



HAL
open science

Nutritional and sanitary impact of nuts and seeds roasting: the interest of using fluorescence spectroscopy as a tool to control neoformed compounds

Rita Yaacoub

► **To cite this version:**

Rita Yaacoub. Nutritional and sanitary impact of nuts and seeds roasting: the interest of using fluorescence spectroscopy as a tool to control neoformed compounds. Chemical Sciences. AgroParisTech, 2009. English. NNT : 2009AGPT0048 . pastel-00005932

HAL Id: pastel-00005932

<https://pastel.hal.science/pastel-00005932>

Submitted on 14 Apr 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Chimie Analytique

*présentée et soutenue publiquement
par*

Rita YAACOUB

le 25 septembre 2009

**IMPACT NUTRITIONNEL ET SANITAIRE DE LA TORRÉFACTION DES
FRUITS ET GRAINES OLÉAGINEUX**

**INTÉRÊT DE LA FLUORESCENCE COMME OUTIL DE CONTROLE DES COMPOSÉS
NÉOFORMÉS**

Directeur de thèse : Inès BIRLOUEZ-ARAGON

Codirecteur de thèse : Rachad SALIBA

Travail réalisé : AgroParisTech, UMR214 Laboratoire de chimie analytique, F-75231 Paris Cedex 05

Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, F-60026 Beauvais

Commission Libanaise d'Energie Atomique, CNRS, BP 11-8381 Beyrouth, Liban

Devant le jury :

Mme Inès BIRLOUEZ-ARAGON, Directrice, **SPECTRALYS Innovation...**
Mme Claude GENOT, Directeur de recherche, **INRA**
M. Jean-Pierre PAIN, Professeur, **Université Montpellier 2**
M. Gérard PASCAL, Directeur de recherche honoraire, **INRA**
M. Bertrand HEYD, Maître de conférences, **AgroParisTech**

Directeur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Dédicace

A mon mari qui n'a jamais cessé de croire en moi

Source d'amour et de tendresse

Sans toi cette thèse n'aurait jamais vu le jour...

Remerciements

Je tiens avant tout à adresser mes plus sincères remerciements à Monsieur Mouïin Hamzé, Secrétaire Général du CNRSL, et à l'Agence Universitaire de la Francophonie (Bureau Moyen-Orient) qui m'ont accordé le financement nécessaire pour préparer cette thèse de doctorat.

Saurai-je trouver les mots pour manifester toute ma gratitude à Madame Inès Birlouez-Aragon qui fût un parfait directeur de thèse, toujours prête à partager son savoir et ses qualités scientifiques, mais aussi humaines. Son support et ses précieux conseils m'ont toujours redonné le courage dans les moments les plus difficiles. Un grand Merci pour la confiance qu'elle m'a accordée et de m'avoir introduit dans le monde des « Néoformés ».

Je tiens à dire un grand Merci à Monsieur Rachad Saliba qui a codirigé ma thèse avec plein de sagesse, de générosité et de gentillesse. Je le remercie sincèrement d'avoir cru en moi et de la confiance qu'il me témoigne toujours.

J'exprime ma reconnaissance à Madame Claude Genot et Monsieur Jean-Pierre Pain qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement Monsieur Christian Ducauze, ancien directeur du laboratoire de chimie analytique de l'AgroParisTech, pour avoir participé au démarrage de cette thèse, son accueil chaleureux à l'AgroParisTech, et ses discussions toujours enrichissantes.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Douglas Rutledge, directeur du laboratoire de chimie analytique de l'AgroParisTech, et Monsieur Thierry Aussenac, directeur de la Plateforme de Chimie Analytique et de Biologie Moléculaire de l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires respectifs.

Je remercie également Monsieur Bilal Nsouli, directeur de la Commission Libanaise d'Energie Atomique (CLEA) du CNRSL et Monsieur Farouk Jaber, chercheur à la CLEA, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires.

Je remercie vivement Monsieur Gaby Khalaf, directeur du Centre National des Sciences Marines du CNRSL, pour sa disponibilité et son soutien pendant toutes les étapes de la thèse.

Je remercie Madame Florence Lacoste, Monsieur Philippe Verger, Madame Dalal Aoude-Werner et Monsieur Gérard Pascal pour leurs judicieux conseils scientifiques.

Je remercie chaleureusement Madame Lara Nasreddine pour son support, ses encouragements, et nos discussions au quotidien.

Je remercie également les industriels qui ont accepté de m'accueillir au sein de leurs établissements et me fournir les échantillons nécessaires.

Un immense merci à Maya et Aline dont l'amitié a été d'un grand soutien, et à Ghenwa et Afif, sans qui le séjour à Beauvais n'aurait jamais été aussi agréable.

Un merci du cœur à tous mes collègues, Lamia et Lyes, pour vos discussions intéressantes, Jad, pour ton support « chimiométrique » et ton amitié, et surtout Gisèle, pour qui je garde des souvenirs inoubliables.

