INSTITUT DE CHIMIE
UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

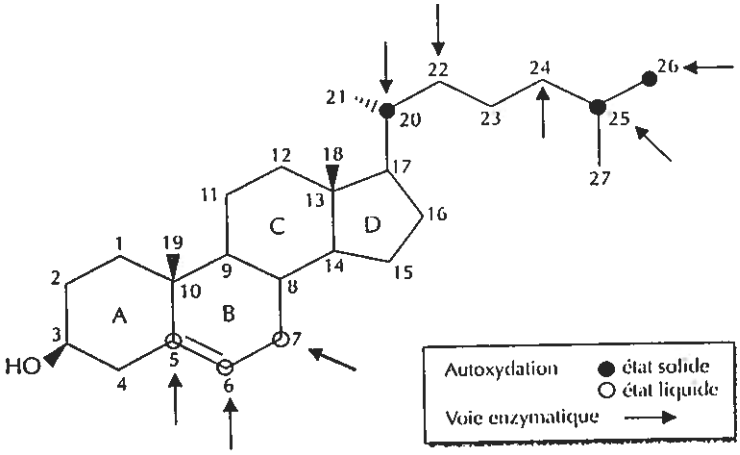
INFORMATION - FAM

Août 1996 / 322 W

Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld
CH-3003 Berne

Mécanismes d'oxydation du cholestérol

C. Rose-Sallin [1,2], R. Sieber [1],
J.O. Bosset [1], R. Tabacchi [2]



[1] Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld
CH-3003 Berne

[2] Université de Neuchâtel
CH-2000 Neuchâtel

OCL Oléagineux Corps gras lipides **3**, 227-235 (1996)

Mécanismes d'oxydation du cholestérol

Christine ROSE-SALLIN [1,2],
Robert SIEBER [1], Jacques O. BOSSET[1]*,
Raffaele TABACCHI [2]

[1] *Station fédérale de recherches laitières, 3097 Liebefeld-Berne, Suisse*
[2] *Institut de chimie, Université de Neuchâtel, 2000 Neuchâtel, Suisse*

* *Auteur auquel adresser toute correspondance*

Résumé : *Le présent travail passe en revue les mécanismes d'oxydation du cholestérol. Il traite plus spécialement du mécanisme radicalaire de l'autoxydation de ce composé et, dans une moindre mesure, des mécanismes enzymatiques. Le cholestérol, lipide insaturé, s'oxyde de la même manière qu'un acide gras insaturé. Il se forme d'abord des hydroperoxydes qui se dégradent en époxydes, en alcools primaires, secondaires ou tertiaires et en cétones. L'oxydation du cycle B du stéroïde est prédominante, favorisant l'attaque en position allylique ainsi que l'époxydation. Les principaux oxystérols formés sont le 7α- et le 7β-hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol, le cholesta-3,5-diène-7-one, le 3β,5α,6β- cholestanetriol, le 5α,6α- et le 5β,6β-époxycholestérol. L'oxydation de la chaîne aliphatique en positions 20, 22, 24, 25 et 26 a également été observée. Les espèces d'oxygène actif réagissant avec le cholestérol y sont discutées ainsi que l'influence des lipides et plus spécialement celle de leur degré d'insaturation sur la cinétique d'oxydation.*

Mots clés : *cholestérol, oxydation, mécanisme, oxystérol, lipide.*

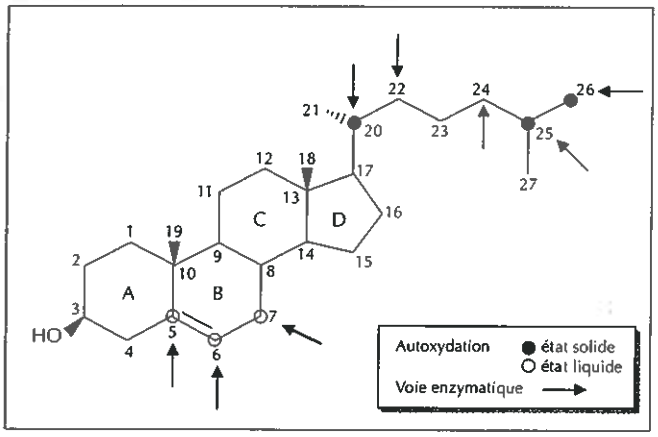
Summary: *The mechanisms of cholesterol oxidation, including the major radical process of autoxidation and enzymatic mechanism are reviewed. Cholesterol, an unsaturated lipid, is oxidized in the same way as an unsatured fatty acid: through the intermediate hydroperoxides, primary, secondary and tertiary alcohols, ketones and epoxides are produced. Oxidation of cholesterol at the allylic C7 site and epoxidation of the double bond are favoured. Principal cholesterol oxides are 7α- and 7β-hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, cholesta-3,5-diene-7-one, 3β,5α,6β-cholestanetriol and 5α,6α- and 5β,6β-epoxicholesterol. Oxidation of the side chain at the C 20, 22, 24, 25 and 26 sites is also observed. The reactive oxygen species involved in the oxidation of cholesterol and the influence of other lipids on the kinetics of cholesterol oxide formation are presented.*

Key-words: *cholesterol, oxidation, mechanism, oxysterol, lipid.*

Introduction

En 1816, Chevreul [1] appela « cholestérine » (issu des mots grecs « chole » et « steros » qui signifient « bile » et « solide ») la substance extraite de calculs biliaires humains. Mais ce n'est qu'environ un siècle plus tard que la labilité du cholestérol fut mise en évidence. Schultze et Winterstein [2] ont rapporté que le cholestérol cristallin pouvait s'oxyder spontanément à l'air. Lifschütz [3,4] a découvert une méthode permettant d'identifier les produits d'oxydation du cholestérol (les oxystérols) par une réaction avec l'acide sulfurique qui produit une intense couleur bleue ou verte. Cette méthode de détection dite « test de couleurs de Lifschütz » a été utilisée par la suite en chromatographie sur couche mince (TLC) pour l'identification de ces oxystérols par vaporisation d'acide sulfurique sur la plaque. Blix et Löwenhielm [5] ont établi le rôle clé de l'oxygène moléculaire dans l'autoxydation du cholestérol. C'est entre 1930 et 1960 environ que s'est développée la chimie du cholestérol à proprement parler, notamment la découverte de structures apparentées entre les stérols, les sels biliaires, les hormones stéroïdes et les triterpénoïdes. Plusieurs oxystérols tels que le 7α-hydroxycholestérol (cholest-5-ène-3β,7α-diol) et le

Figure 1. *Positions d'attaque oxydative sur la molécule de cholestérol [11].*



7β-hydroxycholestérol (cholest-5-ène-3β,7β-diol) ont en outre pu être isolés à partir de tissus animaux. Bergström et Wintersteiner [6-8] ont développé un système modèle permettant l'étude de l'oxydation du cholestérol. Leurs travaux ont abouti à l'identification des produits d'oxydation les plus courants et probablement les mieux connus comme le 7α-hydroxycholestérol, le 7β-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol (3β-hydroxycholest-5-ène-7-one). Fieser et Fieser [9] ont publié un travail de référence sur l'oxydation des stéroïdes, notamment un article de synthèse sur l'oxydation du cholestérol.

