahim, A. R., et al. (2003). Antioxidant effect of flavonoids on DCF production in HL-60 cells. *Phytotherapy Research*, 17(8), 963–966.
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5–6), 612–616.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140–146.
- Walle, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896–8907.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026–4037.

## CHAPITRE III

### ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT DE VÉGÉTAUX DE LA FORÊT BORÉALE

#### Résumé

Les écorces de divers conifères sont traditionnellement utilisés par les amérindiens pour traiter diverses maladies dont certaines, comme la broncho-pneumopathie chronique obstructive et l'arthrite rhumatoïde, impliquent un stress oxydatif. Ainsi, les bienfaits thérapeutiques de ces écorces pourraient, en partie, être induits par leur composition en molécules antioxydantes. La composition phénolique totale ainsi que l'activité antioxydante, mesurée par le test ORAC ainsi que par un test sur culture cellulaire, ont été évalués sur une série d'extractions réalisées sur les écorces de divers conifères de la forêt boréale. Ainsi, les écorces du pin blanc, du pin rouge, du pin gris, de l'épinette noire, de l'épinette blanche, du sapin baumier et du mélèze laricin ont chacune été extraite sous ultrasons selon cinq conditions de solvant, à savoir dans l'éthanol, dans l'eau, ainsi que trois combinaisons des deux solvants (75-25%, 50-50% et 25-75%). La composition phénolique de toutes espèces et méthodes d'extraction confondues varie entre 6 et 61% avec, de façon générale, une composition phénolique plus riche obtenue avec les mélanges d'éthanol aqueux plutôt qu'avec des solvants purs. Les indices ORAC mesurés affichent des potentiels antioxydants non négligeables, variant entre 2 et 22  $\mu\text{mol}$  de Trolox par milligramme d'échantillon testé. De plus, tous les extraits présentent des potentiels antioxydants marqués sur cellules avec des  $\text{IC}_{50}$  tous inférieurs à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Considérant toutes les conditions d'extraction, on observe une corrélation modérée entre l'activité ORAC ou sur cellule avec le dosage de composés phénoliques. On observe toutefois une corrélation beaucoup plus marquée lorsque l'on considère les extraits aqueux seulement, ce qui sous-entend que l'activité mesurée avec les extraits aqueux peut être en bonne partie attribuable aux composés phénoliques. Finalement, les tests sur cellules n'ont révélé aucune toxicité substantielle. Cette étude est à notre connaissance la première à rapporter le potentiel antioxydant des écorces des conifères de la forêt boréale québécoise.

## Antioxidant potential of bark extracts from boreal forest conifers

KARL GIRARD-LALANCETTE, ANDRÉ PICHETTE, DOMINIC DUFOUR AND JEAN LEGAULT\*

Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales, Département des Sciences Fondamentales,  
Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi (Québec), Canada.

### Abstract

The bark of boreal forest conifers has been traditionally used by Native Americans to treat various ailments and diseases. Some of these diseases involve reactive oxygen species (ROS) that can be prevented by the consumption of antioxidants such as phenolic compounds that can be found in medicinal plants. In the context of this study, ultrasonic assisted extraction has been performed under various solvent conditions (water:ethanol mixtures) on the bark of seven boreal forest conifers used by Native Americans including: *Pinus strobus*, *Pinus resinosa*, *Pinus banksiana*, *Picea mariana*, *Picea glauca*, *Larix laricina* and *Abies balsamea*. The total phenol content, as well as ORAC<sub>FL</sub> potency and cellular antioxidant activity (IC<sub>50</sub>), were evaluated for all bark extracts, and compared with the standardized water extract of *Pinus maritima* bark (pycnogenol), which showed clinical efficiency to prevent ROS deleterious effects. Considering all conifers and all extraction conditions, our results reveal higher total phenol content and antioxidant potency than pycnogenol. Moreover, all extracts revealed only a weak or an absence of toxicity on human fibroblasts (WS1). When taking all tested conditions into account, a moderate but significant correlation is found between total phenol content and ORAC<sub>FL</sub> ( $R^2=0.555$ ;  $p<0.05$ ) or antioxidant IC<sub>50</sub> values ( $R^2=0.449$ ,  $p<0.05$ ). Moreover, we found a good and significant correlation when considering water extracts only, suggesting that phenolic compounds may be responsible, in part, for the antioxidant activity of water extracts measured with ORAC<sub>FL</sub> ( $R^2=0.93$ ;  $p<0.05$ ) and the cell-based antioxidant assay ( $R^2=0.81$ ;  $p<0.05$ ).

**Keywords:** conifer, bark, total phenolic compounds, antioxidant, ORAC, antioxidant cell-based assay, *Pinus banksiana*, *Pinus resinosa*, *Pinus strobus*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Larix laricina*, *Abies balsamea*.

\*Corresponding author (telephone: 001 418 545-5011 ext. 2334; fax: 001 418 545-5012 e-mail: Jean\_Legault@uqac.ca

## INTRODUCTION

Native Americans used the plants of the boreal forest to treat various ailments and diseases (Moerman, 2000). The bark of several conifers, such as *Pinus strobus* (white pine), *Picea glauca* (white spruce), *Larix laricina* (Larch tamarack) and *Abies balsamea* (balsam fir), was used. The bark was prepared as decoctions, infusions or poultices to treat gonorrhea, tuberculosis, diarrhea, pain, cold, kidney troubles, burns, inflammation and rheumatoid arthritis (Reagan, 1928; Mechling, 1959; Palmer, 1975; Chandler et al. 1979; Gottesfeld and Leslie, 1992; Moerman, 2000). However, bark was mainly used for cough relief (Lloyd and Westey, 1945; Chandler et al. 1979; Moerman, 2000). Moreover, some species were used as an expectorant to treat breathing difficulties (*Pinus strobus*, *Picea glauca*), and persistent cough (*Larix laricina*) (Moerman, 2000).

Reactive oxygen species (ROS) have been implicated in several diseases for which conifer bark was used, in particular inflammation (Chapple, 1997; Nagata, 2005) and rheumatoid arthritis (Hitchon and El-Gabalawy, 2004). ROS also play a role in chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) (Repine et al., 1997; MacNee, 2005). The COPD are characterized by the secretion of mucus, breathing difficulties, and persistent cough. Several studies indicate that smoking causes COPD (Bohadana et al., 2004). Native Americans living in the boreal forest smoked the leaves and roots of some plants such as *Nicotiana rustica* and *Nicotiana tabacum* (Moerman, 2000) suggesting that COPD was possibly present in this population. Today, COPD represent a major health problem in Native Americans (Rhoades et 1990). Interestingly, the consumption of polyphenolic compounds showed to be beneficial to relieve COPD (Tabak et al., 2001; Arts and Hollman, 2005; Santus et al, 2005; Rahman and Kilty, 2006). The water extract of *Pinus maritima* bark (pycnogenol) is rich in phenolic compounds, mainly procyanidins and phenolic acids, and possesses a strong free radical-scavenging activity against ROS (Packer et al., 1999). Pycnogenol has been reported to increase plasma antioxidant capacity and to significantly improve pulmonary functions and asthma symptoms (Devaraj et al., 2002; Lau et al., 2004). Surprisingly, in spite of the strong potential of bark from boreal forest conifers, the total phenol content and the antioxidant activity remain unknown.

In this study, we reported the total phenol content of bark extracts from seven conifers of the boreal forest, including *Pinus banksiana*, *Pinus resinosa*, *Pinus strobus*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Larix laricina* and *Abies balsamea*. The antioxidant activity of conifer bark extracts was also evaluated using ORAC<sub>FL</sub> and a cell-based antioxidant assay. The results are compared with pycnogenol, a standardized bark extract of *Pinus maritima*.

## MATERIAL AND METHODS

**Chemicals.** 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) were purchased from Aldrich, Folin-Ciocalteu (FC) sodium carbonate decahydrate from Fluka, Fluoresceine disodium salt (FL) and dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), *tert*-butyl hydroperoxyde (t-BuOOH), resazurin (Rz) and Hoescht (Ho) were purchased from Sigma.

**Plant material and preparation of crude bark extract.** All conifer bark specimens were harvested in June 2005 near station Simoncouche in the Réserve faunique des Laurentides, Quebec, Canada. The specimens were identified by Patrick Nadeau (Département des Sciences Fondamentales; Université du Québec à Chicoutimi). Barks were dried at room temperature then powdered and stored à -20°C. All extractions were ultrasonic assisted and performed with 25 g of bark powder in 375 mL of solvent for 30 minutes. Extraction mixtures were constantly mixed with a magnetic agitator and were maintained at 30°C. Each bark sample was extracted in parallel with five different solvent conditions: ethanol:water [0:100], [25:75], [50:50], [75:25], [100:0]. Extraction mixtures were then filtered and dried under vacuum.

**Dosing of total phenol content.** The total phenol content were determined using the Folin-Ciocalteu reagent according to the procedure reported by Singleton and Rossi (1965), with some modifications. Briefly, a volume of 50 µl containing growing concentrations of extract ranging from 0.39 to 50 mg/ml were mixed with 25 µl of 1:2 water diluted Folin-Ciocalteu reagent in transparent flat-bottom 96-well plates (*NUNC*). All manipulations were performed in a light shielded environment. After 5 min of reaction, 125 µl of sodium bicarbonate solution (0.27 g/ml) was added to each well. Absorbance was then measured at 758 nm using an automated 96-well Varioskan Ascent plate reader (*Thermo Electron*). Analysis was performed in duplicate, and the results were expressed in gallic acid equivalents.

**ORAC<sub>FL</sub> assay.** The procedure was modified from the method described by Ou et al. (2001). Briefly, the ORAC assay was carried out in black round-bottom 96-well plate (Costar) on a Fluoroskan Ascent FI™ plate reader (Labsystems). Trolox was used as a control standard. The experiment was conducted at 37.5 °C and pH 7.4, with a blank sample in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence of fluorescein every 60 s after addition of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). The final results were calculated by comparing the net areas under the fluorescein decay curves between the blank and the samples. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram ( $\mu\text{mol TE/mg}$ ).

**Cell culture.** The murine fibrosarcoma L-929 (ATCC #CCL-1) and human skin fibroblasts WS1 (ATCC # CRL-1502) cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). They were grown in Minimum Essential Medium with Earle's salts supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, USA), solution of vitamins (1X), sodium pyruvate (1X), non-essential amino acids (1X), penicillin (100 IU) and streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Mediatech Cellgro®). Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

**Antioxidant cell-based assay.** Antioxidant activity was evaluated using the DCFH-DA assay as described by Legault et al. (2003), with some modifications. Briefly, L-929 cells were plated in 96-microwell plates at 10,000 cells per well and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells were washed with 150  $\mu\text{l}$  Hank's balanced salt solution (HBSS) at pH 7.4 and incubated for 30 min with 100  $\mu\text{l}$  HBSS (pH 7.4) containing 5  $\mu\text{M}$  DCFH-DA (Sigma-Aldrich). The cells were then washed again with 150  $\mu\text{l}$  HBSS. To assess the antioxidant activity, the cells were incubated either with a growing concentration of methanol extract, Trolox or quercetin, in the absence or presence of 200  $\mu\text{M}$  tert-butylhydroperoxide (tBH). Fluorescence was measured after 1 h and 4 h on the automated 96-well plate reader (Fluoroskan Ascent FL™, Labsystems) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Antioxidant activity is expressed as the concentration of extract inhibiting 50% of DCFH oxidation (IC<sub>50</sub>).



**Cytotoxicity assay.** Exponentially growing WS1 cells were plated in flat-bottom 96-well microplates (Costar, Corning inc.) at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well in 100  $\mu$ l of culture medium and were allowed to adhere for 16 hours before treatment. Increasing concentrations of extract in their respective extraction solvent were then added (100  $\mu$ l per well). The final concentration of ethanol or water in the culture medium was maintained at 0.5% (volume/volume) to avoid solvent toxicity. The cells were incubated for 24 h in the presence or absence of extract. Cytotoxicity was assessed using the resazurin reduction test (O'Brien et al., 2000). Fluorescence was measured on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively. Cytotoxicity is expressed as the highest concentration of tested extract inhibiting 20% or less of cell growth in comparison with untreated cells.

**Statistical analysis.** Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation from at least three determinations ( $n \geq 3$ ). Comparisons between groups were performed using the one way Anova analysis followed by a Bonferroni post hoc test. P values of 0.05 or less were considered as statistically significant. Relationship between ORAC, IC<sub>50</sub> and total phenol content were determined using linear regression.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, various extracts of bark from boreal forest conifers were evaluated for their total phenol content and antioxidant potency. The tested conifers were: *Pinus banksiana*, *Pinus resinosa*, *Pinus strobus*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Larix laricina* and *Abies balsamea*. The antioxidant activity and total phenol content were compared with a standardized water extract of *Pinus maritima* bark (pycnogonol) recognized as having a strong antioxidant activity. The main constituents of pycnogonol are phenolic compounds, including monomers (catechin, epicatechin and taxifolin), and condensed flavanoids (procyanidins and proanthocyanidins) (Packer et al., 1999). Pycnogonol also contains phenolic acids, such as caffeic, ferulic, and p-hydroxybenzoic acids (Packer et al., 1999).