A tous mes amis qui ont partagé les bons et les moins bons moments, tout au long de cette thèse, je vous remercie.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir permis de réaliser mes longues études et pour tous leurs sacrifices consentis. Sans vous, je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout.

Un merci à vous, mes chères sœurs, pour vos encouragements et votre soutien, souvent discret, mais toujours efficace.

Enfin, à mon mari, Tony, pour avoir vécu au rythme de ma thèse, pour avoir été si patient, et m'avoir soutenue dans les moments de découragement, merci.

Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux : intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés.

Résumé

Trois objectifs principaux ont été fixés pour cette thèse : un objectif technologique, analytique, et d'analyse des risques.

Un premier objectif de cette étude était d'identifier les étapes critiques du procédé de transformation des noix et graines, afin de pouvoir par la suite proposer des solutions permettant de limiter le développement des réactions de Maillard et d'oxydation des lipides, ainsi que leur dégradation nutritionnelle. Pour ce faire, la formation des composés issus de ces réactions a été suivie au cours de la transformation des noix et graines en tenant compte de l'impact de la qualité de la matière première. La dégradation de certains nutriments thermolabiles, indicateurs de la sévérité du traitement thermique appliqué, a été aussi suivie au cours de la transformation industrielle afin d'appréhender l'influence du traitement thermique sur la qualité nutritionnelle de ces aliments. Les résultats montrent que les réactions d'oxydation des lipides sont amorcées dès les premières étapes de transformation et s'amplifient par la suite. Plusieurs étapes du procédé sont impliquées dans le développement des réactions d'oxydation et la dégradation nutritionnelle, cependant l'étape de torréfaction se révèle particulièrement déterminante dans la formation des CNF. L'étape de stérilisation de la tahina semble avoir aussi un effet significatif sur l'accumulation des produits d'oxydation et des CNF. Suite à ce criblage des étapes critiques, des modifications techniques doivent être apportées à la chaîne de transformation afin de l'optimiser, sans compromettre la salubrité et les qualités organoleptiques du produit fini.

Un deuxième objectif était d'explorer le potentiel de la spectroscopie de fluorescence frontale comme outil d'évaluation quantitative rapide de la qualité des noix et graines, dans l'objectif d'améliorer le contrôle et la maîtrise de la sécurité chimique de ces aliments transformés. L'analyse multivoies des mesures de fluorescence frontale en 3D sur des échantillons industriels de noix et graines a révélé une information détaillée sur l'oxydation des lipides et la formation de CNF, ainsi que leur dégradation nutritionnelle, au cours de leur transformation industrielle. L'identification des fluorophores intrinsèques s'est rendue possible grâce à l'approche multivoies des données. Des modèles de calibration multivoies ont été développés afin de prédire les concentrations en CNF à partir de simples mesures de fluorescence, et ont donné des résultats très prometteurs. Ces méthodes pourraient être très intéressantes dans une perspective de contrôle en ligne, du fait de leur rapidité et leur non-destructivité.

Enfin, l'évaluation de l'exposition des libanais adultes à ces CNF à partir des noix et graines transformées a été réalisée en croisant les données de consommation alimentaire obtenues par le biais d'une enquête de consommation alimentaire exécutée dans le cadre de cette recherche sur une population urbaine adulte âgée entre 25 et 64 ans, avec les données de contamination obtenues par les analyses chimiques. Les expositions quotidiennes moyennes à la CML et aux AGT, suite à la consommation de l'ensemble des oléagineux étudiés, ont été estimées à 0,76 mg/personne/jour et 0,32 g/personne/jour respectivement. Ces niveaux correspondent à 13 et 7% des valeurs de références pour la CML et les AGT respectivement, susceptibles d'induire des effets néfastes. Au percentile 95^{ème} de l'exposition, les valeurs d'exposition à la CML par la seule consommation des oléagineux dépassent la valeur limite. Ces résultats montrent qu'il est nécessaire de porter une attention particulière à l'exposition de certains groupes de population tels que les forts consommateurs pour lesquels le risque d'être exposés à un niveau supérieur aux valeurs toxicologiques de référence vis-à-vis des CNF étudiés n'est pas nul, sachant qu'aux noix et graines transformées vient s'ajouter une liste non négligeable d'aliments contributeurs à l'exposition aux CNF.

Mots clés

Noix et graines, Torréfaction, Oxydation des lipides, Réaction de Maillard, Composés néoformés, Carboxymethyllysine, Acides gras *trans*, Fluorescence frontale, Evaluation de l'exposition alimentaire.

Nutritional and sanitary impact of nuts and seeds roasting: the interest of using fluorescence spectroscopy as a tool to control Neoformed Compounds.

Abstract

Three main objectives were fixed for this thesis: technological, analytical, and risk analysis objectives.