Par la suite, le développement de méthodes analytiques toujours plus performantes telles que la chromatographie sur couche mince (TLC), la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie liquide/liquide à haute performance (HPLC) ont permis de mieux connaître ce domaine. Smith [10] a publié un important ouvrage sur l'autoxydation du cholestérol. À ce jour, plus de 60 oxystérols ont été identifiés tant dans des milieux naturels comme le plasma sanguin, les extraits de tissu animaux et les denrées alimentaires que dans les systèmes modèles. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs atomes d'oxygène sur la molécule de cholestérol en formant des alcools primaires, secondaires ou tertiaires, des hydroperoxydes, des aldéhydes, des cétones, des époxydes et des endoperoxydes. La *figure 1* montre les positions où l'oxygène attaque le cholestérol [11]. Les composés prédominants sont ceux issus de l'oxydation du cycle B, la double liaison favorisant les attaques en position allylique et l'époxydation. Les produits formés sont le 7α-hydroxycholestérol, le 7β-hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol, le cholesta-3,5-diène-7-one et le 3β,5α,6β-cholestanetriol [10]. Lorsque le cholestérol se trouve sous forme cristalline, son état d'agrégation est tel que l'empilement des molécules protège les cycles d'une éventuelle oxydation, laissant en revanche la chaîne aliphatique latérale exposée à l'oxydation [12]. Les carbones tertiaires situés en position 20 et 25 sont alors oxydés et forment ainsi le 20α-hydroxycholestérol (cholest-5-ène-3β,20α-diol) et le 25-hydroxycholestérol (cholest-5-ène-3β,25-diol) *(figure 1)*.

L'importance biologique des oxystérols, leurs effets cytotoxiques et mutagènes ainsi que leur rôle probable dans l'initiation de l'athérosclérose, expliquent l'intérêt de l'étude de leur mécanisme de formation [13]. Cette étude *in vivo* est complexe à cause de la formation possible d'oxystérols durant les procédés d'extraction [14].

Le présent article passe en revue les principaux mécanismes de l'oxydation du cholestérol, en particulier le mécanisme d'autoxydation (processus majeur rencontré dans les denrées alimentaires) et, plus brièvement, les mécanismes enzymatiques. Il évoque également le rôle possible des autres composés lipidiques sur la formation des oxystérols. Le terme d'oxystérols désignera exclusivement les produits d'oxydation du cholestérol.

Mécanisme d'autoxydation des lipides

L'autoxydation des lipides est un processus radicalaire de réactions en chaîne comprenant trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison [15] *(figure 2)*.

Certains agents tels que les initiateurs impliqués dans la phase initiale de l'autoxydation sont encore assez mal connus. Le terme « autoxydation » implique théoriquement une initiation propre du substrat sans influence extérieure, mais il est évident que des agents externes interviennent. Un radical généré par photolyse ou irradiation à haute énergie, un radical obtenu par décomposition d'un hydroperoxyde ou un métal de transition peut déclencher l'abstraction d'un hydrogène pour former un radical alkyle [16].

Le processus d'initiation de l'autoxydation d'un lipide insaturé peut être subdivisé en deux types de réactions; celles impliquant le substrat RH (lipide insaturé) et celles entraînant la décomposition du produit ROOH (hydroperoxyde). D'après Chan [16], le processus le plus probable d'initiation impliquerait la participation d'un ion métallique comme catalyseur de ces deux types de réactions *(figure 3)*. La réaction avec RH (Eq. 7) est très importante en début de réaction, lorsque l'on n'a pas ou que très peu de ROOH. L'importance de cette réaction dépend de l'énergie de dissociation de R-H. Pour le linoléate de méthyle par exemple, ce processus (Eq. 7) a été estimé par Heaton et Uri [17] comme étant exothermique. Avec la formation de ROOH, les réactions (Eq. 8 et 9) d'initiation de nouvelles chaînes de réactions prennent de l'importance. Le processus « d'autocatalyse » s'installe alors.

Les réactions décrites par les Eq. 2 et 3 forment la base du processus de réactions en chaîne. Il y a formation de radicaux peroxyles, qui réagissent et forment à leur tour des hydroperoxydes et de nouveaux radicaux relançant ainsi les cycles de propagation. La première réaction d'oxygénation (Eq. 2) est extrêmement rapide, avec une énergie d'activation proche de zéro. La deuxième (Eq. 3) possède une énergie d'activation qui dépend de l'énergie de dissociation de la liaison R-H. La facilité d'abstraction d'un hydrogène du composé lipidique RH va déterminer en fait la vitesse de l'autoxydation, elle-même dépendante du degré d'insaturation des composés. Les cinétiques de l'oxydation des acides stéarique, oléique, linoléique et linolénique sont dans le même rapport que les nombres 1, 100, 1200 et 2500 [18].

Lorsque deux radicaux se combinent et forment des composés stables, la chaîne de propagation s'arrête par ce qu'on appelle une réaction de

Figure 2. *Une autoxydation suit un mécanisme radicalaire de réactions en chaîne.*

Initiation	RH + X•	→	R•	+ XH	Eq. 1
Propagation	R• + O_2	→	ROO•		Eq. 2
	ROO• + RH	→	R•	+ ROOH	Eq. 3
Terminaison	R• + R•	→	RR		Eq. 4
	ROO• + ROO•	→	O_2	+ ROOH	Eq. 5
	ROO• + R•	→	ROOR		Eq. 6

Figure 3. *Processus d'initiation d'une autoxydation catalysée par un ion métallique.*

RH	$+ M^{(n+1)}$	→ R•	$+ H^+$	$+ M^n$	Eq. 7
ROOH	$+ M^n$	→ RO•	$+ OH^-$	$+ M^{(n+1)}$	Eq. 8
ROOH	$+ M^{(n+1)}$	→ ROO•	$+ H^+$	$+ M^n$	Eq. 9

terminaison (Eq 4-6). Ce type de réaction se produit en fait après une série de réactions intermédiaires telles que réarrangement intramoléculaire, élimination, addition ou déplacement [19]. Les produits stables finalement formés sont en général des aldéhydes, des alcools et des hydrocarbures.

Autoxydation du cholestérol

L'autoxydation du cholestérol suit un processus radicalaire de réactions en chaîne identique aux autres lipides insaturés [10]. La résonance paramagnétique électronique l'a mis en évidence en identifiant, lors d'une irradiation du cholestérol, le radical libre situé sur le carbone C7 (le radical 3β-hydroxycholest-5-ène-7-yl), le radical situé sur le carbone tertiaire C25 (le radical 3β-hydroxycholest-5-ène-25-yl) et en présence d'oxygène des radicaux peroxyles [20].
Deux voies distinctes d'autoxydation apparaissent pour le cholestérol *(figure 4)* [21] : un processus majeur avec la formation d'un hydroperoxyde (Eq. 10) et un processus mineur avec une déhydrogénation de la fonction alcool du cholestérol (Eq. 11).