### **Extraction yield, total phenol content and cytotoxicity of various conifer bark extracts.**

The bark of each conifer was extracted using sonication with five solvent conditions including water:ethanol [100:0]; [75:25]; [50:50]; [25:75]; [0:100]. The total extraction yields, presented in table 1, show that the extracted quantity ranged from 5 to 30 g for 100 g of powdered bark. For all conifers, the highest yields were obtained when ethanol concentration was of at least fifty percent. For each conifer species, the best extraction yield was obtained with the following conditions of extraction: *Larix laricina*-[25:75] (30 g/100 g), *Picea glauca*-[25:75] (29 g/100 g) and *Picea mariana*-[25:75] (24 g/100 g), followed by *Abies balsamea*-[0:100] (20 g/100 g), *Pinus banksiana*-[0:100] (15 g/100 g), *Pinus strobus*-[50:50] (15 g/100 g) and *Pinus resinosa*-[25:75] (11 g/100 g).

The total phenol content of bark extracts were evaluated using Folin-Ciocalteu assay. This method allows to measure phenolic and polyphenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids, and tannins. The results, expressed as grams of total phenolic compounds for 100 grams of extract, are presented in Figure 1. Pycnogonol was used as a positive control with total phenol content of  $6 \pm 2$  g/100 g. Of all the tested species of conifer barks, *Pinus resinosa*-[50:50], *Picea glauca*-[100:0] and *Picea mariana*-[75:25] were found the richest in phenol compounds

Table 1. Total extraction yield and cytotoxicity.

Conifer species	Extraction conditions (water : ethanol)	Extraction yield <sup>a</sup> (g/100g)	Cytotoxicity <sup>b</sup> ( $\mu$ g/ml)
<i>Pinus banksiana</i>	100 : 0	9	>100
	75 : 25	11	>100
	50 : 50	12	>100
	25 : 75	13	>200
	0 : 100	15	>100
<i>Pinus resinosa</i>	100 : 0	5	>200
	75 : 25	7	>100
	50 : 50	7	>100
	25 : 75	11	>100
	0 : 100	10	>50
<i>Pinus strobus</i>	100 : 0	7	>50
	75 : 25	9	>200
	50 : 50	15	>50
	25 : 75	9	>50
	0 : 100	9	>50
<i>Picea glauca</i>	100 : 0	17	>100
	75 : 25	21	>100
	50 : 50	24	>50
	25 : 75	29	>200
	0 : 100	26	>100
<i>Picea mariana</i>	100 : 0	14	>200
	75 : 25	17	>100
	50 : 50	23	>200
	25 : 75	24	>200
	0 : 100	23	>100
<i>Larix laricina</i>	100 : 0	11	>50
	75 : 25	15	>12.5
	50 : 50	24	>50
	25 : 75	30	>50
	0 : 100	30	>50
<i>Abies balsamea</i>	100 : 0	7	>100
	75 : 25	9	>100
	50 : 50	7	>100
	25 : 75	17	>50
	0 : 100	20	>50

<sup>a</sup>Total extraction yield from 100g of powdered dry powdered conifer bark.

<sup>b</sup>The concentration of conifer bark extract ( $\mu$ g/ml) is considered cytotoxic when it inhibits cell growth >20 % in comparison with untreated cells.

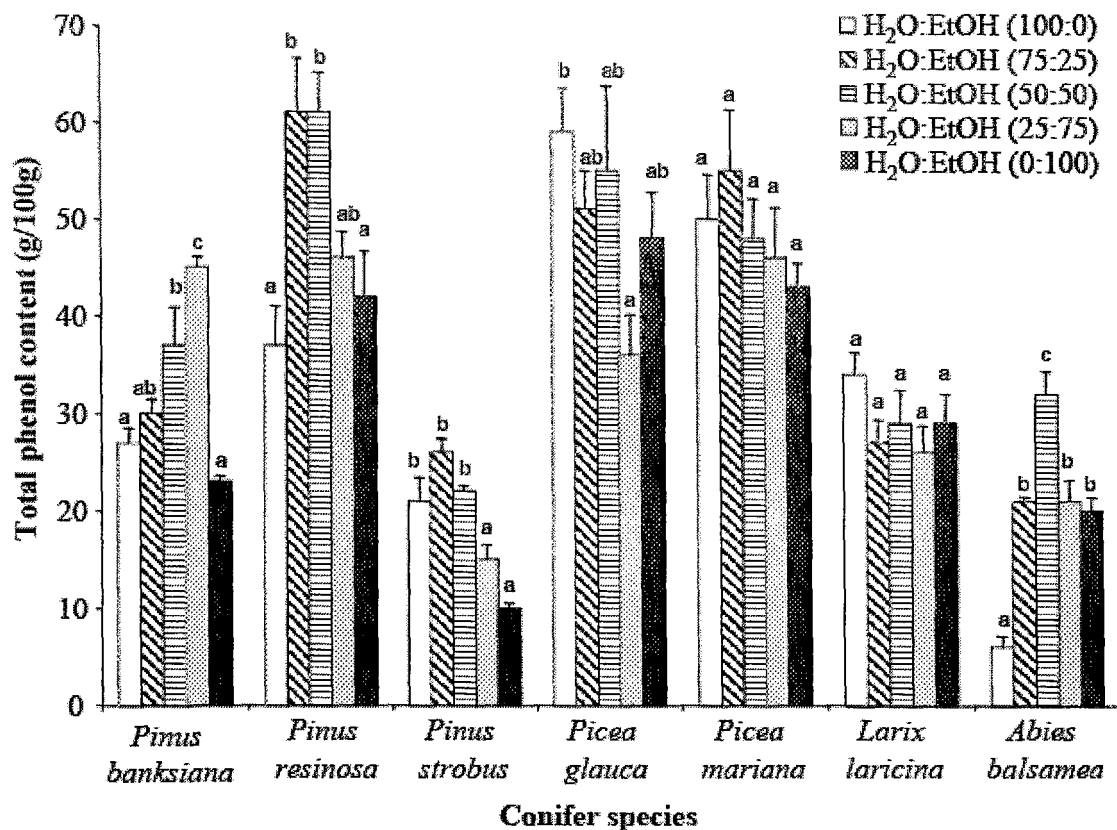


Figure 1 : Total phenol content of bark extracts from conifer of the boreal forest obtained using different conditions of extraction. Data are expressed as grams of phenol per 100 g of dry bark extract. Total phenol content of positive control (pycnogenol) is  $6 \pm 2$  g/100g. All assays were conducted in triplicate, and mean values are used. The vertical bars represent the standard deviation of each data point. Means within each group with different letters (a-c) differ significantly ( $p < 0.05$ ) from each others.

with respectively 61 g, 59 g and 55 g per 100 g of extract. For the other tested species, the highest total phenol content measured in the extracts were in the following order: *Pinus banksiana*-[25:75] (45 g/100 g), *Larix laricina*-[100:0] (34 g/100 g), *Abies balsamea*-[50:50] (32 g/100 g) and *Pinus strobus*-[75:25] (26 g/100 g).

The cytotoxicity of all bark extracts was evaluated on human skin fibroblast WS1. The cells were incubated in the presence or absence of growing concentrations of extracts for 48 hours. In table 1, the results show that all extracts, with the exception of the *Larix laricina*-[75:25] extract, do not inhibit cell growth in doses of 50 µg/ml and less, indicating that the extracts are not cytotoxic for WS1 in these dose ranges. For the *Picea mariana* and *Pinus banksiana* extracts, no cytotoxicity was found in doses as high as 100 to 200 µg/ml.

#### Evaluation of antioxidant activity of extracts using ORAC<sub>FL</sub> and cell-based assay.

The antioxidant activity of bark extracts was evaluated using ORAC and a cell-based assay. ORAC<sub>FL</sub> values are expressed as Trolox equivalent (µmol) by mg of extracts, and cell-based assays are expressed as the concentration inhibiting fifty percent (IC<sub>50</sub>) of tert-butylhydroperoxide (tBuOOH) induced oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH). Pycnogenol was used as a positive control with an ORAC<sub>FL</sub> value of  $2.0 \pm 0.1$  µmol TE/mg and an IC<sub>50</sub> of  $5.9 \pm 0.7$  µg/ml. Results presented in Figure 2 show that ORAC<sub>FL</sub> values of all extracts ranged from 2.4 to 29 µmol TE/mg, while cell-based assay IC<sub>50</sub> values ranged from 5.2 to 0.3 µg/ml. The *Pinus resinosa*-[50:50] possesses the highest ORAC<sub>FL</sub> value with 29 µmol TE/mg. According to the cell-based assay, the results show that the extracts of *Pinus banksiana*-[50:50] and [25:75], *Picea mariana*-[75:25] and *Picea glauca*-[100:0], have a higher antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> smaller than 0.4 µg/ml. The correlation between ORAC<sub>FL</sub> and cell-based assay for all species is weak but significant ( $p < 0.05$ ) with a coefficient of determination  $R^2$  of 0.24. This weak correlation between both methods can possibly be explained by the cellular context of cell-based assay which is not present in ORAC assay.

The antioxidant activity of bark extracts was analysed for each species in order to evaluate the best conditions of extraction. For *Pinus banksiana*, the water:ethanol extracts [50:50] and

[25:75] possess the highest antioxidant activity in comparison with other conditions of extraction. The ORAC<sub>FL</sub> values for *Pinus banksiana*-[50:50] and [25:75] are of  $16 \pm 3$   $\mu\text{mol TE/mg}$  and  $14 \pm 2$   $\mu\text{mol TE/mg}$ , respectively, and their IC<sub>50</sub> are of  $0.30 \pm 0.07$  and  $0.3 \pm 0.2$   $\mu\text{g/ml}$ . Both extracts contain higher phenol concentrations with 37 g/100 g for [50:50] extract and 45 g/100 g for [25:75] extract. The most active extract of *Pinus resinosa* is the water:ethanol [50:50] with an ORAC value of  $29 \pm 5$   $\mu\text{mol TE/mg}$  and an IC<sub>50</sub> of  $0.7 \pm 0.1$ . This extract is very rich in phenol compounds, with 61 g/100 g, suggesting that phenolic compounds are in part responsible for the antioxidant activity. However, the [75:25] extract is also rich in phenol (61 g/100 g) but significantly less active than the [50:50] extract. For *Pinus strobus*, no significant difference was found between the three most active conditions which include the water:ethanol [75:25], [50:50] and [25:75] with ORAC values ranging from 5.0 to 8.5  $\mu\text{mol TE/mg}$  and IC<sub>50</sub> ranging from 0.91 to 2.7  $\mu\text{g/ml}$ . The total phenol content are significantly correlated with cell-based assay but not with ORAC<sub>FL</sub> values. The extracts of *Picea glauca* and *Picea mariana* possess similar antioxidant activities, using both assays. Indeed, the ORAC<sub>FL</sub> values ranged from 11 to 17  $\mu\text{mol TE/mg}$  and the IC<sub>50</sub> ranged from 0.3 to 0.73  $\mu\text{g/ml}$ . The total phenol content of these extracts were also relatively high with concentrations ranging from 36 g to 59 g/100 g. The *Larix laricina*-[75:25] possesses a significantly higher antioxidant activity in comparison with other conditions of extraction. For this extract, the ORAC<sub>FL</sub> value is of 16  $\mu\text{mol TE/mg}$  and the IC<sub>50</sub> is of 0.878  $\mu\text{g/ml}$ . However, the total phenol content for all conditions tested are not significantly different with values ranging from  $27 \pm 2$  g to  $34 \pm 2$  g /100 g. For *Abies balsamea*, the highest antioxidant activity was obtained with water:ethanol [50:50] according to cell-based assay with IC<sub>50</sub> of 0.3  $\mu\text{g/ml}$ . This extract is also significantly richer in phenolic compounds (32 g/100 g) in comparison with other conditions of extraction. In contrast, the highest ORAC<sub>FL</sub> value was obtained with a [0:100] extract (11  $\mu\text{mol TE/mg}$ ) which contained 20 g of phenol by 100 g of extract.

Altogether, these results indicate that conifer bark from the boreal forest is relatively rich in phenolic compounds and possesses a strong antioxidant activity. However, the total phenol content do not always correlate with antioxidant activity. Therefore, the relationship between total phenol content and ORAC<sub>FL</sub> and cell-based assay were analysed.