A first objective was to identify critical points of the production chain in terms of the development of oxidation and Maillard reactions, in order to be able to suggest technological solutions to minimize nutritional degradation and accumulation of NFC at these production steps. For this, pertinent indicators of these reactions were monitored throughout the processing stages of nuts and sesame seeds taking into account the quality impact of the raw material. The results showed that, initiated during storage and first stages of nuts and sesame seed processing, lipid oxidation proceeded with processing. Even though several processing stages were involved in the development and amplification of these reactions, roasting appears as a crucial step in the formation of NFC and in defining product nutritional quality. The sterilization step, specifically designed to ensure microbiological safety of the product, contributed also to final NFC load. As a result, the production line should be optimized, particularly roasting conditions and sterilization technology, without compromising microbiological safety and organoleptic quality of the end-product.

A second objective aimed at investigating the potential of using front face fluorescence spectroscopy for rapid quantitative estimation of NFC in order to control and improve chemical safety of processed nuts and seeds. To achieve this objective, chemometric analysis of front face fluorescence landscapes obtained from EEM (excitation-emission matrices) acquisition and calibration over the conventionally measured NFC content in industrial samples was applied. The fluorometric analysis revealed detailed information about the molecular changes occurring in these food products when exposed to heat treatment. PARAFAC decomposition models allowed identification of the major parallel profiles forming the front face fluorescence landscape of these products. Results showed that front-face fluorescence is an appropriate tool for monitoring lipid oxidation and nutritional degradation, and that through multiway decomposition of front face fluorescence data coupled with multivariate regression tools, industrial process control and satisfactory NFC calibration models can be achieved.

Finally, the actual intake of CML and tFA for an urban adult population (aged 25–64 years) living in Beirut, Lebanon, through the consumption of processed nuts and sesame seed products was estimated. Dietary exposure was obtained by combining food consumption data with CML and tFA levels determined by chemical analysis, and then compared to the levels of concern for each molecule. The estimated average daily exposure to CML and tFA through overall nut and sesame seed products consumption was found to be about 0.76 mg/person/day and 0.32 g/person/day respectively. When compared with levels of concern selected for this study (6 mg/day for CML and 5 g/day for tFA), the average dietary intakes of CML and tFA represented 13 and 7% respectively of the appropriate levels of concern. At the 95th percentile, CML exposure estimates from the only consumption of processed nuts and sesame seeds exceeded the level of concern. The results indicate a potential risk for the high consumers of roasted nuts and sesame seeds and suggest the necessity for a more detailed investigation of exposure to NFC.

Keywords

Nuts and seeds, Roasting, Lipid oxidation, Maillard reaction, Neofomed compounds, Carboxymethyllysine, *Trans* fatty acids, Front face fluorescence, Food exposure assessment.

Avant propos

Ce projet de thèse se situe dans le contexte d'une thématique développée actuellement au niveau international, et visant à répondre aux besoins émergents des industries agroalimentaires de satisfaire aux demandes croissantes du consommateur pour un produit sain. Au niveau de l'industrie agroalimentaire, le problème majeur émane des traitements thermiques sévères, qui ont lieu essentiellement au cours des procédés de torréfaction, stérilisation ou de cuisson. Si les traitements thermiques présentent des effets bénéfiques, tant au point de vue nutritionnel (augmentation de la digestibilité de l'amidon et des protéines) qu'au point de vue toxicologique (destruction des germes et de nombreux facteurs antinutritionnels), ils ont également des conséquences défavorables à ces deux points de vue. Au point de vue nutritionnel, ils peuvent éliminer ou détruire des éléments indispensables. Au point de vue toxicologique, ils peuvent faire apparaître des composés nouveaux, appelés composés néoformés, suspects de toxicité à long terme chez l'homme. Il est évident que les PME libanaises ne sont pas encore préparées pour faire face à ce type de problème. Elles ont besoin d'être informées sur l'impact des ingrédients, de la formulation, de la préparation et des différentes étapes de la chaîne de production sur la qualité et la sécurité de leurs produits alimentaires. Pour cela, elles ont aussi besoin de disposer d'outils analytiques adaptés pour une évaluation rapide de la qualité, et de solutions technologiques possibles pour faire face à ce problème éventuel de qualité et de sécurité des aliments.

L'impact attendu de ce travail est de mieux préparer les industries alimentaires à se conformer aux régulations et normes actuelles et futures concernant les CNF en augmentant leurs connaissances dans ce domaine. Cette préparation des PME suppose i) le développement et la validation de méthodes de mesures rapides, fiables et efficaces permettant de contrôler le niveau des néoformés dans les produits alimentaires et 2) de caractériser et évaluer l'impact des différents procédés étudiés sur le niveau de formation des CNF afin de mieux les maîtriser.

Parallèlement, des analyses de risque doivent être conduites, nécessitant de quantifier au préalable le niveau d'exposition à ces molécules et le danger lié à leur ingestion.