Figure 4. *Deux processus d'autoxydation d'un stérol [21].*

RH	$+ O_2$	→	ROOH	Eq. 10
RCH(OH)	$+ O_2$	→	$RC = O + H_2O_2$	Eq. 11

Le processus majeur correspond à la réaction du radical 3β-hydroxycholest-5-ène-7-yl avec l'oxygène triplet *(figure 5)*. Le radical C7 peroxyl est formé puis, par l'abstraction d'un hydrogène (provenant par exemple du cholestérol), il est transformé en 7α- et 7β-hydroxyperoxycholestérol. Ces deux hydroperoxydes sont les premières substances que l'on a pu identifier lors de l'autoxydation du cholestérol. Elles sont formées simultanément, mais le 7β-hydroperoxyde, quasi équatorial, est prédominant, car plus stable thermodynamiquement [22]. Elles sont ensuite réduites en leurs alcools correspondants (les 7α- et 7β-hydroxycholestérol) et en 7-cétocholestérol [23]. Ce dernier composé peut être à son tour dégradé thermiquement en cholesta-3,5-diène-7-one [24].
La réaction du radical C25 (3β-hydroxycholest-5-ène-25-yl) avec l'oxygène triplet forme selon le même mécanisme le radical 3β-hydroxycholest-5-ène-25-peroxyl qui est ensuite transformé par l'abstraction d'un hydrogène en 25-hydroperoxycholestérol. Ce dernier composé se dégrade thermiquement en 25-hydroxycholestérol comme produit majeur. D'autres hydroperoxydes de la chaîne latérale tels que les 20α- et 20β-, 24α- et 24β-, 26α- et 26β-hydroperoxydes* ont été mis en évidence à partir de cholestérol vieux et fortement oxydé à l'air [23]. Ces composés ont en outre la particularité de se décomposer par une scission β d'une liaison carbone-carbone de la chaîne latérale et d'engendrer des substances volatiles en C_2-C_6 et des stérols en C_{20}-C_{24}. Au nombre des premiers cités, l'acétone et l'acide acétique en sont les substances dominantes [10].
Comme processus d'autoxydation mineur, la fonction alcool du cholestérol peut être déhydrogénée selon un mécanisme qui impliquerait la formation initiale d'un radical en C3 suivie d'une réaction avec l'oxygène triplet pour former le radical 3-hydroxy-3-peroxyl. Ce dernier se transforme ensuite par élimination de peroxyde d'hydrogène en cholest-5-ène-3-one, un autre produit minoritaire de l'autoxydation du cholestérol. Cette cétone isomérise alors facilement pour former le cholest-4-ène-3-one, composé plus stable [263
Les 5α,6α- et 5β,6β-époxycholestérols (5,6α- et 5,6β-époxy-5α-cholestane-3β-ol) ont aussi été identifiés dans du cholestérol vieux et oxydé à l'air, mais leur mécanisme de formation est plus complexe. Il semblerait en effet que les 5,6-époxydes ne soient pas seulement formés par la réaction du cholestérol avec $^3O_2$, mais surtout avec différentes espèces d'oxygène actif telles que le peroxyde d'hydrogène, un stérol hydroperoxyde et l'ozone [27]. Les 5,6-époxydes présentent des degrés de stabilité différents suivant le milieu et le pH considérés [28,29]. Ils peuvent être à leur tour hydrolysés en 3β,5α,6β-cholestanetriol, considéré comme particulièrement toxique.

Oxydation du cholestérol impliquant d'autres espèces d'oxygène actif

Les espèces d'oxygène actif impliquées dans l'initiation de l'autoxydation du cholestérol ou d'autres oxydations peuvent être monoatomique, diatomique ou triatomique *(tableau)*. Elles incluent l'état fondamental de l'oxygène moléculaire (triplet : $^3O_2$), l'oxygène moléculaire électroniquement excité (singulet : $^1O_2$), le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le cation dioxygène O_2^+, les peroxydes (H_2O_2, HOO^-, O_2^{2-}), le radical hydroxyle HO• et l'ozone O_3. Le cation dioxygène O_2^+ est absent des systèmes biologiques. Le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ ne semble pas réagir avec le cholestérol [30], mais dismute en générant du peroxyde d'hydrogène qui peut à son tour former le radical hydroxyle HO•, soit deux espèces oxydantes pour le cholestérol [23].

L'ozone

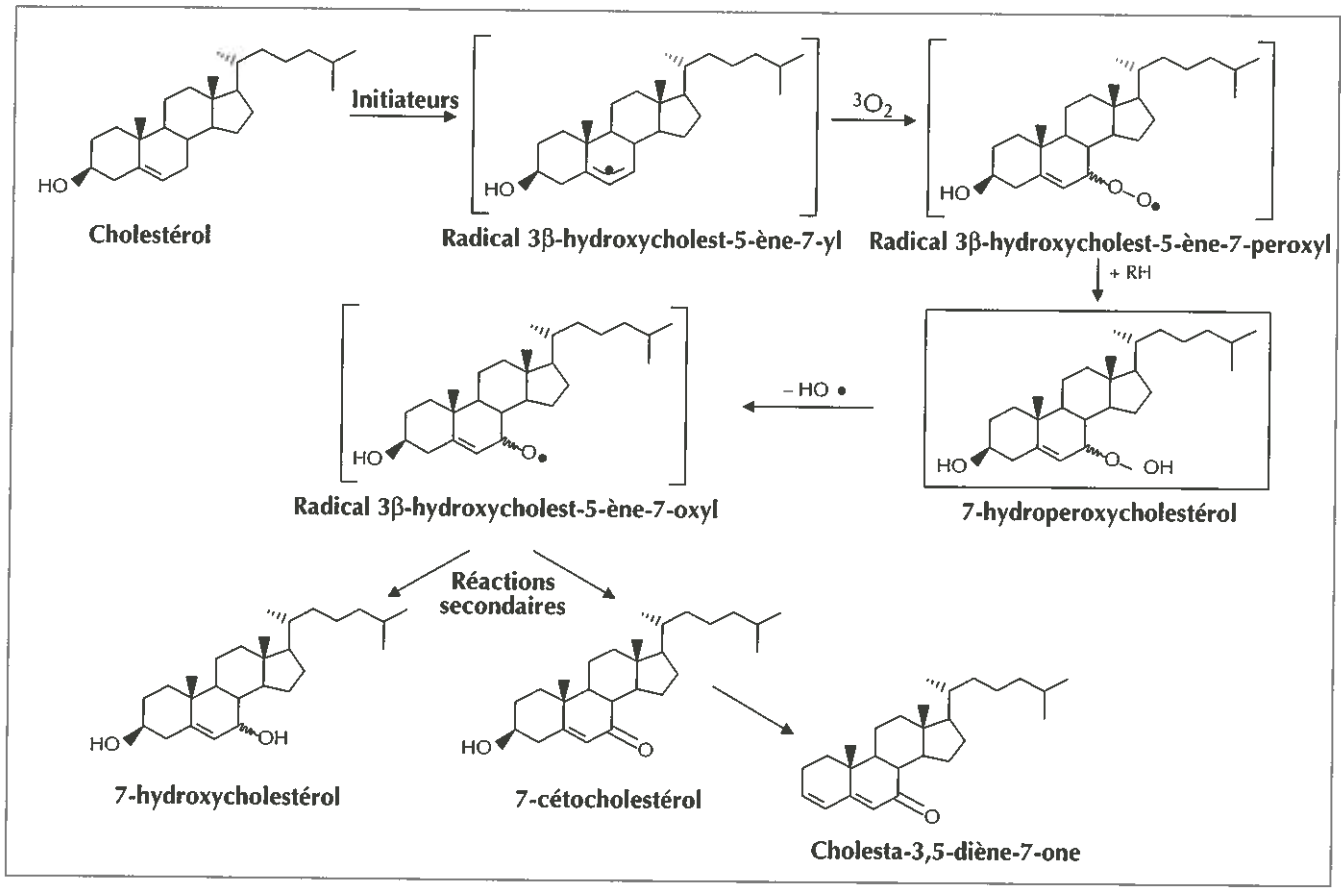
L'ozone, O_3, est un oxydant très actif présent dans l'atmosphère. Il oxyde le cholestérol soit par Δ^5-scission, c'est-à-dire par scission de la double liaison et formation d'ozonides ou de peroxyacétals selon le milieu réactionnel, soit par Δ^5-époxydation [31,32]. Comme pour une autoxydation du cholestérol, ce deuxième mécanisme produit les 5α,6α- et 5β,6β-époxycholestérols, l'épimère β y étant prédominant. Cependant, seuls ces deux composés ont pu être mis en évidence dans les tissus animaux [23].

L'oxygène singulet

L'oxygène singulet, $^1O_2$, peut être généré chimiquement, enzymatiquement, par décharge électrique ou par décomposition d'hydro-

*La molécule de cholestérol étant asymétrique, la position C25 est un centre prochiral qui différencie stéréochimiquement les groupes méthyles C26 et C27. La nomenclature exacte des hydroperoxydes correspondants est par conséquent : le (25R)- et le (25S)-26-hydroperoxyde (oxydation en C27 et C26 respectivement) [25].