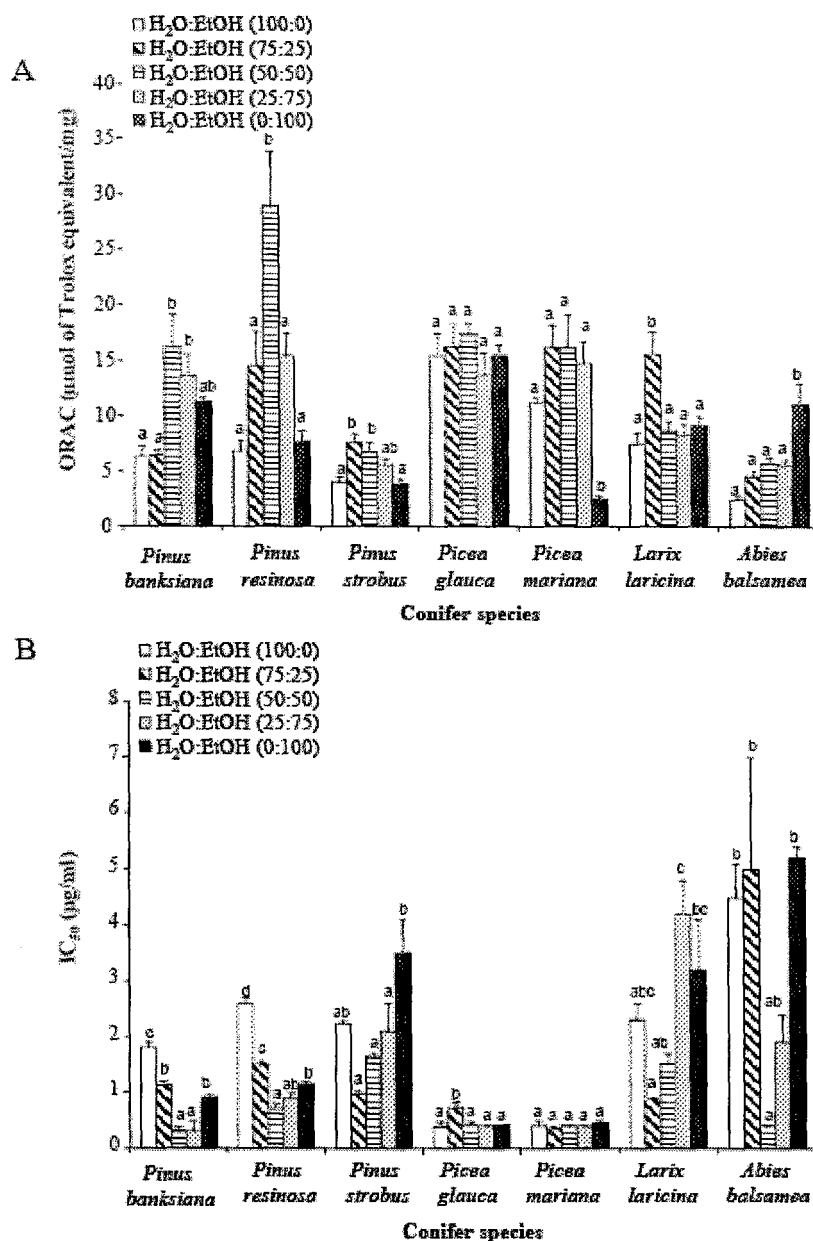


Figure 2 : Antioxidant activity of conifer bark extracts using (A) ORAC assay and (B) cell-based assay. ORAC values are expressed as micromoles of Trolox equivalent per milligram of dry extract. IC<sub>50</sub> values obtained using cell-based assay were expressed as the concentration inhibiting fifty percent of DCFH oxidation induced by tert-butyl hydroperoxide. The ORAC value and IC<sub>50</sub> of the positive control, pycnogenol, are  $2.0 \pm 0.1$  µmol TE/mg and  $5.9 \pm 0.7$  µg/ml respectively. All assays were conducted in triplicate, and the mean values are used. The vertical bars represent the standard deviation of each data point. Means within each group with different letters (a-c) differ significantly ( $p < 0.05$ ) from each others.

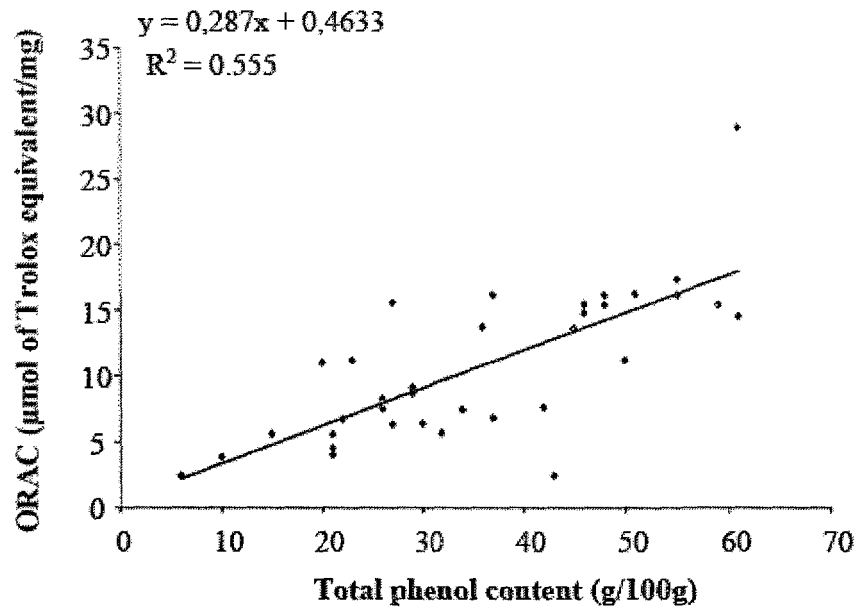
### Relationship between total phenol content and antioxidant activities.

The relationship between the total phenol content and the antioxidant activity (ORAC<sub>FL</sub> and cell-based assay) were determined for all conifer bark at all conditions of extraction and were tested using linear regression analyses (Figure 3). The results of these analyses show that moderate but significant correlations ( $R^2 = 0.56$ ;  $p < 0.05$ ) were found between total phenol content and ORAC (Figure 3A) and between total phenol content and cell-based assay ( $R^2 = 0.45$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 3B). These results suggest that the phenolic compounds could be, in part, responsible for the antioxidant activity.

Native Americans used water infusion of conifer bark to relieve various ailments and diseases (Moerman, 2000). Therefore, water soluble phenolic compounds could be responsible for the activity of conifer bark. The relationship between total phenol content and activity of the aqueous bark extracts was determined for all conifer species (Figure 4). In Figure 4A, a significant correlation is found between total phenol content and the ORAC<sub>FL</sub> values with a coefficient of determination  $R^2$  of 0.93 ( $p < 0.05$ ). In Figure 4B, a significant correlation is also found between total phenol content and IC<sub>50</sub> with a coefficient of determination  $R^2$  of 0.81 ( $p < 0.05$ ). These good correlations suggest that phenolic compounds are responsible for the activity of water extracts for all conifer species. The water extract of *Picea glauca* and *Picea mariana* possess the most significant ( $p < 0.05$ ) total phenol content and antioxidant activities in comparison with other species. Both water extracts are also about 8 to 10 times richer in phenolic compounds and about 5 to 7 times more active than pycnogenol. Moreover, in comparison with pycnogenol, *Pinus banksiana*, *Pinus resinosa* and *Larix laricina* are approximately 3 times more active while *Pinus strobus* is 2 times more active ( $p < 0.05$ ). Finally, *Abies balsamea* reveals a similar antioxidant activity and contains similar total phenol content ( $6 \pm 1$  g/100g) in comparison with pycnogenol ( $6 \pm 2$  g/100g).



A



B

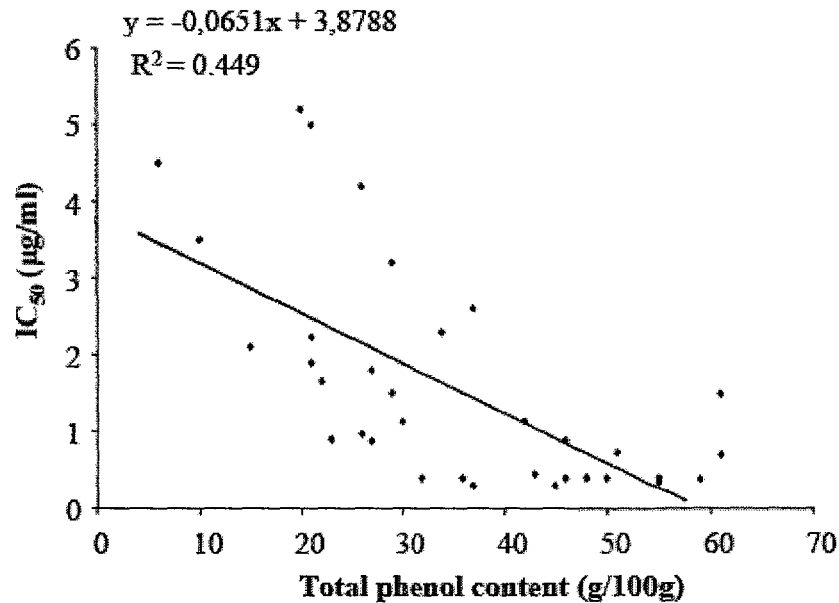
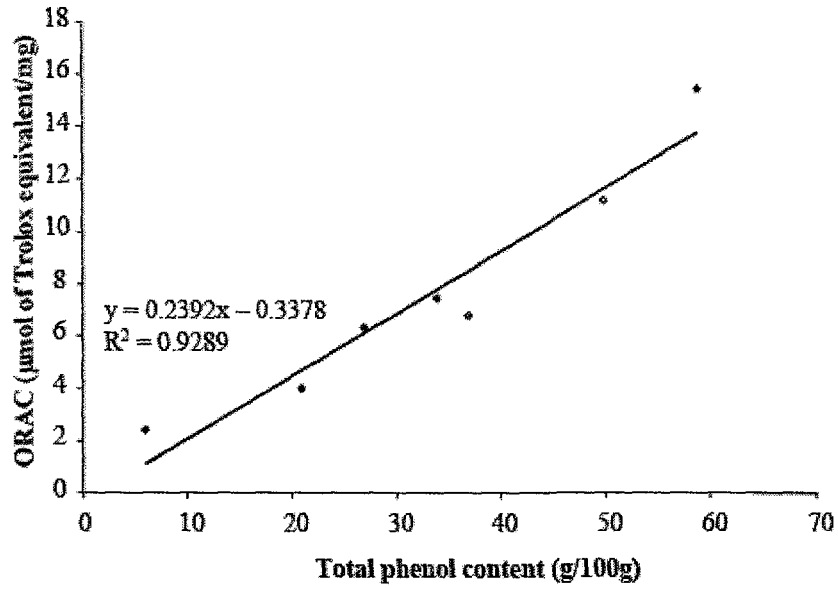


Figure 3 : Relationship between (A) ORAC values and (B) IC<sub>50</sub> values of extracts of conifer bark, and their content in phenolic compounds. Solid lines represent linear regression curves. The regression coefficient ( $R^2$ ) and the equation of curves are given.

A



B

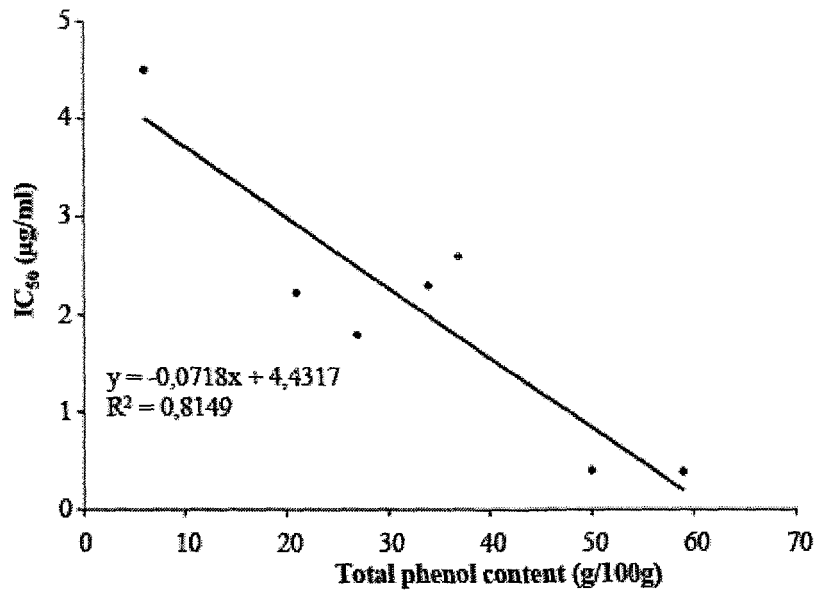


Figure 4 : Relationship between (A) ORAC values and (B) IC<sub>50</sub> values of all water extracts of conifer bark, and their content in phenolic compounds. Solid lines represent linear regression curves. The regression coefficient ( $R^2$ ) and the equation of curves are given.

In conclusion, bark of boreal forest conifers is relatively non toxic, rich in phenol and possesses a strong antioxidant activity. The best phenolic extraction yield, as well as antioxidant activities with both assays, were obtained with *Picea glauca* and *Picea mariana*. A good correlation between total phenol content and antioxidant activity is found for all water extracts of barks, suggesting that phenolic compounds are responsible for the activity. Most of the aqueous extracts of bark of conifers are richer in phenol and more active than pycnogenol, a standardized extract known for its strong antioxidant activity.

### **Acknowledgments**

We thank Catherine Dussault for technical help and suggestions. The authors would like to thank Patrick Nadeau for plant identification. This work was supported by Action Concertée FQRNT - Fonds de la recherche forestière du Saguenay - Lac-Saint-Jean.