Deux sous-secteurs alimentaires ont été étudiés dans le cadre de cette thèse: les noix et graines grillées et les produits des graines de sésame (tahina).

Ce projet est interdisciplinaire puisqu'il nécessite une approche analytique, technologique et d'analyse des risques. Il sera un point de départ pour de futures recherches touchant d'autres secteurs de l'industrie alimentaire. La totalité de l'industrie agroalimentaire serait alors informée sur la contribution de chaque sous-secteur alimentaire dans l'exposition finale aux CNF.

Ce travail a été réalisé aux laboratoires de Chimie Analytique de l'AgroParisTech (Paris), de la plateforme de Chimie Analytique et de Biologie Moléculaire de l'Institut Polytechnique Lasalle Beauvais, et de la Commission Libanaise d'Énergie Atomique rattachée au CNRS du Liban.

Le financement de cette thèse a été assuré par le Conseil National de Recherche Scientifique du Liban (CNRSL) et l'Agence Universitaire de Francophonie (Bureau Moyen-Orient).

Les résultats obtenus ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publication dans des revues à comité de lecture:

Article 1

Yaacoub, R., Saliba, R., Nsouli, B., Khalaf, G. Birlouez-Aragon, I. **2008**. Formation of lipid oxidation and isomerization products during processing of nuts and sesame seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 7082-7090.

Article II

Yaacoub, R., Saliba, R., Nsouli, B., Khalaf, Rizkallah, J., G. Birlouez-Aragon, I. **2009**. Rapid assessment of neoformed compounds in nuts and sesame seeds by front-face fluorescence. *Food Chemistry*, **115**, 304-312.

Article III

Yaacoub, R., Saliba, R., Nsouli, B., Khalaf, G. Birlouez-Aragon, I. (submitted). Nutritional degradation of nuts and sesame seeds during industrial processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.

Article IV

Yaacoub, R., Saliba, R., Nsouli, B., Khalaf, G, Birlouez-Aragon, I. (submitted). Dietary exposure to Neoformed compounds of an adult urban population in Lebanon through consumption of processed nuts and sesame seeds. *Molecular Nutrition and Food Research*.

Communications orales:

Yaacoub, R. "Neoformed contaminants in nuts and oil seeds: impact of roasting and contamination levels". In Proceedings of the 7th workshop of COST Action 927 on Thermally processed food: possible health implications. Ebersberg, Germany, September 2007, pp. 17.

Preface

This project is anchored to an internationally developed theme concerning food safety, which aims at answering emerging needs of the SMEs in the agro-food industry for responding to the consumer demand of a safe food product. At the scale of the agro-food industry, the main problem arises from treatments at high temperatures, either for sterilization or for cooking purposes, leading to the formation of toxic and carcinogenic compounds, collectively named Neoformed Compounds. There is evidence that Lebanese SMEs are poorly prepared to face such problems. They need to better understand the impact of the ingredients, formulation, preparation and different steps of process on the quality and safety of their food products. For that purpose they need adapted tools for a rapid screening and evaluation of the quality, and possible technological solutions to face the eventual problem of quality.

On the other hand, the estimation of the risk associated with dietary intakes of such Neoformed Compounds by Lebanese is a vital and integral part of regulatory and risk management processes. Since there is a lack in such data in Lebanon, it becomes necessary to conduct exposure assessment which involves the combination of contamination data with food consumption data.

The expected impact of this project will be to prepare the Lebanese SMEs to fulfill the actual and future regulations on food quality and safety concerning heat formed substances. This preparation supposes i) to propose an adapted and rapid method for analyzing the level of contamination of the product and ii) to better manage the impact of the process operations by controlling the contamination level at each step of the process.

This project is interdisciplinary since it deals with technological, analytical, and risk analysis approaches.

Two main food sub-sectors were studied in this project: roasted nuts and sesame seeds products (tahina or sesame paste) since these products have a high unsaturated lipid content making them a potential source of heat formed substances during their processing.

For the two food sectors considered in the project, a screening of the contamination levels and the respective impact of each step of transformation of the processed food were achieved. Secondly, a method especially adapted to the industrial needs have been proposed to routinely monitor the quality of their processed food. Finally, the consumption level of these products by the Lebanese adults have been determined by means of a dietary survey in order to estimate the exposure of the Lebanese to the Neoformed Compounds derived from the concerned products.

This project will be a starting point for further researches that might extend the studies to the other food sectors. The global agro-food industry will be then informed on the respective contribution of the different food sectors in the final exposition to Neoformed compounds.

The research work presented in this thesis has been performed at the analytical chemistry laboratory of AgroParisTech, the SPECTRAL unit of the analytical chemistry and molecular biology department of the Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, and the Lebanese Atomic Energy commission laboratory of the National Council for Scientific Research of Lebanon.