Figure 5. *Autoxydation du cholestérol en position allylique.*



peroxydes. Sa formation par voie photochimique est dominante, notamment dans des systèmes alimentaires contenant des photosensibilisateurs tels que la riboflavine, la chlorophylle ou l'hématoporphyrine [33,34].

L'oxygène singulet réagit avec la double liaison Δ5,6 du cholestérol selon un mécanisme concerté de type « ène » *(figure 6)*. Le 5α-hydroperoxycholestérol est le produit formé majoritairement par abstraction stéréospécifique de l'hydrogène en position 7α. Les 6α- et 6β-hydroperoxycholestérols sont les produits formés minoritairement par l'abstraction des l'hydrogènes axial 4β et équatorial 4α. Aucune épimérisation des 6-hydroperoxycholestérols n'a été observée lors d'expériences de contrôle [22]. Étant donné la spécificité de sa formation, le 5α-hydroperoxyde est considéré comme un marqueur de la présence d'oxygène singulet dans des systèmes contenant du cholestérol [10,35]. Il peut cependant subir un réarrangement allylique pour former l'isomère 7α-hydroperoxyde, rendant ainsi plus difficile l'interprétation d'un mécanisme de photooxydation ou d'autoxydation radicalaire [36]. Cette transformation évoque un réarrangement sigmatropique (1;3) avec le radical 5α-peroxyle et le radical 7α-peroxyle comme intermédiaires [37,38]. Ce réarrangement est très différent de l'épimérisation du 7α-hydroxycholestérol en 7β-hydroxycholestérol qui suggère plutôt une dissociation de l'oxygène du stérol [23].

Le peroxyde d'hydrogène

La réaction du peroxyde d'hydrogène, H_2O_2, avec le cholestérol génère le mélange des 5,6-époxycholestérols épimères avec la forme 5β,6β-époxyde prédominante. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas seulement actif en tant que tel dans l'oxydation du cholestérol, mais peut se dismuter et générer des oxygènes triplet et singulet et former des radicaux hydroxyles par homolyse de la liaison peroxyde (réaction catalysée par des ions métalliques). Ces espèces d'oxygène sont elles aussi oxydantes pour le cholestérol [39].

Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle, HO°, peut se former soit par radiolyse de l'eau, soit par réaction du peroxyde d'hydrogène en présence d'un ion métallique (réaction d'Haber-Weiss). Les oxystérols formés par irradiation γ résulteraient d'un mécanisme impliquant le radical hydroxyle [40]. Dans des systèmes organiques ou aqueux, le radical hydroxyle oxyde le cholestérol pour former le 7-cétocholestérol, les 7α- et 7β-hydroxycholestérols par abstraction de l'hydrogène en

Tableau. *Principaux produits d'oxydation du cholestérol formés par diverses espèces d'oxygène actif [10].*

Espèces d'oxygène actif pour l'oxydation du cholestérol	Produits initiaux d'oxydation	Produits secondaires d'oxydation
Ozone (O_3)	ozonides peroxyacétals 5α, 6α- et 5β, 6β-époxycholestérol	3β,5α,6β-cholestanetriol
Oxygène triplet ($^3O_2$)	7α- et 7β-hydroperoxycholestérol 20α- et 20β-hydroperoxycholestérol 24α- et 24β-hydroperoxycholestérol 26α- et 26β-hydroperoxycholestérol 5α,6α- et 5β, 6β- époxycholestérol cholest-5-ène-3-one	7α- et 7β-hydroxycholestérol 7-cétocholestérol cholesta-3,5-diène-7-one cholesta-2,4,6-triène 20α- et 20β-hydrooxycholestérol 24α- et 24β-hydrooxycholestérol* 24-cétocholestérol 25-hydroxycholestérol 26α et 26β-hydroxycholestérol 3β,5α,6β-cholestanetriol cholest-4-ène-3-one
Oxygène singulet ($^1O_2$)	5α-hydroperoxycholestérol 6α- et 6β-hydroperoxycholestérol	7α-hydroperoxy- et 7α-hydroxy-cholestérol 3β-hydroxycholest-4-ène-6-one cholest-4-ène-3,6-dione 5α-cholestane-3,6-dione 6α- et 6β-hydroxycholestérol cholesta-2,4,6-triène
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (également source d'$^1O_2$, $^3O_2$ et de HO°)	5α,6α- et 5β,6β-époxycholestérol	3β,5α,6β–cholestanetriol
Radical hydroxyle (HO°)	5α,6α- et 5β, 6β–époxycholestérol 7α- et 7β-hydroxycholestérol 7-cétocholestérol	3β,5α,6β-cholestanetriol
Radicaux peroxyle et alkoxyle (ROO°, RO°)	dérivés 5α,6α- et 5β, 6β-époxy- 7α-hydroxy-, 7β-hydroxy- et 7-oxo-	

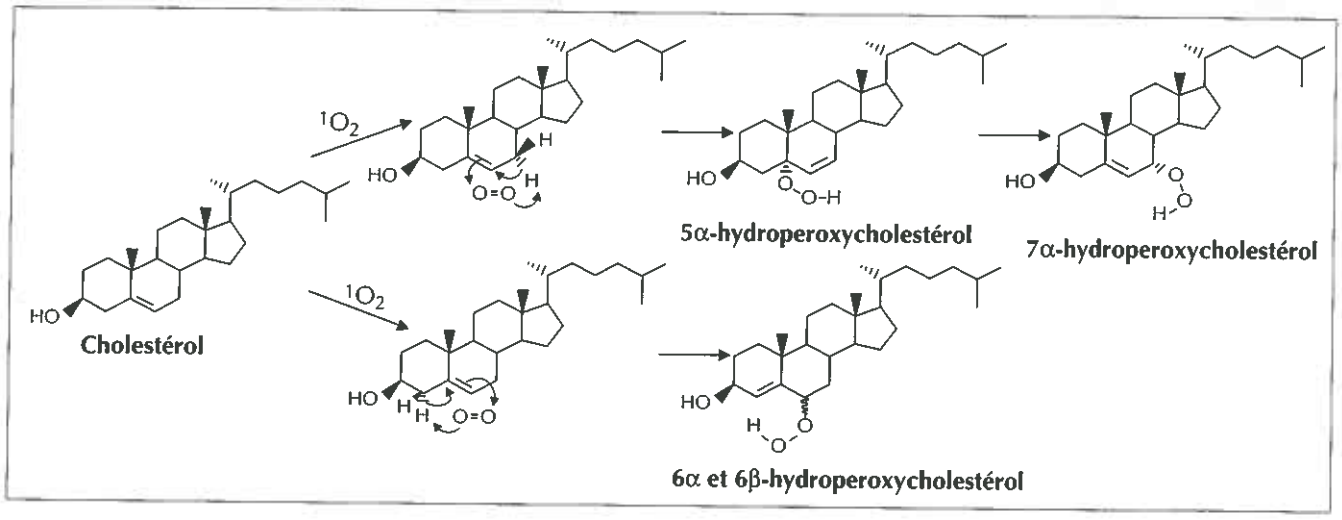
* Composés obtenus par réduction et non par dégradation thermique.

position C7, ainsi que les 5,6-époxycholestérols et le 3β,5α,6β-cholestanetriol par addition radicalaire. Tous ces composés ont été identifiés lors d'une radiolyse d'une dispersion aqueuse de cholestérol saturée en dioxyde d'azote. L'absence de formation d'hydroperoxydes semble prouver une attaque par le radical hydroxyle [41].