## References

- Arts, I.C.W. and Hollman P.C.H. 2005 Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81(suppl): 317S–25S
- Bohadana A, Teculescu D, Martinet Y. 2004. Mechanisms of chronic airway obstruction in smokers. *Respir Med.* 98: 139-51.
- Carr, Lloyd G. and Carlos Westey 1945 Surviving Folktales & Herbal Lore Among the Shinnecock Indians. *Journal of American Folklore* 58:113-123
- Chandler, R. Frank, Lois Freeman and Shirley N. Hooper 1979 Herbal Remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 1:49-68
- Chapple IL. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol.* 24: 287-96.
- Devaraj S, Vega-López S, Kaul N, Schönlau F, Rohdewald P, Jialal I. 2002 Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids.* 37: 931-4.
- Gottesfeld, Leslie M. J. 1992. The Importance of Bark Products in the Aboriginal Economies of Northwestern British Columbia, Canada. *Economic Botany* 46: 148-157
- Hitchon CA, El-Gabalawy HS. 2004. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 6: 265-78.
- Lau BH, Riesen SK, Truong KP, Lau EW, Rohdewald P, Barreta RA. 2004. Pycnogenol as an adjunct in the management of childhood asthma. *J Asthma.* 41: 825-32
- Legault J., Dahl W., Debiton E., Pichette A., Madelmont J.C., 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica* 69(5), 402-407.
- MacNee W. 2005 Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2: 50-60.
- Mechling, W.H. 1959 The Malecite Indians With Notes on the Micmacs. *Anthropologica* 8:239-263
- Moerman, D.E., 2000. Native american ethnobotany. Third edition, Ed. Timber Press Inc., Portland, USA.
- Nagata M. Inflammatory cells and oxygen radicals. 2005. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4:503-4.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267, 5421-5426.

Ou, Boxin, Hampsch-Woodhill, Maureen, Prior, Ronald L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity using fluorescein as the fluorescent probe, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 4619-4626.

Packer L, Rimbach G, Virgili F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med.* 27: 704-24.

Palmer, Gary 1975 Shuswap Indian Ethnobotany. *Syesis* 8:29-51

Reagan, Albert B. 1928 Plants Used by the Bois Fort Chippewa (Ojibwa) Indians of Minnesota. *Wisconsin Archeologist* 7(4):230-248 (p. 244)

Repine JE, Bast A, Lankhorst I. 1997. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: the Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:341-357.

Rhoades ER. The major respiratory diseases of American Indians. *Am Rev Respir Dis.* 1990 141: 595-600.

Santus P, Sola A, Carlucci P, Fumagalli F, Di Gennaro A, Mondoni M, Carnini C, Centanni S, Sala A. 2005. Lipid Peroxidation and 5-Lipoxygenase Activity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 171: 838-43

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.

Tabak, C., Arts, I.C.W., Smit H.A., Heederik, D. and Kromhout, D. 2001. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Intake of Catechins, Flavonols, and Flavones *Am J Respir Crit Care Med.* 164: 61-64

Rahman, I. and Kilty, I. 2006 Antioxidant therapeutic targets in COPD. *Curr Drug Targets.* 7: 707-20.

## CHAPITRE IV

### QUANTIFICATION DU CONTENU PHÉNOLIQUE ET DU POTENTIEL ANTIOXYDANT DU CONCOMBRE DE MER NORD ATLANTIQUE (*CUCUMARIA FRONDOSA*)

*Food Chemistry*, 104 (2007), 1040-1047.

#### Résumé

Les propriétés antioxydantes d'extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction à partir de différentes parties anatomiques du concombre de mer nord-atlantique (*Cucumaria frondosa*) ont été étudiées à l'aide du test ORAC et de deux méthodes de dosage, à savoir le dosage des composés phénoliques et flavonoïdiques. Les différentes parties anatomiques (tube digestif, gonades, muscles et appareil respiratoires) ont présentées des compositions phénoliques variant entre 22,5 à 236,0 mg d'équivalent acide gallique et des compositions flavonoïdiques variant de 2,9 à 59,8 mg d'équivalent rutine avec des indices ORAC de l'ordre de 140 à 800  $\mu\text{mol}$  de Trolox par gramme d'échantillon testé, l'extrait à l'acétate d'éthyle du tube digestif étant le plus riche et le plus actif. À l'inverse de la composition phénolique qui n'affiche une corrélation significative avec le potentiel antioxydant mesuré par ORAC pour les gonades et les muscles seulement, l'indice ORAC affiche une corrélation significative avec la composition flavonoïdique de tous les extraits confondus, ce qui suggère une contribution marquée de ces derniers dans l'expression du potentiel antioxydant. L'étude a aussi permis de révéler que la méthode d'extraction à l'acétate d'éthyle pour les tubes digestif et l'extraction mixte à l'acétonitrile et acide trifluoroacétique pour les muscles, les gonades et l'appareil respiratoire ont mené aux extraits les plus antioxydants tandis que les extraits aqueux et les phases aqueuses des extractions mixtes ont abouti aux potentiels les plus faibles. Cette étude est la première à rapporter de manière quantitative le potentiel antioxydant issu des extraits de tissus du concombre de mer *Cucumaria frondosa*.



## Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*

Jean Mamelona<sup>a</sup>, Émilien Pelletier<sup>a,\*</sup>, Karl Girard-Lalancette<sup>b</sup>, Jean Legault<sup>b</sup>,  
Salwa Karboune<sup>c</sup>, Selim Kermasha<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, 319 des ursulines, Rimouski (Québec), Canada G5L 3A1

<sup>b</sup> Université du Québec à Chicoutimi, 555 de l'Université, Chicoutimi (Québec), Canada G7H 2B1

<sup>c</sup> McGill University, MacDonald Campus, 21, 111 Lakeshore, Ste. Anne de Bellevue (Québec), Canada H9X 3V9

Received 5 May 2006; received in revised form 10 November 2006; accepted 8 January 2007

### Abstract

The antioxidant activity (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) and total phenols and flavonoids were determined in extracts from digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. Total phenols content varied from 22.5 to 236.0 mg of gallic acid equivalents/100 g dw, and flavonoids from 2.9 to 59.8 mg of rutin equivalents/100 g. ORAC values ranged from 140 to 800 μmol of Trolox equivalents/g dw. Among all extracts, best antioxidant potencies were observed in ethyl acetate extracts from digestive tract, and in acetonitrile-rich fractions obtained from mixed extracts using acetonitrile/TFA (trifluoroacetic acid) acidified water on muscles, gonads and respiratory apparatus. The weakest potencies were observed with water extracts from digestive tract and respiratory apparatus, and with water-rich fractions obtained from mixed extraction of gonads and muscles. A significant correlation was observed between ORAC values and total phenol content in extracts and fractions of gonads and muscles, but ORAC and phenols were not correlated in digestive tract and respiratory apparatus extracts. ORAC values were significantly correlated ( $p < 0.05$ ) with total flavonoids in all extracts. Successive eluates obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions using C<sub>18</sub> cartridge showed ORAC values (105–500 μmol of TE/g) reaching up to 2.3 times the potency of their parent fractions. Flavonoids are suggested to be mainly responsible for observed activities. Our results provide a first quantitative evaluation of *C. frondosa* tissues as useful sources of antioxidants for human consumption.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** ORAC; Sea cucumber; Total phenols; Total flavonoids; Antioxidant; Peroxyl radicals

### 1. Introduction

Diets high in fruits and vegetables are recognized to reduce the risks of some chronic and degenerative illnesses related to the oxidation of vital biomolecules (DNA, proteins, lipids, etc.), including atherosclerosis, cancer and cardiovascular diseases, among others. Antioxidants found in food and supplements support human intrinsic antioxidative protection to maintain the internal oxidation status

by various processes such as in situ regeneration of antioxidant molecules (vitamins and enzymes) or direct neutralization of oxidative compounds (Kohen & Nyska, 2002; Lee, Koo, & Min, 2004). Emerging concerns related to the synthetic chemicals during the last decades have led to an increasing interest in the development of supplements containing mixtures of naturally-occurring antioxidants. Up to now, most available supplements are formulated with natural antioxidants derived from terrestrial plants and fish oil. Although, seaweeds and marine invertebrates (cnidarians, bryozoans, mollusks, tunicates, echinoderms) are well recognized as sources of various natural molecules most often tested against cancer cell-lines (Jha & Zi-rong,

\* Corresponding author. Tel.: +1 418 723 1986x1764.

E-mail address: emilien\_pelletier@uqar.qc.ca (É. Pelletier).

2004), very little is known about antioxidant properties of crude extracts from their tissues and organs.

As an example, sea cucumbers are well known to exert beneficial effects on human health. These echinoderms are used in Asian traditional medicine to maintain fitness during long fishing travels or to prevent, reduce or cure several ailments like constipation, renal deficiency or arthritis. Several papers published in the last two decades came in support to these medicinal purposes showing multiple biological activities of sea cucumber extracts as wound healing promoter and exhibiting antimicrobial, anticancer, and immunomodulatory properties (Aminin, 2001; Fredalina et al., 1999; Kuznetsova et al., 1982; Ridzwan, Kaswandi, Azman, & Fuad, 1995; Tian et al., 2005). Their antioxidant properties have recently been reported from coelomic fluid of three species (*Bohadschia marmorata vittensis*, *Stichopus variegatus*, *S. badionotus*) collected in Malaysian coastal waters (Hawa et al., 1999). Authors concluded that sea cucumbers might be in the future an appropriate source of antioxidants for humans. To the best of our knowledge this study remains the only one focused on antioxidative properties of sea cucumbers and data about other tissues and organs of these echinoderms are still unavailable. These benthic organisms deserve much more interest from researchers in marine natural products as their antioxidant properties and potential application to nutraceutical and medical products need to be studied.

The purpose of this work was to evaluate the antioxidant potential of Atlantic sea cucumber *C. frondosa* Gunnerus (*Cucumaridae*), a widespread species in coastal waters of the North Atlantic Ocean. Aqueous and organic solvent extracts of digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus were investigated for their antioxidative properties and their content of total phenols and flavonoids.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Gallic acid, rutin hydrate, fluorescein, Folin–Ciocalteu's phenol reagent, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-teramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were purchased from Sigma–Aldrich Ltd., (Oakville, ON, Canada). All other chemicals and solvents were of highest commercial grade.

### 2.2. Biological materials

Sea cucumbers of about 25 cm long and 400 g of fresh weight were collected by SCUBA diving in August 2004 at about 6 m depth from a rocky shore population near Baie-Comeau (north shore of St. Lawrence Estuary, Canada). Specimens were transported to nearby ISMER marine station (Rimouski, Canada) for dissection and analysis. Tissues of digestive tract, gonads, muscles, and respiratory apparatus of about 20 specimens were dissected

and pooled together in pre-cleaned glass containers. All biological samples were freeze-dried for 96 h, dried samples were ground to fine powder and kept frozen (−20 °C) until extraction.

### 2.3. Extraction procedures

Antioxidant compounds were extracted as a function of their polarity using water, organic solvent and a mixture of water/miscible organic solvent.

#### 2.3.1. Aqueous extraction

About 3.0 g of dried sample were suspended in 100 ml of freshly deionized water and the mixture continuously stirred in the dark at 4 °C to avoid accidental oxidation of light and thermal sensitive compounds. After 24 h, the supernatant was removed, centrifuged at 10 000g, filtrated on 0.45 µm glass filter, and collected in a series of pre-weighted tubes. Collected water extracts were freeze-dried until a constant weight was reached and tubes stored in a freezer until biological and chemical analyses were carried out.

#### 2.3.2. Organic extraction

About 2.0 g of dried sample were first suspended in 70 ml of deionized water with pH adjusted to 2 using 6N HCl. Extraction was carried out using successively 180 and 70 ml of ethyl acetate in separatory funnel. The recovered organic fractions (ethyl acetate extracts) were dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under vacuum, using an Automatic Environmental Speed Vac system (Instruments de Savant Inc., Holbrook, NY, USA) at 20 °C.

#### 2.3.3. Water/organic solvent extraction

The extraction technique was adapted from Haug et al. (2002). Briefly, about 5–10 g of dried sample were suspended in 10 volumes (v/w) of a mixture of acetonitrile and 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA) solution in proportion of 60:40 (v/v) and continuously stirred for 24 h in the dark at 4 °C. Supernatant was removed, centrifuged at 2000g, filtered through 0.45 µm filter and kept at 4 °C. Extraction was repeated once again and both extracts were combined thereafter. After cooling the mixture at −20 °C for 1 h a two-layer separation is obtained, the aqueous rich layer in the bottom was named the water-rich fraction and the top organic layer designated as the acetonitrile-rich fraction. These two layers were collected separately in pre-weighted tubes, evaporated under nitrogen flux and freeze-dried until a constant weight was attained.