This thesis was supported by a grant from the National Council for Scientific Research of Lebanon and the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

The present thesis is based on original publications, which will be included in individual chapters in the manuscript.

Liste des abréviations

λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
λ_{ex}	Longueur d'onde d'excitation
ACP	Analyse en Composantes Principales
AET	Apport énergétique total
AG	Acides gras
AGE	Advanced Glycation End products (Produits avancés de glycation)
AGPI	Acide gras polyinsaturés
AGT	Acides gras trans
AH	Amines hétérocycliques
ALE	Advanced lipoxidation endproducts
ALS	Alternate least square (algorithme des moindres carrés alternés)
ANOVA	Analyse des Variances
A_w	Activité de l'eau
BHT	Butyl-hydroxy-toluène
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
CML	Carboxyméthylllysine
CNF	Composés néoformés
CORCONDIA	Core consistency diagnosis
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
EEM	Excitation emission matrix
FAME	Fatty Acid Methyl Esters
FID	Détecteur à Ionisation de Flamme
FOX	Ferrous Oxidation Xylenol orange
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HMF	5-hydroxyméthylfurfural
HNE	Hydroxynonenal
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HR	Humidité relative
LDL	Low-density Lipoprotein
LMR	Limites maximales résiduelles
LV	Latent variables

MCV	Maladies cardiovasculaires
MDA	Malondialdehyde
MEE	Matrices d'excitation et d'émission
MH	Matière Humide
MLR	Multiple linear regression
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (ou MS2)
NFC	Neoformed compounds
OSC	Orthogonal signal correction
PARAFAC	Parallel factor analysis
p-AV	p-Anisidine Value
PLS	Partial least square (Régression au sens des moindres carrés partiels)
PME	Petites et moyennes entreprises
PRM	Produits de la réaction de Maillard
R²	Coefficient de corrélation au carré
RAGEs	Récepteurs des produits avancés de glycation
RLM	Régression linéaire multiple
ROOH	Hydroperoxydes
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration (Erreur quadratique moyenne d'étalonnage)
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross-Validation (Erreur quadratique moyenne de validation croisée)
SME	Small and medium enterprises
SNV	Standard Normal Variate
sr-TBA	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TBA	Acide Thiobarbiturique
TMA	Taux d'utilisation maximaux autorisés
UV	Ultra-Violet
Vit E	Vitamine E

Liste des tableaux

Tableau 1. Niveau des importations et exportations des amandes au Liban (d'après la Chambre de Commerce, d'Industrie et d'Agriculture).	34
Tableau 2. Niveau des importations et d'exportations des pistaches au Liban (d'après la Chambre de Commerce, d'Industrie et d'Agriculture).	35
Tableau 3. Composition nutritionnelle des noix et graines crues ou grillées (D'après l'USDA).	38
Tableau 4. Teneurs en tocophérols, squalène et phytostérols exprimées en mg/100g de lipides de certains fruits oléagineux.....	44
Tableau 5. Tableau récapitulant les principaux polyphénols des noix et graines	45
Tableau 6. Changements affectant les sucres au cours de la torréfaction des graines et noix.	50
Tableau 7. Changements affectant les acides aminés libres au cours de la torréfaction des graines et noix.	51
Tableau 8. Indices de qualité du produit fini de tahina d'après LIBNOR	55
Tableau 9. Composition nutritionnelle de la tahina (d'après Sawaya et al., 1985).....	57
Tableau 10. Groupements réactifs des produits d'oxydation des lipides et des protéines intervenant dans les réactions d'interaction lipides-protéines (d'après Pokorny, 1977).....	68
Tableau 11. Synthèse des données de contamination des différents aliments par l'acrylamide entre 2002 et 2004 (D'après Leblanc, 2005).....	97
Tableau 12. Caractéristiques de certains fluorophores intrinsèques dans les aliments (d'après Albani, 2001 ; Christensen, 2005 ; Lakowicz, 1999 ; Ramanujam, 2000).	116
Tableau 13. Comparaison des différentes méthodes d'évaluation de l'exposition alimentaire.	122
Tableau 14. Etude de consommation alimentaire - comparaison entre les différentes méthodes.....	128
Tableau 15. Synthèse des données de consommation des AG <i>trans</i> en g/jour de l'étude TRANSFAIR en Europe (d'après Hulshof et al., 1999).	132
Tableau 16. Synthèse des données de consommation des AGT dans les principaux pays industrialisés.....	133