Les radicaux peroxyle et alkoxyle

L'étude de l'oxydation directe du cholestérol par des radicaux peroxyle et alkoxyle (ROO°, RO°) est d'un grand intérêt pour comprendre les mécanismes impliqués dans des oxydations biologiques catalysées par des ions métalliques, notamment les peroxydations

Figure 6. *Oxydation du cholestérol par l'oxygène singulet (photo-oxydation).*



lipidiques. Une série d'études modèles portant sur les réactions de l'acétate de cholestérol avec divers hydroperoxydes (tertiobutylhydroperoxyde, hydroperoxydes de l'acide oléique et de l'acide linoléique) en présence de fer (III) chélaté, a montré la formation du 3β-acétoxycholest-5-ène-7-one, des 3β-acétoxycholest-5-ène-7-ols et des 3β-acétoxy-5,6-époxycholestanes. Cette réaction semblerait être dominée par un processus radicalaire où les radicaux peroxyles et alkoxyles seraient les espèces attaquantes [42-44]. La stéréosélectivité β de l'époxydation observée serait en outre en accord avec celle rencontrée dans le système microsomal NADPH dépendant des lipides chez le rat [45].

Oxydations enzymatiques du cholestérol

Introduction

L'identification des oxystérols provenant des tissus ainsi que la connaissance de leur origine et de leurs fonctions physiologiques sont très complexes. Certains oxystérols ont une origine métabolique connue, mais pour d'autres, leur origine reste obscure. Des métabolismes endogènes, une peroxydation lipidique, une autoxydation, un apport par l'alimentation, une oxydation photochimique (par exemple une photo-oxydation du cholestérol de la peau exposée à la lumière et à l'air [46]) peuvent être sources d'oxystérols dans les systèmes vivants. Les oxystérols peuvent également être générés par des oxydants xénobiotiques (par exemple l'oxydation du cholestérol dans les poumons sous l'effet d'oxydants présents dans l'air inspiré [47,48]. Ils peuvent également être formés par autoxydation dans des échantillons biologiques post-mortem. La formation artefactuelle d'oxystérols dans de tels échantillons peut en effet être une source d'erreur considérable [10]. L'analyse immédiate de 7-cétocholestérol dans du sang frais a indiqué par exemple une teneur de 24 ng/ml, alors que le même sang conservé une heure à température ambiante, sans ajout d'antioxydant, en contenait déjà 63 ng/ml [49]. Il est par conséquent très difficile d'étudier les mécanismes impliqués *in vivo*.

Métabolisme endogène

Le cholestérol est un composé indispensable à notre organisme. Il est présent dans nos membranes cellulaires et a pour fonction d'assurer leur stabilité, leur fluidité et leur fonction. Le cholestérol sert de précurseur aux biosynthèses hépatique des acides biliaires et endocrine des hormones stéroïdiennes. Il est donc exposé *in vivo* à de nombreuses transformations. Une oxydation enzymatique par les oxydases à fonctions mixtes dépendantes du cytochrome P-450 a lieu par exemple lors de telles biosynthèses. Plusieurs oxystérols en sont dérivés, en particulier, le 7α-, le 25- et le 26-hydroxycholestérol lors de la biosynthèse hépatique de l'acide biliaire. Le (24S)-cholest-5-ène,3β,24-diol qui semble être formé dans le tissu nerveux central jouerait aussi un rôle dans la biosynthèse des acides biliaires. Le 20α- et le 22-hydroxycholestérol sont impliqués dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes [23].

Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique du cholestérol suit un mécanisme radicalaire semblable à celui d'une autoxydation, mais l'étape initiale de cette réaction est associée à un processus enzymatique comparable aux processus mis en évidence *in vitro*. Trois systèmes enzymatiques ont été étudiés *in vitro:* la lipoxygénase du soja, la peroxydase du raifort et le système microsomal NADPH dépendant des lipides chez le rat. Dans ces trois exemples, l'oxydation du cholestérol est couplée à l'oxygénation d'esters d'acides gras polyinsaturés par la lipoxygénase du soja, à la réduction du peroxyde d'hydrogène catalysée par la peroxydase du raifort et à l'oxydation du NADPH par le système microsomal NADPH dépendant des lipides dans le foie du rat. Des 7-hydroperoxydes épimères sont d'abord formés, puis transformés en 7α-hydroxycholestérol, 7β-hydroxycholestérol et 7-cétocholestérol [50]. On a observé une époxydation du cholestérol par l'intermédiaire d'une peroxydation lipidique de microsomes en présence d'un complexe Fe(III)-ADP et de NADPH. Les substances produites sont les 5α,6α- et 5β,6β-époxycholestérol [51-54].
La présence, dans du plasma ou du sérum humain frais, d'oxystérols non impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels que le 7β-

hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol et le 5β,6β-époxycholestérol [55-57] de même que celle des 7β-hydroxycholestérol et 7-cétocholestérol sous la forme d'esters d'acides gras et d'un hydroperoxyde de cholestérol 3β-linoléate rendent possible l'hypothèse d'une peroxydation lipidique du cholestérol *in vivo* [58].

Oxydation des esters du cholestérol

Dans les denrées alimentaires, le cholestérol est présent en majeure partie sous forme libre. Dans les œufs ou les produits laitiers, le cholestérol estérifié ne représente qu'environ 10 à 15 % du cholestérol total [59,60]. Dans le poisson, cette proportion peut atteindre 35-38 % [61]. Dans le sang, le cholestérol, transporté par les lipoprotéines de basse et haute densité (LDL, HDL), est en revanche estérifié à raison de 80% environ [62]. L'influence de la partie ester d'acides gras sur l'oxydation du cholestérol a donc été étudiée dans des études modèles.

Korahani *et al.* [63] ont étudié l'autoxydation des esters du cholestérol à l'état solide et en dispersion aqueuse. Des études de cinétique ont montré que la vitesse de l'oxydation de la partie cholestéryle, à l'état solide et en présence de peroxyde de benzoyle, augmente proportionnellement avec le degré d'insaturation des esters, mais qu'après plusieurs heures de réaction, la fraction cholestéryle oxydée devient plus importante pour les esters saturés que non saturés. Au début, l'effet accélérateur des esters insaturés est dû, probablement, d'une part, à la formation de peroxydes initiateurs et d'autre part à une réaction intramoléculaire d'autoxydation entre l'ester insaturé et la partie cholestéryle. Après plusieurs heures de réaction, la chaîne acyle insaturée semble se rompre et ne plus accélérer l'autoxydation. On observe une grande différence entre l'oxydation du cholestérol (libre) à l'état solide et celle de sa forme estérifiée avec une chaîne stéarique ou oléique. Après quatre jours de réaction, seuls 3% du cholestérol libre sont oxydés contre 95% pour ses deux esters. Dans une dispersion micellaire, cette différence est moins significative, le cholestérol libre s'oxydant aussi bien que le linoléate de cholestérol et même mieux que ses esters d'oléate et de stéarate. Dans un tel milieu, les chaînes stéarique et oléique semblent au contraire protéger, par leur caractère apolaire, la partie cholestéryle d'une attaque par un oxydant.

D'autres études effectuées à 85°C dans des suspensions aqueuses aérées ont montré l'influence de l'insaturation des chaînes acyles sur l'autoxydation des esters de cholestérol [64,65]. Après quatre heures de réaction, 55% du cholestérol libre sont oxydés, l'oléate de cholestérol reste stable, alors que 20% d'arachidonate, 50% du linolénate et 75% du linoléate de cholestérol sont oxydés. La stabilité des esters de cholestérol semble donc augmenter avec l'insaturation de la chaîne acyle. Norcia et Mahadevan [65] expliquent cette stabilité par l'introduction d'atomes d'oxygène dans la chaîne acyle insaturée, qui change ainsi l'organisation et l'orientation des molécules d'un tel système colloïdal.