### 2.4. Solid-phase extraction of water-rich fractions

According to Haug et al. (2002), a sequential elution of the water-rich fractions through a chromatographic column was applied to aqueous extracts in this work, using C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges (Waters). Briefly, dried extracts were



resuspended (100 mg/ml) in TFA acidified water (pH 4.7). Columns were pre-conditioned with 0.05% aqueous TFA. Samples were thereafter washed with deionized water to remove sea salt. Three successive elutions were carried out with 10%, 40% and 80% (v/v) of the mixture of acetonitrile and 0.05% aqueous TFA. Successive eluates were collected on pre-weighed tubes, evaporated under nitrogen flux and freeze-dried until a constant weight was attained.

### 2.5. Antioxidant assays

Antioxidant properties of samples were measured using (oxygen radical absorbance capacity) (ORAC) assay that measures their scavenging capacity against peroxy radicals. The procedure was adapted from the method described by Ou, Hampsch-Woodill, and Prior (2001). Briefly, the ORAC assay was carried out using 96-wells microplates and a Fluoroskan Ascent FI™ microplate reader (Labsystems, Milford, MA, USA). Trolox, a water-soluble analog of vitamin E, was used as a positive control standard. The assay was conducted at 37.5 °C and pH 7.4 with a blank sample in parallel. The spectrofluorimeter was programmed to record the fluorescence of fluorescein every minute after addition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). Final results were calculated by comparing the net areas under fluorescein decay curves between blank and samples. ORAC values were expressed in  $\mu\text{mol}$  of Trolox equivalents/mg dry weight of sample ( $\mu\text{mol TE/mg dw}$ ).

### 2.6. Total phenols

Total phenols were determined using Folin–Ciocalteu's method. Aliquots of 40–100  $\mu\text{l}$  of ethanol extracts were transferred into the test tubes and their volume adjusted to 500  $\mu\text{l}$  with deionized water. After addition of 250  $\mu\text{l}$  of Folin–Ciocalteu's reagent and 1.250 ml of 12.5% aqueous sodium carbonate solution, tubes were vortexed and held at room temperature for 40 min allowing complete reaction between reagent and phenols. Absorbance of the blue coloured solution was recorded at 750 nm (Spectra-FluorPlus<sup>®</sup>, Tecan, Durham, NC, USA) against a blank containing 40–100  $\mu\text{l}$  of ethanol. Total phenol content was calculated as a gallic acid equivalents using calibration curves prepared with gallic acid standard solutions. All measurements were carried out in triplicate.

### 2.7. Total flavonoids

Total flavonoids were determined using aluminum chelating method of Maksimovic, Malencic, and Kovacevic (2005). Aliquots of 50  $\mu\text{l}$  of ethanol extracts were transferred into the test tubes and their volume completed to 750  $\mu\text{l}$  with deionized water. After addition of 250  $\mu\text{l}$  of  $\text{AlCl}_3$  reagent, tubes were vortexed and held at room temperature for 30 min to allow the complete reaction between the reagent and flavonoids. Absorbance of the yellow col-

oured solution was recorded at 405 nm against blank containing 50  $\mu\text{l}$  of ethanol. Total flavonoids content was calculated as a rutin equivalents using calibration curves prepared with rutin hydrate standard solutions covering a concentration range between 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$ .

### 2.8. Data analysis

Data were reported as mean values calculated from replicates ( $n \geq 3$ ). Statistical treatments were performed using SigmaStat<sup>®</sup> software (Jandel Scientific) at 5% significance error level. Comparisons between groups were performed using *t*-test or 1-way ANOVA. When differences were detected we performed post hoc comparisons using the test of Student Newman Keuls (SNK). Relationship between ORAC values and total phenols and flavonoids were determined using linear regression.

## 3. Results

### 3.1. ORAC values

All samples showed antioxidative protection against peroxy radicals. ORAC values varied greatly from 140 to 800  $\mu\text{mol}$  of TE/g dw, depending upon tissues and extracts involved (Fig. 1). Digestive tract showed the best protection when considering water-rich fractions and ethyl acetate extracts. The best oxidative protection was obtained from gonads and muscles when considering acetonitrile-rich fractions and water extracts, respectively ( $p < 0.05$ ). Among all extracts and fractions, acetonitrile-rich fractions were the most efficient ones with the highest ORAC values obtained for three (gonads, muscles and respiratory apparatus) out of four tissues of *C. frondosa*.

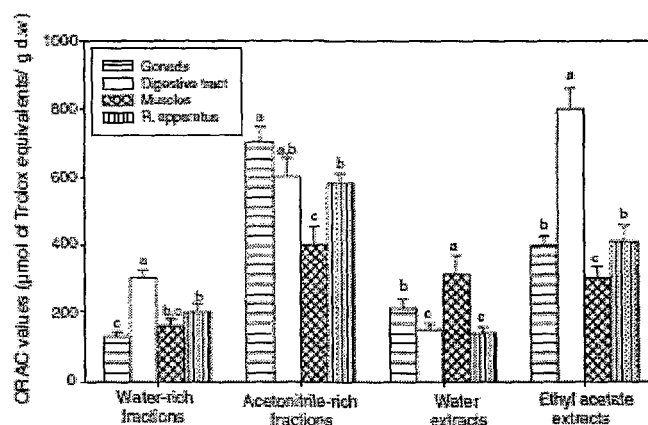


Fig. 1. ORAC values of extracts and fractions obtained from different tissues of *C. frondosa* using different solvents and extraction methods. Data are expressed as micromoles of Trolox equivalents per gram of dry extract. All assays were conducted in triplicate, and mean values are used. The vertical bars represent the standard deviation of each data point. Means within each group with different letters (a–d) differ significantly ( $p < 0.05$ ) from each others. R. apparatus stands for respiratory apparatus.

Likewise, ORAC values of acetonitrile-rich fractions of digestive tract was relatively higher ( $600 \pm 55 \mu\text{mol}$  of TE/g), but it was lower ( $p < 0.05$ ) than ethyl acetate extracts ( $800 \pm 62 \mu\text{mol}$  of TE/g) showing the highest values in this study (Fig. 1). The weakest ORAC values were obtained with water-rich fractions (gonads and muscles) and water extracts (digestive tract and respiratory apparatus). Higher ORAC values of the organic extracts over the aqueous ones were observed in both extraction types using water/organic mixture and single (water or organic) solvent. In water/organic solvent extraction, the ORAC ratio of the acetonitrile-rich/water-rich fractions ranged from 2.0 to 5.4, while in separated extractions, the ORAC ratio of extracts ethyl acetate/water varied between 1.0 and 5.3. An exception was found in muscle samples where ORAC values in ethyl acetate extracts ( $300 \pm 34 \mu\text{mol}$  of TE/g) were comparable to the one in water extracts ( $310 \pm 58 \mu\text{mol}$  of TE/g). The ORAC rank order for all four tissues was as follows: water-rich fractions  $\approx$  water extracts  $<$  ethyl acetate extracts  $<$  acetonitrile-rich fractions.

ORAC values of eluates of water-rich fractions varied from 105 to  $500 \mu\text{mol}$  of TE/g. Some eluates showed higher ORAC values than their parent fractions (Fig. 2). The ORAC ratio eluates/parent fractions varied greatly from 0.46 to 2.31 for all tissues. In muscles, all eluates showed ORAC values higher than the parent fraction ( $p < 0.05$ ). In contrast, none of the three eluates from respiratory apparatus extract showed ORAC values higher than parent fraction. In eluates from gonads and digestive tract, only eluate 2 showed ORAC values higher than parent fractions. Comparison between eluates showed that the best ORAC response was obtained with eluates 2 and 3, with the exception observed for eluate #1 of respiratory apparatus.

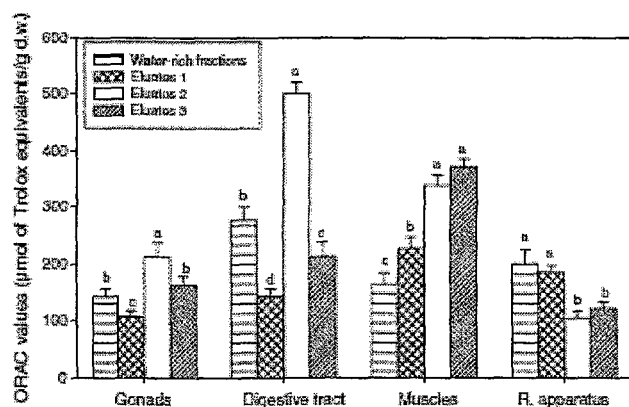


Fig. 2. ORAC values of eluates obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions using different concentration of solvents. All tests were conducted in triplicate, and mean values are used. The vertical bars represent the standard deviation of each data point. Means within each group with different letters (a–d) differ significantly ( $p < 0.05$ ) from each others. Eluates 1–3 were obtained from solvents ratios 10:90, 40:60 and 80:20 (v/v) using acetonitrile and 0.05% TFA acidified water, respectively.

### 3.2. Total phenols

Total phenols in samples varied from 22.5 to 236.0 mg of gallic acid equivalents/100 g dw, depending on tissues and extracts involved (Table 1). Digestive tract showed the highest level of total phenols when considering acetonitrile-rich fractions and ethyl acetate extracts, while the highest level was obtained from muscles and respiratory apparatus when considering water-rich fractions and water extracts, respectively ( $p < 0.05$ ). Among fractions and extracts, acetonitrile-rich fractions showed the highest level of total phenols for all four tissues. Ethyl acetate and water extracts showed an intermediate level in total phenol content, while the lowest level was generally obtained for water-rich fractions. An exception was observed for respiratory apparatus where the lowest level was obtained from water extracts ( $p < 0.05$ ). Total phenol contents of sea cucumber tissues followed order: water-rich fractions  $<$  water extracts  $\leq$  ethyl acetate extracts  $<$  acetonitrile-rich fractions.

Total phenols in eluates of water-rich fractions varied from 30.5 to 153.5 mg of GAE/100 g, depending on tissues and eluates involved (Table 2). Generally, there were more concentrated total phenols in eluates compared to their parent fractions, with the ratio eluates/parent fractions varying from 1.0 to 5.3. Comparison between eluates showed a general increase of total phenols as following: eluates 1  $<$  eluates 2  $<$  eluates 3. However, one exception was found in muscles where total phenol content was very similar between eluates 1 ( $43.7 \pm 6.6$  mg GAE/100 g) and eluates 2 ( $43.2 \pm 7.9$  mg of GAE/100 g).

### 3.3. Total flavonoids

The amount of total flavonoids in samples varied from 2.9 to 59.8 mg of rutin equivalents/100 g dw (Table 3).

Table 1

Total phenols (mg/100 g of dry weight)<sup>a</sup> in extracts and fractions obtained from digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of *C. frondosa* using separated and mixed extractions

Extracts/fractions	Gonads	D. tract <sup>b</sup>	Muscles	R. apparatus <sup>c</sup>
<i>Mixed extractions</i>				
Acetonitrile-rich fractions	130.2 $\pm$ 22.7	236.0 $\pm$ 36.3	194.1 $\pm$ 32.0	200.1 $\pm$ 33.7
Water-rich fractions	22.5 $\pm$ 4.0	30.7 $\pm$ 4.1	29.9 $\pm$ 5.5	41.2 $\pm$ 7.5
<i>Separated extractions</i>				
Ethyl acetate extracts	84.4 $\pm$ 12.9	177.6 $\pm$ 34.3	90.6 $\pm$ 13.4	75.6 $\pm$ 10.8
Water extracts	85.2 $\pm$ 14.1	67.0 $\pm$ 12.7	111.8 $\pm$ 17.2	26.1 $\pm$ 4.2

<sup>a</sup> Data expressed as gallic acid equivalent, mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

<sup>b</sup> D. tract, digestive tract.

<sup>c</sup> R. apparatus, respiratory apparatus.

Table 2

Total phenols (mg/100 g of dry weight)<sup>a</sup> in eluates obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions of digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of *C. frondosa* using different proportions of solvents

Eluates <sup>b</sup>	Gonads	D. tract <sup>c</sup>	Muscles	R. apparatus <sup>d</sup>
1	30.5 ± 4.1 (22.5)	31.3 ± 3.6 (30.7)	43.7 ± 6.6 (29.9)	51.1 ± 8.2 (41.2)
2	61.5 ± 8.9 (22.5)	49.6 ± 7.3 (30.7)	43.2 ± 7.9 (29.9)	62.7 ± 8.1 (41.2)
3	75.6 ± 10.7 (22.5)	68.2 ± 9.9 (30.7)	153.5 ± 12.3 (29.9)	95.2 ± 10.3 (41.2)

<sup>a</sup> Data expressed as gallic acid equivalent, mean ± SD ( $n = 3$ ). Total phenol contents of water-rich fraction of each tissue are given in parentheses.

<sup>b</sup> Eluates 1–3, obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions using 10:90, 40:60 and 80:20 v/v of acetonitrile and 0.05% TFA acidified water, respectively.

<sup>c</sup> D. tract, digestive tract.

<sup>d</sup> R. apparatus, respiratory apparatus.