Liste des figures

Figure 1. Part des pays dans l'exportation mondiale des noix (arachide exclu) en 2003 (d'après Global Atlas Trade).....	32
Figure 2. Part des différents types de noix dans l'exportation mondiale des noix en 2003 (d'après Global Atlas Trade).....	32
Figure 3. Production mondiale d'amandes (d'après la FAO).	33
Figure 4. Production mondiale d'arachides (d'après l'USDA).....	35
Figure 5. Production mondiale de pistaches (d'après la FAO).	36
Figure 6. Effet de la torréfaction sur les noix et graines.	47
Figure 7. Effet des différents facteurs sur la qualité des noix et graines torréfiées (d'après Perren et al., 1996).	48
Figure 8. Images obtenues par microscopie électronique en transmission montrant la microstructure des graines d'amandes et de noisettes avant et après torréfaction (d'après Saklar et al., 2003).....	53
Figure 9. Schéma simplifié des voies d'altération des lipides.	60
Figure 10. Schéma résumant l'autoxydation dans les aliments (d'après Nawar, 1996).....	64
Figure 11. Effet de l'activité de l'eau sur la vitesse d'oxydation des lipides (d'après Nawar, 1996).....	70
Figure 12. Schématisation de la cinétique d'oxydation des acides gras insaturés.	72
Figure 13. Activité antioxydante des composés phénoliques.....	73
Figure 14. Isoméries géométriques <i>trans</i> (à gauche) et <i>cis</i> (à droite).	76
Figure 15. Schéma de la réaction de Maillard, A : Selon Hodge (1953), B : Selon Tressl et al. (1994)	79
Figure 16. Première étape de la réaction de Maillard entre un acide aminé et un aldose.	81
Figure 17. Première étape de la réaction de Maillard entre un acide aminé et un cétose.	81
Figure 18. Les interactions connues entre les réactions de Maillard et d'oxydation des lipides (d'après Zamora et Hidalgo, 2005).	87
Figure 19. Quelques exemples de composés potentiellement cancérigènes formés par chauffage et cuisson d'aliments.	89
Figure 20. Formation des hétérocycles dans les aliments par réaction de Maillard (d'après Fernandez et al., 2002).	93
Figure 21. Principaux composés dicarbonylés produits par la réaction de Maillard (d'après Wong et Shibamoto, 1996).....	94
Figure 22. Les différentes voies possibles de formation de la CML (d'après Thorpe et Baynes, 2002).....	100
Figure 23. Principe de la fluorescence (Diagramme de Jablonski).	109
Figure 24. Recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur.	110
Figure 25. Matrice d'excitation et d'émission de l'eau pure, montrant les diffusions de Rayleigh et de Raman (d'après Rinnan, 2004).	111
Figure 26. Schéma de principe d'un spectrofluorimètre.	112
Figure 27. Schémas des principes de la fluorescence à angle droit et de la fluorescence frontale (d'après Dufour et Frenchia, 2001).....	115
Figure 28. Formation de produits fluorescents à base de lipides insaturés (d'après Yin, 1996).	119
Figure 29. Schéma du principe de la décomposition trilineaire PARAFAC utilisant 2 facteurs.	156

Sommaire

<i>Dédicace</i>	2
Remerciements	3
Résumé	6
Mots clés	7
Abstract	9
Keywords	10
Avant propos	11
Preface	13
Liste des abréviations	14
Liste des tableaux	16
Liste des figures	17
Sommaire	18
INTRODUCTION	22
PARTIE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	30
CHAPITRE 1. Les fruits et graines oléagineux	31
I. Origines, production et contexte économique des noix et graines	31
II. Composition des noix et graines	37
III. Intérêt nutritionnel de la consommation des noix et graines : leurs bienfaits pour la santé	39
III.1. Noix et santé cardiovasculaire.....	40
III.2. Les lignanes du sésame	43
IV. Procédés de transformation industrielle des noix et graines	46
IV.1. Torréfaction des noix et graines	46
IV.1.1 Impact de la torréfaction sur le développement de la couleur.....	48
IV.1.2 Impact de la torréfaction sur le développement de la saveur	50
IV.1.3 Impact de la torréfaction sur l'oxydation des lipides	51
IV.2. Procédé de transformation industrielle du sésame en tahina.....	53
V. Conclusions	58
CHAPITRE 2. Réactions d'altération à l'origine de la formation des composés néoformés – Impact sur la qualité nutritionnelle et la sécurité alimentaire des noix et graines	59
I. Les altérations des lipides des noix et graines.....	59
I.1. La lipolyse	60
I.2. L'oxydation des lipides	61
I.2.1 L'oxydation enzymatique.....	61
I.2.2 L'auto-oxydation.....	62
I.2.2.1 Mécanisme réactionnel de l'oxydation (d'après Bolland et Gee, 1946)	62
I.2.2.2 Produits formés au cours de l'oxydation des lipides.....	65
I.2.2.3 Les initiateurs de l'oxydation des lipides	68
I.2.2.4 Nature et mode d'action des antioxydants	72
I.3. L'isomérisation <i>trans</i> des lipides	76
II. La réaction de Maillard	77
II.1. Les grandes étapes de la réaction	80
II.2. Les facteurs influents	83