Influence des lipides sur l'oxydation du cholestérol non estérifié

L'influence des milieux lipidiques sur l'oxydation du cholestérol a été étudiée dans des systèmes modèles. La présence de triglycérides accélère l'oxydation du cholestérol à 130°C [66]. Pendant les dix premières heures de réaction, la trioléine semble avoir un plus grand pouvoir accélérateur que la tristéarine, la graisse du lait ou la trilinoléine, en dépit de la plus grande instabilité de cette dernière face à l'oxydation en général. Lors d'études similaires, Osada *et al.* [67] ont observé que le cholestérol pur chauffé 24 heures à 100°C ne produit aucun oxystérol, alors qu'avec des graisses saturées telles que la tristéarine ou le suif de bœuf, on constate une faible oxydation. En présence d'huiles de sardine ou de carthame, la production d'oxystérols atteint son maximum (3 µg d'oxystérols / mg de cholestérol) après 6 heures, puis diminue, les oxystérols formés étant décomposés. Lorsque la matrice contient des huiles de soja, de lin ou de trioléine, une oxydation maximale est atteinte au bout de 12 heures (3,3 µg d'oxystérols / mg de cholestérol) pour diminuer par la suite.

Le stockage de cholestérol pur à l'air sec, à 25 °C pendant 104 jours, et de cholestérol en présence de triglycérides de poisson purifiés ou de trioléine a montré que seul le mélange contenant les triglycérides d'huile de poisson s'était oxydé [68]. Après 24 jours de stockage déjà, on a pu détecter du 7-cétocholestérol, du 7β-hydroxycholestérol et des 5,6-époxycholestérol épimères. Des études récentes ont également mis en évidence la présence d'importantes quantités d'oxystérols dans divers poissons après séchage à l'air, fumage ou mise en conserve [67-69]. Cette oxydation du cholestérol peut s'expliquer par l'influence de certains acides gras polyinsaturés (PUFAs) abondants dans le poisson de mer. Certains PUFAs relativement instables comme les acides arachidonique (20:4,n-6), eicosapentaénoïque (20:5,n-3) et docosahexaénoïque (22:6,n-3) s'oxydent en effet rapidement. Les radicaux produits lors de l'oxydation de ces PUFAs agissent comme accélérateurs de l'oxydation du cholestérol [68]. L'abaissement du degré d'insaturation des triglycérides d'huile de poisson (par hydrogénation) accroît la période d'induction de l'oxydation du cholestérol. Mais après cette période, la vitesse d'accumulation des oxystérols est la même pour l'huile de poisson hydrogénée ou non hydrogénée. La susceptibilité du cholestérol à l'autoxydation semble donc rester inchangée, seule la période d'induction étant influencée [70].

Si l'influence des lipides et de leur degré d'insaturation sur l'oxydation du cholestérol a été clairement démontrée, elle est cependant parfois difficile à interpréter. Au nombre des explications avancées, on peut mentionner celle de l'influence des lipides sur le point de fusion du cholestérol, celui-ci pouvant s'oxyder plus rapidement à l'état liquide [66]. Une action antioxydante exercée par certains produits de décomposition, de même qu'une inhibition physique causée par certains composés formés (par exemple des polymères) agissant comme barrière et diminuant la mobilité des molécules réactives ou de leur combinaison avec l'oxygène ont également été suggérées [66].

Conclusion

Comme l'a montré ce travail, de nombreux produits d'oxydation du cholestérol sont formés *in vivo* aussi bien par des réactions enzymatiques que non enzymatiques. Certaines réactions enzymatiques produisent des « oxystérols métabolites » qui ont des fonctions physiologiques, mais la formation des oxystérols en général par autoxydation et/ou peroxydation lipidique n'a toujours pas de finalité connue. On pourrait citer néanmoins le rôle physiologique des oxystérols, et en particulier celui du 26-hydroxycholestérol dans l'inhibition de la HMG-CoA réductase [71]. En raison des risques potentiels de tels composés pour l'organisme, il est important d'élucider et de différencier ces mécanismes de formation ainsi que de déterminer la contribution exacte des oxystérols d'origine alimentaire. Des effets mutagènes et cytotoxiques ont été démontrés *in vitro* [13]. Plusieurs études ont également impliqué les oxystérols, en particulier le 25-hydroxycholestérol

et le cholestanetriol, plutôt que leur précurseur, le cholestérol, dans la formation de lésions athéromateuses [72,73]. L'oxydation des lipides au sein des lipoprotéines de basse densité (LDL), c'est-à-dire l'oxydation des PUFAs des phospholipides et du cholestérol qu'elles contiennent, semble jouer un rôle important dans l'initiation de l'athérosclérose. Ces LDL modifiées oxydativement ont montré également des effets cytotoxiques où les oxystérols pourraient d'ailleurs être mis en cause. L'oxydation des lipides au sein des lipoprotéines est donc particulièrement étudiée de même que l'utilisation *in vivo* d'antioxydants tels que la vitamine E [74].

Dans les denrées alimentaires, les produits d'oxydation du cholestérol sont formés essentiellement par des réactions non enzymatiques induites par certains procédés de fabrication des aliments (par exemple le séchage de laits en poudre et de poudres d'œuf), par leur stockage à l'air, par leur exposition à la lumière ou à une irradiation, ainsi que par leur utilisation domestique (échauffement important des graisses animales, friture, etc.). Dans ce domaine, les poudres d'œuf semblent particulièrement sensibles à une oxydation du cholestérol, en raison de leur forte teneur en ce constituant et de la présence de fer et de graisses insaturées [75]. D'importantes quantités d'oxystérols ont été déterminées dans du suif fortement chauffé [76]. Certaines viandes (lyophilisées ou après friture), des poissons séchés ou fumés et des produits laitiers riches en corps gras (beurre, parmesan, poudre de lait, ghee) peuvent également contenir des quantités non négligeables d'oxystérols [67, 75].

Divers antioxydants connus pour leurs propriétés inhibitrices durant l'oxydation des acides gras insaturés ont également été testés pour ralentir l'oxydation du cholestérol. Dans une étude modèle, l'oléorésine du romarin, la quercétine, la myricétine et le butylhydroxyanisole (BHA) n'ont pas montré de propriétés antioxydantes. En revanche, les tocophérols (notamment sous formes γ et δ) se sont révélés plus efficaces, sans toutefois présenter des effets de synergie [77]. L'ajout de palmitate d'ascorbyle et de dl-α-tocophérol dans du suif chauffé à 135°C a montré un effet inhibiteur durant les 70 premières heures du traitement [78]. Yan et White [79] ont également étudié l'effet de divers antioxydants durant l'échauffement du saindoux. Le palmitate d'ascorbyle, le butylhydroxyanisole de même qu'un mélange de tocophérols semblent également inhiber la formation des oxystérols durant le stockage de poudre de jaune d'œuf [80].

À défaut de pouvoir intervenir de façon plus directe (par exemple par d'éventuels ajouts d'antioxydants naturels), une connaissance plus approfondie des conditions de formation des oxystérols dans les denrées alimentaires devrait donc permettre une meilleure prévention.

Remerciements :

Le présent travail fait partie d'une thèse de doctorat. Les auteurs tiennent à remercier l'Institut Candia (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France), la maison Cremo (Villars-sur-Glâne, Suisse) ainsi que la Fédération des coopératives Migros (Zurich, Suisse) pour leur soutien financier accordé sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur. Les auteurs remercient également le Dr Elizabeth Prior et le Dr Pierre Lambelet du Centre de Recherche Nestlé (Vers-chez-les-Blanc, Suisse) ainsi que le Pr P. Renaud de l'Institut de chimie organique (Fribourg, Suisse) pour leur lecture critique du manuscrit.