Gonads showed the highest level of flavonoids when considering water-rich and acetonitrile-rich fractions ( $p < 0.05$ ). The highest level was obtained in digestive tract when considering water extracts and, in muscles  $\approx$  digestive tract when considering ethyl acetate extracts. Flavonoid contents in acetonitrile-rich fractions and water extracts were generally comparable, being higher than the ones in ethyl acetate extracts and water-rich fractions ( $p < 0.05$ ). However, a remarkably higher content of total flavonoids was found in acetonitrile-rich fractions (59.8 ± 6.3 mg of RE/100 g) compared to water extracts (8.1 ± 1.6 mg of RE/100 g) for gonad tissues ( $p < 0.01$ ). The over-

all rank order for total flavonoids of the four tissues is given by the order: water-rich fractions < ethyl acetate extracts < water extracts  $\approx$  acetonitrile-rich fractions.

Total flavonoids in eluates of water-rich fractions showed a high variability from 0.87 to 33.09 mg of RE/100 g (Table 4). Some eluates contained a much higher concentration of flavonoids than their parent fractions, with eluates/parent fractions ratio varying from 0.22 to 10.31. In gonads and digestive tract, eluates 2 and 3 showed total flavonoids contents higher than parent fractions ( $p < 0.05$ ). In muscles and respiratory apparatus, eluates 3 showed total flavonoids higher than parent fractions ( $p < 0.05$ ). Eluates 1 and 2 from muscles showed total flavonoids similar to and higher than parent fractions, respectively. Comparisons between eluates showed the general following pattern: eluates 1  $\approx$  eluates 2 < eluates 3.

Table 3

Total flavonoids (mg/100 g of dry weight)<sup>a</sup> in extracts and fractions obtained from digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of *C. frondosa* using separated and mixed extractions

Extracts/fractions	Gonads	D. tract <sup>b</sup>	Muscles	R. apparatus <sup>c</sup>
<i>Mixed extractions</i>				
Acetonitrile-rich fractions	59.8 ± 10.6	44.1 ± 8.2	21.8 ± 3.9	9.6 ± 1.0
Water-rich fractions	4.0 ± 0.9	2.9 ± 0.6	3.3 ± 0.6	3.2 ± 0.7
<i>Separated extractions</i>				
Ethyl acetate extracts	6.2 ± 1.0	10.0 ± 1.9	11.3 ± 2.1	4.2 ± 0.9
Water extracts	8.1 ± 1.3	44.8 ± 6.2	25.9 ± 3.8	11.7 ± 1.5

<sup>a</sup> Data expressed as rutin equivalent, mean ± SD ( $n = 3$ ).

<sup>b</sup> D. tract, digestive tract.

<sup>c</sup> R. apparatus, respiratory apparatus.

### 3.4. ORAC values vs. phenolic compounds

Correlations between ORAC values of the whole of fractions and extracts and their content in total phenols and flavonoids are given in Fig. 3. ORAC values did not significantly correlate with total phenol contents ( $r^2 = 0.13$ ,  $p = 0.17$ ,  $n = 16$ ), but total flavonoids and ORAC values showed a significant correlation ( $r^2 = 0.729$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 16$ ). When analyzing data by individual tissues and organs significant correlations existed between ORAC values and total phenols for gonads ( $r^2 = 0.79$ ,  $p = 0.047$ ) and muscles ( $r^2 = 0.92$ ,  $p = 0.042$ ), but not for digestive tract and respiratory apparatus. Total flavonoids and ORAC values showed significant correlations for all fractions of the sea

Table 4

Total flavonoids (mg/100 g of dry weight)<sup>a</sup> in eluates obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions of digestive tract, gonads, muscles and respiratory apparatus of *C. frondosa* using different proportions of solvents

Eluates <sup>b</sup>	Gonads	D. tract <sup>c</sup>	Muscles	R. apparatus <sup>d</sup>
1	0.87 ± 0.1 (3.97)	2.21 ± 0.5 (2.94)	5.09 ± 1.3 (3.32)	3.41 ± 0.7 (3.21)
2	10.54 ± 2.7 (3.97)	7.97 ± 1.8 (2.94)	3.53 ± 0.7 (3.32)	1.37 ± 0.3 (3.21)
3	12.15 ± 1.6 (3.97)	13.85 ± 2.1 (2.94)	20.91 ± 3.7 (3.32)	33.09 ± 5.7 (3.21)

Total flavonoid concentrations of water-rich extracts obtained of each tissue are given in parentheses.

<sup>a</sup> Data expressed as rutin equivalent, mean ± SD ( $n = 3$ ).

<sup>b</sup> Eluates 1–3, obtained from solid-phase extraction of water-rich fractions using ratios 10:90, 40:60 and 80:20 v/v of acetonitrile and 0.05% TFA acidified water, respectively.

<sup>c</sup> D. tract, digestive tract.

<sup>d</sup> R. apparatus, respiratory apparatus.

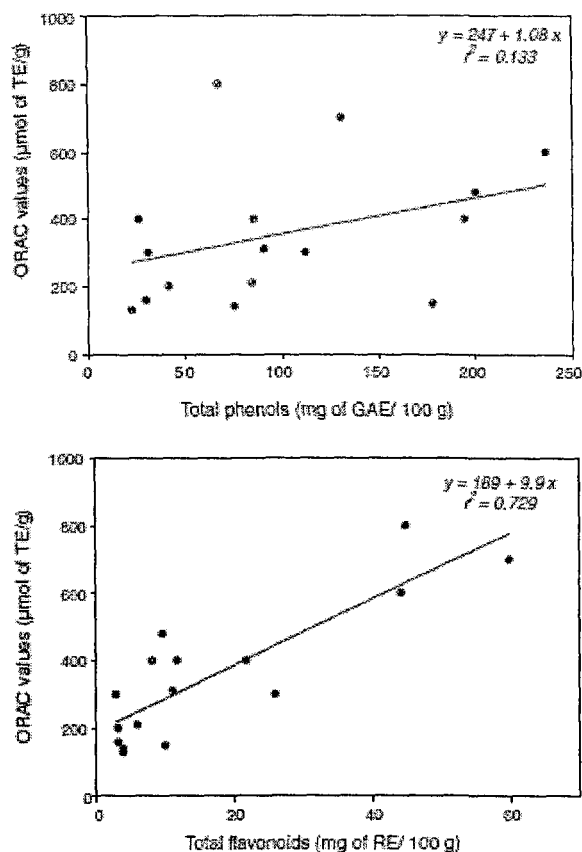


Fig. 3. Relationship between ORAC values of all extracts and fractions and their content in phenolic compounds. Top panel -total phenols, expressed as mg of gallic acid equivalents/100 g dw. Bottom panel -Total flavonoids, expressed as mg of rutin equivalent/100 g dw. Solid lines represent linear regression curves.

cucumber ( $r^2 = 0.67 - 0.85$ ,  $p < 0.05$ ;  $n = 4$  for each tissue). Finally, no significant correlation was found between ORAC values of eluates of water-rich fractions and their content in total phenols ( $r^2 = 0.03$ ;  $p > 0.05$ ;  $n = 12$ , for the four tissues) and total flavonoids ( $r^2 = 0.003$ ;  $p > 0.05$ ;  $n = 12$ ).

#### 4. Discussion

The detailed study here on *C. frondosa* tissues and organs is a first to report a quantitative evaluation of the antioxidant properties of sea cucumber extracts. This anti-peroxyl radical activity screening of sea cucumber extracts is part of our research effort to explore the potential health benefit of echinoderms of St. Lawrence Estuary. The initial objective was to obtain some extracts showing suitable ORAC values that might rival the ones previously observed from natural extracts from plants. All ORAC values observed for *C. frondosa* (140–800  $\mu\text{mol}$  of TE/g) are considered low when compared to very strong natural antioxidant fractions obtained from grape seeds (12000  $\mu\text{mol}$  of TE/g) and grape skin (15000  $\mu\text{mol}$  of TE/g) (Ou et al., 2001), or from medicinal plant leaves (16000  $\mu\text{mol}$  of TE/g) (Dominguez et al., 2005). However, most extracts and

fractions showed ORAC values comparable to or exceeding those reported in the literature for several natural fractions obtained from plant materials, including medicinal (20–200  $\mu\text{mol}$  of TE/g) and culinary herbs (20–800  $\mu\text{mol}$  of TE/g) (Zheng & Wang, 2001), dried comestible (30–125  $\mu\text{mol}$  of TE/g) and fresh fruits (20–600  $\mu\text{mol}$  of TE/g), and vegetables (30–250  $\mu\text{mol}$  of TE/g) (Wu et al., 2004).

Anti-peroxyl radical properties of natural extracts are generally attributed to redox reactions with some bioproducts present in extracts, notably phenolic compounds including flavonoids, anthocyanins or anthocyanidins (Ehlenfeldt & Prior, 2001; Prior et al., 1998). These compounds may act as rapid donors of a hydrogen atom to peroxyl radicals, before the latter react with biological molecules or, fluorescein for ORAC assays. Their presence in *C. frondosa* tissues was expected because these natural molecules are relatively easy to assimilate (Bravo, 1998; Karakaya, 2004) and main food sources of this suspensivorous benthic invertebrate are phytoplankton and particles derived from degrading marine macro-algae, rich in phenolic compounds. Total phenol and total flavonoid contents in marine algae might reach up to 20% and 12% of dry mass, respectively (Lim, Cheung, Ooi, & Ang, 2002; Van Alstyne, McCarthy, Husted, & Duggins, 1999; Yoshie-Stark, Hsieh, & Suzuki, 2003). Levels of total phenols and flavonoids from sea cucumber tissues are reported for the first time in this study. Concentrations observed in *C. frondosa* extracts are consistently lower compared to those generally observed in extracts from plants known for their high antioxidant properties. However, their range in total phenols (23–236 mg of GAE/100 g) is similar to values observed in anti-peroxyl radical plant extracts with low phenolic contents including those of some comestible fruits (59–262 mg/100 g), vegetables (24–244 mg/100 g) and nuts (68–274 mg/100 g) (Toor & Savage, 2006; Wu et al., 2004). Likewise, their content of total flavonoids (3–60 mg/100 g) approached or exceeded values observed in plants with low content of flavonoids including some fruits (10–96 mg/100 g) (Kim, Chun, Kim, Moon, & Lee, 2003; Kuti, 2004; Luximon-Ramma, Bahorun, & Crozier, 2003) and vegetables (21–94 mg/100 g) (Luximon-Ramma et al., 2003).

A good correlation existed between the ORAC values and total phenols in gonads and muscles, but an apparent lower contribution of total phenols in digestive tract and respiratory apparatus. This apparent discrepancy might be the result of a significant difference in phenolic constituents between tissues. Previous studies reported that contribution of individual phenols to anti-peroxyl radicals varies among chemical species and depends upon their concentration (Zheng & Wang, 2003). When examining the relationship between total flavonoids and ORAC values we observed a highly significant correlation of this subgroup of phenols with anti-peroxyl radical activities. This result shows that sea cucumber extracts present some similarities in their anti-peroxyl radical activities with plant materials showing a probable high contribution of flavo-

noids to the redox reactions. This correlation also suggests that among phenolic constituents present in *C. frondosa* tissues, flavonoids contributed a major part to anti-peroxyl radical activities observed in digestive tract and respiratory apparatus extracts. As well, they seem to contribute extensively to the redox activity in extracts and fractions from gonads and muscles, but a significant contribution from other phenols is also expected because flavonoids measured in *C. frondosa* extracts represented in average less than 20% of total phenols. The presence of easy assimilated antioxidant phenols like anthocyanins, anthocyanidins, tannins and others in the food sources of *C. frondosa* suggests their potential occurrence within its tissues.

Solid-phase extraction (SPE) technique was used in an attempt to increase the antioxidative potency of water-rich fractions that generally showed low ORAC values. This technique is useful to discard some water-soluble and non-antioxidative constituents that might exert a dilution effect lowering weight based ORAC values. However, some anti-peroxyl radical constituents could be lost in washing solvent or retained within SPE column during elution steps (Kähkönen, Hopia, & Heinonen, 2001; Zheng & Wang, 2003). In most of our eluates, the relative concentration of total phenols increased compared to their parent fractions. This result suggests a significant removal of some water-soluble constituents like salt, sugars, ascorbic acid, glutathione, peptides, and other water-soluble compounds during SPE process that have little antioxidant activities. Yellow to reddish color of the washing eluates observed during SPE process suggests the removal of some water-soluble pigments. There was probably a loss of flavonoid constituents in washing eluates since total flavonoids in some eluates remained stable or decreased after SPE treatment (Tables 1 and 2). Finally, results obtained from correlation analysis suggest a relative increase of the presence of some other water-soluble anti-peroxyl radical constituents following SPE. In fact, neither total phenols, nor total flavonoids present in these eluates seem to contribute significantly to the response of ORAC assays. In light of these results, improving ORAC values by using SPE is possible, but further studies are needed to learn more about the changes in anti-peroxyl radical constituents during successive elution steps.