III.	Interaction entre réaction d'oxydation lipidique et réaction de Maillard.....	85
III.1.	Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'oxydation des lipides	86
III.2.	Rôle des produits de l'oxydation des lipides dans la réaction de Maillard	86
III.3.	L'existence d'intermédiaires communs aux deux réactions	86
IV.	Impact des réactions d'oxydation lipidique et de Maillard sur la qualité nutritionnelle des noix et graines	87
V.	Impact des composés néoformés sur la sécurité alimentaire – toxicité des composés néoformés.....	88
V.1.	Les produits générés dans les matrices alimentaires lors d'un chauffage à haute température.....	88
V.2.	Toxicité et effets physiologiques des composés néoformés.....	91
V.2.1	La toxicité des produits de la réaction de Maillard (PRM).....	91
V.2.1.1	Effets immunologiques et toxicologiques des produits de Maillard	91
V.2.2	La toxicité des produits d'oxydation et d'isomérisation des lipides	101
V.2.2.1	Les produits d'oxydation lipidique	101
V.2.2.2	Les acides gras <i>trans</i>	103
V.2.2.3	Les oxyphytostérols.....	104
V.2.2.4	Conclusion sur la toxicité des composés néoformés	105
VI.	Conclusions	106

CHAPITRE 3. Intérêt de la fluorescence frontale comme méthode alternative pour la caractérisation de la qualité des noix et graines transformées.....	107
I. Principe de la fluorescence.....	107
II. Phénomènes parasites en fluorimétrie.....	109
III. Instrumentation, mesures, intérêts et limites	111
IV. La fluorescence intrinsèque des aliments.....	115
V. La fluorescence comme outil pour la caractérisation et le suivi de la qualité.....	116
V.1. La fluorescence comme outil d'enregistrement d'empreintes digitales du produit .	116
V.2. La fluorescence comme outil de suivi et d'évaluation de la dégradation des aliments et des CNF issus de cette dégradation	117
V.2.1 Fluorescence des produits de peroxydation	118
V.2.2 Fluorescence des produits de Maillard.....	119
VI. Conclusions	120

CHAPITRE 4. Evaluation de l'exposition au risque alimentaire	121
I. Données de contamination	122
I.1. L'échantillonnage.....	122
I.2. Choix de la méthode analytique.....	123
II. Recueil des données de consommation alimentaire	124
III. Méthodes d'intégration des données de consommation alimentaire et des données de contamination : modélisation de l'exposition au danger alimentaire	129
III.1. Approche déterministe	129
III.2. Simple distribution de l'exposition	130
III.3. Approche probabiliste	130
IV. Données existantes sur l'exposition aux composés néoformés.....	131
IV.1. Données sur les acides gras <i>trans</i>	132
IV.2. Données sur l'acrylamide.....	133
V. Conclusions	134

PARTIE II. MATERIEL ET METHODES	136
CHAPITRE 1. Collecte des échantillons	137
CHAPITRE 2. Méthodes analytiques.....	138
I. Analyses biochimiques.....	138
I.1. Détermination de la teneur en eau.....	138
I.2. Détermination de la teneur en lipides totaux.....	138
I.3. Détermination de la teneur en protéines.....	139
I.4. Dosage des polyphénols totaux	139
I.5. Dosage des tocophérols	140
II. Détermination du degré d'oxydation des lipides.....	141
II.1. Produits primaires de l'oxydation des lipides	141
II.1.1 Dosage des hydroperoxydes.....	141
II.2. Produits secondaires de l'oxydation des lipides.....	142
II.2.1 Dosage des aldéhydes par l'indice de p-anisidine.....	142
II.2.2 Dosage des substances réactives l'acide thiobarbiturique (sr-TBA).....	143
III. Dosage des composés néoformés.....	144
III.1. Analyse du profil d'acides gras et dosage des AGT par CPG	144
III.2. Dosage de la CML par CPG couplée à la spectrométrie de masse	147
IV. Méthodes spectrales	149
IV.1. Fonctionnement d'un spectrofluorimètre	149
IV.2. Appareillage utilisé	149
IV.3. Acquisition des matrices d'excitation-émission de fluorescence.....	150
IV.4. Prétraitement des données spectrales	150
IV.4.1 Correction de la diffusion.....	150
IV.4.2 Amélioration du signal	151
CHAPITRE 3. Méthodes chimiométriques.....	154
I. Analyse des mélange – Cas de la décomposition PARAFAC	154
II. Méthodes prédictives.....	158
CHAPITRE 4. Enquête de consommation alimentaire	163
I. Objectif de l'enquête	163
II. Champ de l'enquête et unités statistiques	163
III. Le questionnaire	164
IV. L'élaboration d'une typologie des consommateurs	165
IV.1. Analyse en Composantes Principales (ACP)	166
IV.2. Constitution et description des classes par Classification Ascendante Hiérarchique	
PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	169
CHAPITRE 1. Suivi de l'oxydation lipidique et la formation des NFC au cours de la transformation industrielle des noix et graines – Détermination des étapes critiques	170
Article I	170
CHAPITRE 2. Etude de l'impact du procédé industriel de transformation des noix et graines sur leur qualité nutritionnelle.....	195
Article II	195