RÉFÉRENCES

1. CHEVREUL ME (1816). Sixième mémoire. Examen des graisses d'homme, de mouton, de bœuf, de jaguar et d'oie. *Ann Chim Phys,* 2 : 339.
2. SCHULTZE E, WINTERSTEIN E (1904). Über das Verhalten des Cholesterins gegen das Licht. *Physiol Chem,* 43 : 316.
3. LIFSCHÜTZ I (1907). Die Oxydationsprodukte des Cholesterins in den tierischen Organen. *Physiol Chem,* 53 : 140.
4. LIFSCHÜTZ I (1913). Quantitative Bestimmungen der Oxydationsprodukte des Cholesterins. *Biochem Z,* 48 : 373-409.
5. BLIX G, LÖWENHIELM G (1928). CLXV. On the oxidation of cholesterol by molecular oxygen. *Biochem J,* 22 : 1313-22.
6. BERGSTRÖM S, WINTERSTEINER O (1941). Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution. The nature of the products formed from cholesterol. *J Biol Chem,* 141 : 597-610.
7. BERGSTRÖM S, WINTERSTEINER O (1942). Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution II. Δ^6-cholestenediol,-3(β),5, a rearrangement product of 7(β)-hydroxycholesterol. *J Biol Chem,* 143 : 503-7.
8. BERGSTRÖM S, WINTERSTEINER O (1942). Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution III. Quantitative studies on cholesterol. *J Biol Chem,* 145 : 309-26.
9. FIESER LF, FIESER M (1959). Steroids oxidation. New York : Reinhold, 189.
10. SMITH LL (1981). *Cholesterol autoxidation.* New York : Plenum Press.
11. CRASTES DE PAULET A, ASTRUC M E, BASCOUL J, DEFAY R (1990). Biological effects of oxysterols. In : *Free radicals, lipoproteins and membrane lipids,* A Crastes de Paulet, LD Blazy, R Paoletti, eds. New York : Plenum Press, 291-300.
12. BECKWITH ALJ (1958). The oxidation of cristalline cholesterol. *Proc Chem Soc,* 154 : 194-5.
13. PENG SK, MORIN RJ (1992). Biological effects of cholesterol oxides. Boca Raton, Ann Arbor, London : CRC Press.
14. PARK PSW, ADDIS PB (1992). Methods of analysis of cholesterol oxides. In : *Biological effects of cholesterol oxides,* SK Peng , RJ Morin eds. Boca Raton, Ann Arbor, CRC Press, London : 33-70.
15. RICHARDSON T, KORYCKA-DAHL M (1983). Lipid oxidation. In : *Developments in dairy chemistry. 2. Lipids,* PF Fox, ed. Dublin : Applied Science Publishers, 241-363.
16. CHAN HWS (1987). The mechanism of autoxidation. In : *Autoxidation of unsatured lipids.* London : Academic Press, 1-16.
17. HEATON FW, URI N (1961). The aerobic oxidation of unsaturated fatty acids and their esters: cobalt stearate-catalyzed oxidation of linoleic acid. *J Lipid Res,* 2 : 152-60.
18. DEMAN J (1976). *Principles of food chemistry,* Westport : AVI publ., 60.
19. GARDNER HW (1987). Reactions of hydroperoxides-products of high molecular weight. In : *Autoxidation of unsatured lipids,* HWS Chan, ed. Academic Press : London, 51-93.
20. SEVILLA CL, BECKER D, SEVILLA MD (1986). An electron spin resonance investigation of radical intermediates in cholesterol and related compounds: relation to solid-state autoxidation. *J Phys Chem,* 90 : 2963-8.
21. SMITH LL (1980). The autoxidation of cholesterol. In : *Autoxidation in food and biological systems,* MG Simic, M Karel, eds. New York-London : Plenum Press, 119-32.
22. TENG JI, KULIG MJ, SMITH LL, KAN G, VAN LIER JE (1973). *J Org Chem,* 38 : 119-23.
23. SMITH LL (1992). The oxidation of cholesterol. In : *Biological effects of cholesterol oxides,* SK Peng, RJ Morin, eds. Boca Raton, Ann Arbor, London : CRC Press, 7-31.
24. VAN LIER JE, Smith LL (1968). Crystalline sterols obtained by gas chromatography. *J Chromatog,* 36 : 7-17.
25. JAVITT NB (1990). 26-hydroxycholesterol: synthesis, metabolism and biologic activities. *J Lipid Res,* 31 : 1527-33.
26. ANSARI GAS, SMITH LL (1978). Sterol metabolism. XLI. Cholesterol A-ring autoxidations. *Chem Phys Lipids,* 22 : 55-62.
27. GUMULKA J, PYREK J S, SMITH LL (1982). Interception of discrete oxygen species in aqueous media by cholesterol: formation of cholesterol epoxides and secosterols. *Lipids,* 17 : 197-203.
28. MAERKER G, BUNICK FJ (1986). Cholesterol oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during cholesterol oxidation in aqueous dispersions. *J Am Oil Chem Soc,* 63 : 771-7.
29. KIM SK, NAWAR WW (1993). Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids,* 28 : 917-22.
30. SMITH LL, KULIG MJ, TENG JI (1977). Sterol metabolism. XL. On the failure of superoxide radical anion to react with cholesterol. *Chem Phys Lipids,* 20 : 211-5.