Our results come in support to the antioxidant potential previously observed in coelomic fluid of three sea cucumber species collected from coastal waters of Terengganu, Malaysia (Hawa et al., 1999). Coelomic fluid in echinoderms shows a chemical composition close to seawater surrounding the animal and contents amoebocytes devoted to the immune defense system of the animal. Authors observed an important activity of enzymatic antioxidants (superoxide dismutase =  $5\text{--}9 \times 10^5$  IU/g protein) and low to moderate scavenging activity of DPPH (9–52%). This antioxidative potential of sea cucumber coelomic fluid comes in support to its believed health benefit by Asian people and suggests its usefulness in preventing oxidation of vital biomolecules. As observed from our study, the edi-

ble part of *C. frondosa* (muscles, mainly exported to Asian market) could also provide to consumers an appropriate anti-peroxyl radical protection. By-products including gonads, digestive tract and respiratory apparatus showed suitable anti-peroxyl radical activities suggesting the moderate antioxidant potential of *C. frondosa* and a possible valorization of its tissues as an additional source of antioxidants for human diet.

## 5. Conclusions

Results from this study show that tissues of *C. frondosa* contain natural bioproducts able to prevent oxidative reactions, notably the ones initiated by peroxyl radicals. Active extracts examined here might exhibit beneficial effects in prevention of polyunsaturated fatty acids oxidation and the alteration of biological membranes often linked with numerous severe diseases. Among the anti-peroxyl radical bioproducts, flavonoids are suggested to be mainly responsible of observed activities, but a significant contribution of other phenolic compounds is expected. Further, research is needed to identify and characterize chemicals contributing to antioxidant properties of the extracts.

## Acknowledgements

This study has been supported by the Canadian Research funds FQRNT-Actions concertées and Quebec government partners. Authors thank Oursins Nordiques Inc. of Baie-Comeau (Québec, Canada) for providing sea cucumbers. This paper is a contribution of Quebec-Ocean network.

## References

- Aminin, D. L. (2001). Immunomodulatory properties of Cucumariosides from edible far-eastern holothurian *Cucumaria japonica*. *Journal of Medicinal Food*, 4, 127–135.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.
- Dominguez, M., Nieto, A., Marin, J. C., Keck, A. G., Jeffrey, E., & Céspedes, C. L. (2005). Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5889–5895.
- Ehlenfeldt, M. K., & Prior, R. L. (2001). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2222–2227.
- Fredalina, B. D., Ridzwan, B. H., Zainal Abidin, A. A. Z., Kaswandi, M. A., Zaiton, H., Zali, I., et al. (1999). Fatty acid compositions in local sea cucumber, *Stichopus chloronotus*, for wound healing. *General Pharmacology*, 33, 337–340.
- Haug, T., Kjuul, A. K., Styrvold, O. B., Sandsdalen, E., Olsen, O. M., & Stensvåg, K. (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81, 94–102.
- Hawa, I., Zulaikah, M., Jamaludin, M., Zainal Abidin, A. A., Kaswandi, M. A., & Ridzwan, B. H. (1999). The potential of the coelomic fluid of sea cucumber as an antioxidant. *Malaysian Journal of Nutrition*, 5, 55–59.

- Jha, R. K., & Zi-rong, X. (2004). Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drugs*, 2, 123–146.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076–4082.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 453–464.
- Kim, D.-O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H.-Y., & Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 6509–6515.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 620–650.
- Kuti, J. O. (2004). Antioxidant compounds from four *Opuntia cactus* pear fruit varieties. *Food Chemistry*, 85, 527–533.
- Kuznetsova, T. A., Anisimov, M. M., Popov, A. M., Baranova, S. I., Afiyatullo, S. S., Kapustina, I. I., et al. (1982). A comparative study in vitro of physiological activity of triterpene glycosides of marine invertebrates of echinoderm type. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 73, 41–43.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety*, 3, 21–33.
- Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., & Ang, P. O. (2002). Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3862–3866.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., & Crozier, A. (2003). Antioxidant activities and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 496–502.
- Maksimovic, Z., Malencic, D., & Kovacevic, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Mayadis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96, 873–877.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619–4626.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., et al. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686–2693.
- Ridzwan, B. H., Kaswandi, M. A., Azman, Y., & Fuad, M. (1995). Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. *General Pharmacology*, 26, 1539–1543.
- Tian, F., Zhang, X., Tong, Y., Yi, Y., Zhang, S., Li, L., et al. (2005). A new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities in vivo and in vitro. *Cancer Biology and Therapy*, 4, 874–882.
- Toor, R. K., & Savage, G. P. (2006). Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chemistry*, 94, 90–97.
- Van Alstyne, K. L., McCarthy, J. J., III, Husted, C. L., & Duggins, D. O. (1999). Geographic variation in polyphenolic levels of Northeastern Pacific kelps and rockweeds. *Marine Biology*, 133, 371–379.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026–4037.
- Yoshie-Stark, Y., Hsieh, Y.-P., & Suzuki, T. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 69, 1–6.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165–5170.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenols in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 502–509.

## CONCLUSION

Avec la popularité croissante des thérapies alternatives et de la nutraceutique, les antioxydants attirent aujourd'hui l'attention de la population en général, mais aussi de la communauté scientifique. En effet, on observe actuellement une explosion du nombre de publications dans ce secteur d'activité. De plus en plus, les relations entre les phénomènes d'oxydo-réduction et une multitude de pathologies (ex. : cancer et maladies inflammatoires) sont mises en évidence et suggèrent la possibilité d'intervenir par l'usage de molécules antioxydantes de nature alimentaire ou purifiées sous forme de médicaments. Dans ce contexte, il importe plus que jamais de disposer de méthodes fiables et standardisées pour valider le potentiel antioxydant des molécules issues de sources naturelles.

Bien qu'il n'existe actuellement aucune méthodologie adoptée consensuellement par toute la communauté scientifique pour mettre en évidence le potentiel antioxydant des nouvelles molécules découvertes, certaines méthodes sont privilégiées parmi d'autres, comme par exemple le test ORAC. Chaque méthode constitue une approche plus ou moins spécifique pour caractériser le potentiel des composés testés et il semble improbable qu'une méthode puisse un jour englober tous les aspects impliqués dans la protection contre le stress oxydatif, d'autant plus que la plupart des méthodes rapportées ne tiennent pas compte du contexte cellulaire. En ce sens, la méthode originale ici proposée se positionne bien parmi les autres par son plus large spectre de sensibilité permettant à la fois de déceler des potentiels de chélation aussi bien que des potentiels de *scavengers* en plus de permettre un aperçu de la toxicité potentielle des molécules testées.

Cette méthode originale s'est montrée adéquate pour mettre en évidence et comparer le potentiel antioxydant d'extraits alimentaires et de composés purs en plus de permettre la mise en évidence du potentiel pro-oxydant de certains. Ce dernier point est d'un intérêt particulier du fait que le test ORAC, un des tests les plus largement utilisés, en est incapable. De plus, cette même méthode originale s'est avérée adéquate pour étudier l'impact de la méthode d'extraction sur le potentiel antioxydant résultant de celle-ci. En effet,

différentes conditions d'extraction utilisées sur différentes espèces de conifères affichent des patrons d'activité antioxydante différents d'une espèce à l'autre. Ainsi, le premier objectif a été atteint avec la mise au point et la validation d'une méthode de test *ex vivo* du potentiel antioxydant (Chapitre 2).

Pour ce qui concerne l'évaluation du potentiel antioxydant de conifères de la forêt boréale (Chapitre 3), l'objectif a aussi été atteint. Le potentiel antioxydant des écorces de toutes les espèces étudiées (pins gris, blanc et rouge, épinette noire et blanche, sapin baumier et mélèze laricin) s'est avéré aussi prometteur que ceux rapportés dans la littérature pour d'autres espèces issues des mêmes genres. De plus, notre méthode n'a révélé aucune toxicité considérable. Chaque espèce a offert des rendements élevés d'extraction de composés phénoliques et présente des potentiels antioxydants prometteurs lorsque comparés à ceux obtenus de substrats alimentaires.

Parmi les espèces de conifères étudiées, seul le sapin baumier a déjà été rapporté comme étant antioxydant. Par contre, le substrat d'extraction rapporté dans la littérature pour cette espèce était le bois de nœud. Ainsi, les résultats présentés au chapitre 3 constituent à notre connaissance la première étude du potentiel antioxydant des écorces des espèces précitées.

Le troisième objectif de ce projet de maîtrise consistait à évaluer le potentiel antioxydant de diverses sources animales. Le chapitre 4 rapporte les résultats issus de l'analyse du concombre de mer (*Cucumaria frondosa*) récoltés à Baie-Comeau dans l'estuaire du Saint-Laurent. Les résultats obtenus supportent ceux publiés dans la littérature pour d'autres espèces de concombre de mer de Malaisie dont l'activité antioxydante a été étudiée (Hawa et al. 1999). C'est-à-dire que les potentiels antioxydants observés se situent entre ceux mesurés avec les écorces de conifères, dont les extraits sont très antioxydants, et ceux rapportés dans la littérature pour diverses sources alimentaires dont le potentiel est plus modeste.

L'étude du concombre de mer permet de suggérer que les composés flavonoïdiques sont principalement responsables de l'activité antioxydante mesurée. En effet, la composition flavonoïdique de tous les extraits affiche une corrélation significative avec les indices ORAC obtenus. L'étude a aussi révélé que les potentiels antioxydants les plus élevées sont obtenus avec les tubes digestifs extraits à l'acétate d'éthyle, ainsi qu'avec les extraits de gonades, muscles et appareils respiratoires issus d'une extraction mixte à l'acétonitrile et à l'acide trifluoroacétique.



### Avancement du projet et perspectives

Il fut évoqué plus haut que la mise au point d'une méthode qui soit capable de rendre une évaluation globale de tous les aspects impliqués dans le processus d'une protection contre le stress oxydatif demeure improbable. Aussi, bien que notre méthode cellulaire soit à large spectre de sensibilité, elle demeure insuffisante pour la caractérisation complète des potentiels antioxydants qu'elle est en mesure de révéler. Ainsi, il importe dans un futur plus ou moins rapproché de compléter cette méthode avec d'autres tests (*in vitro* ou *ex vivo*) spécifiques à chacun des aspects impliqués dans la protection antioxydante. Il est vrai par exemple que cette méthode originale peut détecter des chélateurs de métaux, mais elle demeure incapable de distinguer ce mode d'action parmi les autres possibles lorsqu'elle révèle un potentiel antioxydant. Comme la méthode se prête davantage à la mise en évidence des potentiels sans les caractériser ou les définir, il faudra ultimement la compléter par l'usage d'autres méthodes telles que *FRAP* ou d'autres tests de biologie moléculaire orientés sur les défenses antioxydantes de nature protéique.

Le chapitre 3 rapporte des potentiels antioxydants non négligeables pour les écorces de plusieurs conifères de la forêt boréale. Ces potentiels antioxydants se démarquent de tous les autres mis en évidence dans le présent document pour des substrats alimentaires ou d'origines animales. Le fait est que plusieurs de ces espèces de conifères sont déjà l'objet d'exploitation par l'industrie forestière laissant de côté les écorces, entre autres, comme des déchets. Ainsi, le substrat d'extraction est déjà disponible en quantités importantes et pourrait à son tour être l'objet de valorisation.

Outre les conifères, plusieurs espèces végétales ont été étudiées pour leurs propriétés antioxydantes dans le cadre de ce projet de maîtrise. Plusieurs extractions de plusieurs composantes anatomiques de diverses espèces ont été testées et présentent elles aussi des potentiels antioxydants prometteurs. On note entre autres la verge d'or du Canada (*Solidago Canadensis*) qui a offert des potentiels impressionnants lorsque testée par la méthode ORAC et notre méthode sur culture cellulaire. De plus, cette même espèce affiche un potentiel anti-inflammatoire *ex vivo* sur les macrophages murins en diminuant leur production d'oxydes nitriques.

Le chapitre 4 présentait les résultats issus de l'étude du concombre de mer. Comme l'objectif de départ était d'évaluer le potentiel antioxydant de plusieurs espèces d'échinodermes, d'autres travaux ont aussi été réalisés sur l'oursin vert (*Strongilocentrotus droebachensis*) et ont révélé des potentiels antioxydants du

même ordre de grandeur que ceux issus du concombre de mer. L'oursin vert est considéré dans certains contextes comme une nuisance, mais leurs gonades sont déjà consommées. Ainsi, la mise en évidence de propriétés antioxydantes dans les tissus de l'oursin vert pourrait ultimement déboucher vers une exploitation plus marquée de cette espèce puisqu'elle est au départ considérée comme une nuisance.

## RÉFÉRENCES

- ALLEN, Reeshemah, SHUKLA, N., LESZCZYNSKI, M. K., Jerzy, **A Theoretical Study of the Structure and Properties of Uric Acid: A Potent Antioxidant**, *International Journal of Quantum Chemistry*, Vol. 100, pp. 801-809, 2004.
- ALLEN, R. G., TRESINI, Maria, **Oxidative Stress and Gene Regulation**, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 28, No 3, pp. 463-499, 2000.
- ANDREYEV, A.Yu., KUSHNAREVA, Yu. E., STARKOV, A.A., **Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species**, *Biogemistry (Moscow)*, Vol. 70, No 2, pp. 200-214, 2005.
- ARREDONDO Miguel, NÚÑEZ Marco T, **Iron and copper metabolism**, *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 26, pp. 314–328, 2005.
- ARRIGO, André-Patrick, **Gene expression and the thiol redox state**, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 27, Nos. 9/10, pp. 936-944, 1999.
- AROSIO, Paolo, LEVI, Sonia, **Ferritin, Iron Homeostasis, and Oxidative Damage**, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 33, No 4, pp. 457-463, 2002.
- BAST, Aalt, HAENEN, Guido R.M.M., **The Toxicity of Antioxidants and their Metabolites**, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 11, pp. 251-258, 2002.
- BENZIE, Iris F. F., STRAIN, J. J., **The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay**, *Analytical Biochemistry*, Vol. 239, pp. 70-76, 1996.
- BERDEAUX, O., SCRUEL, O., DURAND, T., CRACOWSKI, J.-L., **Les isoprostanes, biomarqueurs de peroxydation lipidique chez l’homme. Partie II : Méthodes de quantification**, *Pathologie Biologie*, Vol. XXX, pp. XXX-XXX, 2004.
- BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M., **Chemistry, Physiology and Pathology of Free Radicals**, *Life Sciences*, Vol. 65, pp. 1965-1874, 1999.
- BEYER, Chad E., STEKETEE, Jeffery D., SAPHIER, David, **Antioxidant properties of melatonin – An emerging mystery**, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 56, pp. 1265-1272, 1998.
- BURKE-GAFFNEY, Anne, CALLISTER, Matthew E.J., NAKAMURA, Hajime, **Thioredoxin: friend or foe in human disease**, *Trends in Pharmacological Science*, Vol. 26, No. 8, 2005.
- CALABRESE, Vittorio, BATES, Timothy Edward, GIUFFRIDA STELLA, Anna Maria, **NO Synthase and NO-dependant signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: The role of oxidant/antioxidant balance**, *Neurochemical Research*, Vol. 25, Nos. 9/10, pp. 1315-1341, 2000.
- CHAMORRO, Angel, PLANAS, Anna M., MUNER, Dolors Soy, DEULOFEU, Ramon, **Uric acid administration for neuroprotection in patients with acute brain ischemia**, *Medical Hypothesis*, Vol. 62, pp. 173-176, 2004.
- CRACOWSKI, J.-L., BERDEAUX, O., DURAND, T., **Les isoprostanes, biomarqueurs de peroxydation lipidique chez l’homme. Partie III : Biomarqueurs et médiateurs en physiologie et pathologie vasculaire**, *Pathologie Biologie*, Vol. XXX, pp. XXX-XXX, 2004.
- CRICHTON, Robert R., WILMET, Stéphanie, LEGSSYER, Rachida, WARD, Roberta J., **Molecular and Cellular Mechanisms of Iron Homeostasis and Toxicity in Mammalian Cells**, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 91, pp. 9-18, 2002.
- DARLEY-USMAR, Victor, WISEMAN, Helen, HALLIWELL, Barry, **Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance**, *FEBS Letters*, Vol. 369, pp. 131-135, 1995.

- DIAZ, Giacomo, LIU, Shusen, ISOLA, Raffaella, DIANA, Andrea, FALCHI, Angela Maria, **Mitochondrial localization of reactive oxygen species by dihydrofluorescein probes**, *Histochemical Cell Biology*, Vol. 120, pp. 319-325, 2003.
- DUNFORD, H. Brian, **Oxidations of iron(II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme**, *Coordination Chemistry Reviews*, Vol. 233-234, pp. 311-318, 2002.
- DURAND, T., CRACOWSKI, J.-L., BERDEAUX, O., **Les isoprostanes, biomarqueurs de peroxydation lipidique chez l'homme. Partie I. Nomenclature et synthèse**, *Pathologie Biologie*, Vol. XXX, pp. XXX-XXX, 2004.
- EDWARDS, Katie A., BAEUMNER, Antje J., **Liposomes in analyses**, *Talanta*, Vol. 68, pp. 1421-1431, 2006.
- EL-AGAMEY, Ali, LOWE, Gordon M., MCGARVEY, David J., MORTENSEN, Alan, PHILLIP, Denise M., TRUSCOTT, T. George, YOUNG, Andrew J., **Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 430, pp. 37-48, 2004.
- ELAHI, Maqsood M., NASEEM, Khalid M., MATATA, Bashir M., **Nitric oxide in blood: The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease**, *FEBS Journal*, Vol. 274, pp. 906-923, 2007.
- ESTANY, S., PALACIO, J.R., BARNADAS, R., SABES, M., IBORRA, A., MARTINEZ, P., **Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol on endometrial cells in culture**, *Journal of Reproductive Immunology*, Article in press, 2007. doi: 10.1016/j.jri.2007.01.007
- FRANKEL, Edwin N., MEYER, Anne S., **The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants**, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, pp. 1925-1941, 2000.
- FUJINO, Go, NOGUCHI, Takuya, TAKEDA, Kohsuke, ICHIJO, Hidenori, **Thioredoxin and protein kinases in redox signalling**, *Seminars in Cancer Biology*, Vol. 16, pp. 427-435, 2006.
- GAETKE Lisa M, CHOW Ching Kuang, **Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients**, *Toxicology*, Vol. 189, pp. 147-163, 2003.
- GILGUN-SHERKI, Yossi, MELAMED, Eldad, OFFEN, Daniel, **The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy**, *Journal of Neurology*, Vol. 251, pp. 261-268, 2004.
- GROMER, Stephan, URIG, Sabine, BECKER, Katja, **The thioredoxin system – From science to clinic**, *Medical Research Reviews*, Vol. 24, No 1, pp. 40-89, 2004.
- GROVES, John T., **Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic**, *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 3, pp. 226-235, 1999.
- GÜLCİN, İlhami, BÜYÜKOKUROĞLU, M. Emin, OKTAY, Münir, KÜFREVIÖĞLU, Ö. İrfan, **Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *Palsiana* (Lamb.) Holmboe**, *Journal of Ethno-Pharmacology*, Vol. 86, pp. 51-58, 2003.
- GUTIÉRREZ, M. Elena, GARCIA, Antonio F., AFRICA DE MADARIAGA, M., SAGRISTA, M. Luisa, CASADÓ, Francisco J., MORA, Margarita, **Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system**, *Life Sciences*, Vol. 72, pp. 2337-2360, 2003.
- HAUG, Tor, KJUUL, Anita K., STYRVOLD, Olaf B., SANDSDALEN, Erling, OLSEN, Orjan, STENSVAG, Klara, **Antibacterial Activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asteria rubens* (Asteroidea)**, *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 81, pp. 94-102, 2002.
- HUANG, Dejian, OU, Boxin, PRIOR, Ronald L., **The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, pp. 1841-1856, 2005.
- JENTZSCH, Axel M., BACHMANN, Heini, FÜRST, Peter, BIESALSKI, Hans K., **Improved Analysis of Malondialdehyde in Human Body Fluids**, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 20, No 2, pp. 251-256, 1996.
- JOSHI, Mahesh, PONTHER, Julie L., LANCASTER, Jack R., **Cellular Antioxidant and Pro-Oxidant Actions of Nitric Oxide**, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 27, No 11/12, pp. 1357-1366, 1999.
- KAMENCIC, Huse, LYON, Andrew, PATERSON, Phyllis G., and JUURLINK, Bernhard H. J., **Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione**, *Analytical Biochemistry*, Vol. 286, pp. 35-37, 2000.
- KEHRER, James P., **The Haber-Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity**, *Toxicology*, Vol. 149, pp. 43-50, 2000.
- LANDER, Harry M., **An essential role for free radicals and derived species in signal transduction**, *FASEB J.*, Vol. 11, pp. 118-124, 1997.

- LIMA, Cristovao F., FERNANDES-FERREIRA, Manuel, PEREIRA-WILSON, Cristina, **Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels**, *Life Sciences*, Vol. 79, pp. 2056-2068, 2006.
- LIU, Rui Hai, FINLEY, John, **Potential cell culture models for antioxidant research**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 4311-4314, 2005.
- MARGAILL, Isabelle, PLOTKINE, Michel, LEROUET, Dominique, **Antioxidant strategies in the treatment of stroke**, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 39, pp. 429-443, 2005.
- MATSUNO, Takao, TSUSHIMA, Miyuki, **Comparative Biochemical Studies of Carotenoids in Sea Cucumber**, *Comparative Biochemical Physiology*, Vol. 111B, No 4, pp. 597-605, 1995.
- NEYENS, E., BAEYENS, J., **A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique**, *Journal of Hazardous Material*, Vol. B98, pp. 33-50, 2003.
- NOHL, Hans, GILLE, Lars, STANIEK, Katrin, **Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria**, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 69, pp. 719-723, 2005.
- NORDBERG, Jonas, ARNER, Elias S. J., **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system**, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 31, No 11, pp. 1287-1312, 2001.
- OU, Boxin, HAMPSCH-WOODILL, Maureen, PRIOR, Ronald L., **Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, pp. 4619-4626, 2001.
- PACKER, Lester, WITT, Eric H., TRITSCHLER, Hans Jürgen, **Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant (Review)**, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 19, No 2, pp. 227-250, 1995.
- PACKER, L., RIMBACH, G., VIRGILI, F., **Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritime*) bark, pycnogenol**, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 27, Nos 5/6, pp. 704-724, 1999.
- PATEL, Rakesh P., MCANDREW, Joanne, SELLAH, Hassan, WHITE, C. Roger, JO, Hanjoong, FREEMAN, Bruce A., DARLEY-USMAR, Victor M., **Biological aspects of reactive nitrogen species**, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1411, pp. 385-400, 1999.
- PELUSO, Michael R., **Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver**, *Experimental Biological Medicine*, Vol. 231, pp. 1287-1299, 2006.
- PINCEMAIL, Joël, BONJEAN, Karine, CAYEUX, Karine, DEFRAIGNE, Jean-Olivier, **Mécanismes physiologique de la défense antioxydante**, *Nutrition clinique et métabolisme*, Vol. 16, pp. 233-239, 2002.
- PINELO, M., RUBILAR, M., SINEIRO, J., NÚÑEZ, M.J., **Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*)**, *Food Chemistry*, Vol. 85, pp. 267-273, 2004.
- PRISTOS, Chris A., **Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system**, *chemico-Biological Interactions*, Vol. 129, pp. 195-208, 2000.
- PRODANOV, M.P., DOMINGUEZ, J.A., BLAZQUEZ, I., SALINAS, M.R., ALONSO, G.L., **Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts**, *Food Chemistry*, Vol. 90, No 4, pp. 585-596, 2005.
- RACKOVA, Lucia, FIRAKOVA, Silvia, KOSTALOVA, Daniela, STEFEK, Milan, STURDIKD, Ernest, and MAJEKOVA, Magdalena, **Oxidation of liposomal membrane suppressed by flavonoids: Quantitative structure-activity relationship**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 13, pp. 6477-6484, 2005.
- REITER, Russel J., **Melatonin: clinical relevance**, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 17, no. 2, pp. 273-285, 2003.
- ROGINSKY, Vitaly, LISSI, Eduardo A., **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food**, *Food Chemistry*, Vol. 92, pp. 235-254, 2005.
- SINGLETON, V.L., ROSSI Joseph A., **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent**, *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 16, pp. 144-158, 1965.
- TORREILLES, François, SLAMAN-TABCHEH, Saïda, GUÉRIN, Marie-Christine, TOREILLES, Jean, **Neurodegenerative Disorders : the Role of Peroxynitrite**, *Brain Research Reviews*, Vol. 30, pp. 153-163, 1999.
- TUCKER, J.M., TOWNSEND, D.M., **Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease**, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 59, pp. 380-387, 2005.

- VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**, *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 160, pp. 1-40, 2006.
- VALKO, Marian, LEIBFRITZ, Dieter, MONCOL, Jan, CRONIN, Mark T.D., MAZUR, Milan, TELSER, Joshua, **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 39, pp. 44-84, 2007.
- WILLFÖR, Stefan M., AHOTUPA, Markku O., HEMMING, Jarl E., REUNANEN, Markku H., EKLUND, Patrik C., SJÖHLM, Rainer E., ECKERMEN, Christer S., POHJAMO, Suvi P., HOLMBOM, Bjarne R., **Antioxidant Activity of Knotwood Extractives and Phenolic Compounds of Selected Tree Species**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, pp. 7600-7606, 2003.
- WILLIAMSON, Gary, MANACH, Claudine, **Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies**, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 81S, pp. 243S-255S, 2005.
- WOLF, Ronni, WOLF, Danny, RUOCCO, Vincenzo, **Vitamin E: the radical protector**, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Vol. 10, pp. 103-117, 1998.
- WORLD, Cameron J., YAMAWAKI, Hideyuki, BERK, Bradford C., **Thioredoxin in the cardiovascular system**, *Journal of Molecular Medicine*, Vol. 84, pp. 997-1003, 2006.
- YEO, Helen C., HELBOCK, Harold J., CHYU, Daniel W., AMES, Bruce N., **Assay of Malondialdehyde in Biological Fluids by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy**, *Analytical Biochemistry*, Vol. 220, pp. 391-396, 1994.
- ZÁMOCKY, Marcel, KOLLER, Franz, **Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis**, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, Vol 72, pp. 19-66, 1999.