31. GUMULKA J, SMITH LL (1983). Ozonization of cholesterol. *J Am Chem Soc*, 105 : 1972-9.
32. JAWORSKI K, SMITH LL (1988). Ozonization of cholesterol in nonparticipating solvents. *J Org Chem* 53 : 545-54.
33. BRADLEY DG, MIN DB (1992). Singulet oxygen oxidation of foods. *Food Sci Nutr*, 31 : 211-36.
34. KORYCKA-DAHL M, RICHARDSON T (1980). Initiation of oxidative changes in food. *J Dairy Sci*, 63 : 1181-98.
35. KORYTOWSKI W, BACHOWSKI GI, GIROTTI AW (1992). Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5α- and 6β-hydroperoxides as indicators of singulet oxygen intermediacy. *Photochem Photobiol*, 56 : 1-8.
36. GALARIS D, MIRA D, SEVENIAN A, CADENAS E, HOCHSTEIN P (1988). Co-oxidation of salicylate and cholesterol during the oxidation of metmyoglobin by H_2O_2. *Arch Biochem Biophys*, 262 : 221-31.
37. LYTHGOE B, TRIPPETT S (1959). Allylic rearrangement of an αβ-unsatured hydroperoxide. *J Chem Soc*, 471-2.
38. RAMM P J, CASPI E (1969). The stereochemistry of tritium at carbon atoms 1, 7, and 15 in cholesterol derived from (3R, 2R)-(2-^{3}H)-mevalonic acid. *J Biol Chem*, 244 : 6064-73.
39. SMITH LL, KULIG M J, MIILLER D, ANSARI GAS (1978). Oxidation of cholesterol by dioxygen species. *J Am Chem Sci*, 100 : 6206-11.
40. CRASTES DE PAULET A, ASTRUC M E, BASCOUL J (1988). Les oxystérols : propriétés biologiques et problèmes nutritionnels. In : *Biologie des lipides chez l'homme*, L Douste-Blazy, F Mendy, eds. Paris : CNRS-CNERNA, 154-73.
41. ANSARI GAS, SMITH LL (1979) The oxidation of cholesterol by hydroxyl radical. *Photochem Photobiol*, 30 : 147-50.
42. KIMURA M, MUTO T (1979). On the reaction of cholesteryl acetate with tert-butyl hydroperoxide in the presence of tris(acetylacetonato)iron(III). *Chem Pharm Bull*, 27 : 109-12.
43. KIMURA M, MUTO T (1981). Further studies on the oxy-functionalization of cholesteryl acetate with tert-butyl hydroperoxide in the presence of tris(acetylacetonato)iron(III). *Chem Pharm Bull*, 29 : 1862-9.
44. MUTO T, TANAKA J, MIURA T, KIMURA M (1982). Iron-catalyzed autoxidation of cholesterol in the presence of unsatured long-chain fatty acid. *Chem Pharm Bull*, 30 : 3172-7.
45. ARINGER L, ENEROTH P (1973). Studies on the formation of C_7-oxygenated cholesterol and β-sitosterol metabolites in cell-free preparations of rat liver. *J Lipid Res*, 14, 553-72.
46. LO WB, BLACK HS (1972). Formation of cholesterol-derived photoproducts in human skin. *J Invest Dermatol*, 58 : 278-83.
47. SEVANIAN A, MEAD JF, STEIN RA (1979). Epoxides as products of lipid autoxidation in rat lungs. *Lipids*, 14 : 634-43.
48. SEVANIAN A, ELSAYED N, HACKER AD (1982). Effects of vitamin E deficiency and nitrogen dioxide exposure on lung lipid peroxidation: use of lipid epoxides and malonaldehyde as measures of peroxidation. *J Toxicol Environ Health*, 10 : 743-56.
49. BJÖRKHEM I (1986). Assay of unesterified 7-oxocholesterol in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 154 : 497-501.
50. TENG JI, SMITH LL (1976). Sterol metabolism. XXXVII. On oxidation of cholesterol by dioxygenases. *Bioorg Chem*, 5 : 99-119.
51. ARINGER L, ENEROTH P (1974). Formation and metabolism *in vitro* of 5,6-epoxides of cholesterol and β-sitosterol. *J Lipid Res*, 15 : 389-98.
52. WATABE T, KANAI M, ISOBE M, OZAWA N (1980). Cholesterol α- and β-epoxides as obligatory intermediates in the hepatic microsomal metabolism of cholesterol to cholestanetriol. *Biochim Biophys Acta*, 619 : 414-9.
53. WATABE T, KANAI M, ISOBE M, OZAWA N (1981). The hepatic microsomal biotransformation of Δ5-steroids to 5α,6β-glycols via α- and β-epoxides. *Biochim Biophys Acta*, 619 : 414-9.
54. WATABE T, TSUBAKI A, ISOBE M, OZAWA N, HIRATSUKA A (1984) A mechanism for epoxidation of cholesterol by hepatic microsomal lipid hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta, 795* : 60-6.
55. KOOPMAN BJ, VAN DER MOLEN JC, WOLTHERS BG, VANDERPAS IB (1987). Determination of some hydroxycholesterols in human serum samples. *J Chromatog*, 416 : 1-13.
56. BROOKS CJW, MCKENNA RM, COLE RM, MACLACHLAN WJ, LAWRIE TDV (1983). « Profile » analysis of oxygenated sterols in plasma and serum. *Biochem Soc Transact*, 11 : 700-1.
57. BREUER O, BJÖRKHEM I (1995). Use of an $^{18}O_2$ inhalation technique and mass isotopomer distribution analysis to study oxygenation of cholesterol in rat. Evidence for *in vivo* formation of 7-oxo-, 7-β-hydroxy, 24-hydroxy-, and 25-hydroxycholesterol. *J Biol Chem*, 270 : 20278-84.
58. SMITH LL, TENG JI, LIN YY, SEITZ PK, MCGEHEE M F (1981). Sterol metabolism. XLVII. Oxidized cholesterol esters in human tissues. *J Steroid Biochem*, 14 : 889-900.
59. STARON T (1980). L'œuf dans l'alimentation humaine; contribution à l'étude de la composition de l'œuf de poule. *Méd Nutr*, XVI : 309.
60. WOOD DL, BITMAN J (1986). Cholesteryl esters of cows'milk. *J Dairy Sci*, 69 : 2203-8.
61. DE KONING AJ, HEARSHAW KD, VAN DER MERWE G (1993). Free and esterified cholesterol in a number of South African fish oils and their corresponding meals. *Fat Sci Technol*, 95 : 27-31.
62. ASSMANN G (1982). *Lipidstoffwechsel und Atherosklerose*. Stuttgart : Schattauer-Verlag.
63. KORAHANI V, BASCOUL J, CRASTES DE PAULET A (1982). Autoxidation of cholesterol fatty acid esters in solid state and aqueous dispersion. *Lipids*, 17 : 703-8.
64. NORCIA LN, JANUSZ WF (1965). Autoxydation of cholesteryl linoleate in aqueous colloidal suspension. *J Am Oil Chem Soc*, 42 : 847-8.
65. NORCIA LN, MAHADEVAN V (1973). Effects of acyl chain hydroxyl groups and increasing unsaturation on the autoxidation of cholesteryl esters in aqueous colloidal suspension. *Lipids*, 8 : 17-20.
66. KIM SK, NAWAR WW (1991). Oxidative interactions of cholesterol with triacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc*, 68 : 931-4.
67. OSADA K, KODAMA T, CUI L, YAMADA K, SUGANO M (1993). Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods. *J Agric Food Chem*, 41 : 1893-8.
68. OHSHIMA T, LI N, KOIZUMI C (1993). Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. *J Am Oil Chem Soc*, 70 : 595-600.
69. CHAN HWS, CHEN JS, YEN GC (1994). Cholesterol oxidation products in small sun-dried fish. *Food Chem*, 50 : 167-70.
70. LI N, OHSHIMA T, SHOZEN KI, USHIO H, KOIZUMI C (1994). Effects of the degree of unsaturation of coexisting triacylglycerols on cholesterol oxidation. *J Am Oil Chem Soc*, 71 : 623-7.
71. LUND E, BJÖRKHEM I (1995). Role of oxysterols in the regulation of cholesterol homeostasis: a critical evaluation. *Acc Chem Res*, 28 : 241-9
72. IMAI H, WERTHESSEN NT, TAYLOR B, LEE KT (1976). Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Arch Pathol Lab Med*, 100 : 565-71.
73. TAYLOR B, PENG SK, WERTHESSEN NT, THAM P, LEE KT (1979). Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am J Clin Nutr*, 32 : 40-57.
74. MAZIÈRE JC, SALMON S, SANTUS R, REYFTANN JP, MORLIÈRE P, MAZIÈRE C, CANDIDE C, GOLDSTEIN S, DUBERTRET L, POLONOVSKI J (1988). L'oxydation des lipides des lipoprotéines de basse densité et ses conséquences sur la physiologie cellulaire. In : *Activités biologiques des oxystérols*. JP Beck, A Crastes de Paulet eds. Colloque Inserm, Paris. London : 166 : 63-76.
75. ADDIS PB, PARK PSW (1992). Cholesterol oxide content of foods. In : *Biological effects of cholesterol oxides*, SK Peng, RJ Morin, eds. Boca Raton, Ann Arbor, CRC Press, London : 71-88.
76. BASCOUL J, DOMERGUE N, OLLE M, CRASTES DE PAULET A (1986). Autoxidation of cholesterol in tallows heated under deep frying conditions: evaluation of oxysterols by GLC and TLC-FID. *Lipids*, 21 : 383-7.
77. RANKIN SA, PIKE OA (1993). Cholesterol autoxidation inhibition varies among several natural antioxidants in aqueous model system. *J Food Sci*, 58 : 653-5.
78. PARK SW, ADDIS PB (1986). Further investigation of oxidized cholesterol derivatives in heated fats. *J Food Sci*, 51 : 1380-1.
79. YAN PS, WHITE PJ (1991). Linalyl acetate and methyl silicone effects on cholesterol and triglyceride oxidation inheated lard. *J Am Oil Chem Soc*, 68 : 763-8.
80. HUBER KC, PIKE OA, HUBER CS (1995). Antioxidant inhibition of cholesterol oxidation in spray-dried food system during accelerated storage. *J Food Sci*, 60 : 909-12,16.