CHAPITRE 3. Evaluation de l'intérêt de la fluorescence frontale comme outil rapide de suivi de la qualité des noix et graines – prédiction des composés néoformés	216
Article III.....	216
CHAPITRE 4. Evaluation de l'exposition aux composés néoformés via la consommation des noix et graines transformés – Niveaux de contamination des produits de commerce – Modalités des consommations	239
Article IV.....	239
PARTIE IV. DISCUSSION, CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS GENERALES	261
BIBLIOGRAPHIE	285
ANNEXES	322

INTRODUCTION

Au Liban, l'industrie agro-alimentaire est le deuxième secteur industriel le plus important représentant 20% des entreprises industrielles et contribuant à 26 % du Produit Intérieur Brut (Tomasin et Trifiro, 2002). Les produits alimentaires constituent donc un secteur important de l'économie représentant 14 % de l'ensemble des exportations. D'après le ministère de l'industrie, 824 nouvelles usines ont été créées en 2002, contre 599 en 2001. Au total, 4000 usines sont présentes, dont une quarantaine sont spécialisées dans la production de tahina (pâte de sésame) et une vingtaine dans la torréfaction des noix et graines. Certaines de ces usines sont équipées de lignes de fabrication très sophistiquées, d'autres utilisent encore les procédés traditionnels. Cependant les principes de base du procédé de fabrication restent les mêmes. La production locale de tahina et des noix et graines torréfiées suffit le marché libanais et une bonne partie est destinée à l'exportation, ce qui constitue une obligation aux industriels pour contrôler les qualités sanitaire et organoleptique du produit.

Par ailleurs, ces graines et fruits oléagineux occupent une place importante dans le régime alimentaire libanais. Ils entrent dans la composition de plusieurs plats (hors d'œuvre et pâtisseries libanaises), et sont perçus comme étant des produits traditionnels (surtout tahina) faisant par conséquent partie des habitudes alimentaires des Libanais. Ils constituent une source concentrée d'acides gras insaturés essentiels, de fibres et d'un certain nombre d'autres nutriments souvent négligés dans les régimes alimentaires modernes. Les nouvelles preuves apportées par les études épidémiologiques et cliniques récentes sur l'intérêt nutritionnel que revêt la consommation de ces noix et graines, viennent ajouter à leur réputation grandissante en tant qu'aliments de haute valeur nutritionnelle. Plusieurs études épidémiologiques et cliniques associent une consommation régulière de noix et graines à divers bienfaits pour la santé tels qu'un effet hypocholestérolémiant (Mukuddem-Petersen et al., 2005), une diminution du risque de maladies cardiovasculaires (MCV) (Hu et Stampfer, 1999) et de diabète de type 2 (Lovejoy, 2005). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre de ces aliments riches en graisse, non seulement les taux de triglycérides et cholestérol n'augmentent pas mais au contraire le profil lipidique s'améliore (Hu et al., 1998). On considère que les effets bénéfiques de consommation de noix et graines observés sont dus en premier lieu à leur profil lipidique cardioprotecteur: un rapport élevé entre acides gras insaturés et saturés ; un pourcentage important d'acides gras monoinsaturés ; un pourcentage très bas d'acides gras saturés par rapport au contenu lipidique total, mais également la présence d'autres constituants bioactifs tels que fibres, cuivre et magnésium, tocophérols, et squalène, éléments

importants pour la santé cardiovasculaire (Kris-Etherton et al., 1999). De son côté, la tahina est dotée d'une valeur nutritionnelle élevée. Elle est un très riche en acides gras essentiels, surtout en linoléique (C18 :2 n-6) ainsi qu'elle est riche en antioxydants endogènes tels que le γ -tocophérol, la sésamine, la sésamoline et le sésaminol (Abou Gharbia et al., 1996). En plus, elle contient la plupart des acides aminés essentiels et certains minéraux indispensables (Sawaya et al., 1985 ; Dagher, 1991). La graine de sésame est aussi l'un des aliments qui contient le plus de lignanes (Milder et al., 2005), des composés végétaux jouant un rôle semblable à celui de l'œstrogène, offrant un large éventail d'effets bénéfiques pour la santé.

Les fruits et graines oléagineux revêtent donc aujourd'hui une bonne image santé. Pour maintenir cette image favorable, il est important pour la filière de faire la preuve de la bonne qualité nutritionnelle et sanitaire de ce type de produit.

En effet, depuis quelques années, l'assurance d'une bonne qualité et d'une sécurité totale des produits alimentaires apparaît comme une nouvelle exigence. Aujourd'hui, le consommateur est relativement bien informé sur les qualités nutritionnelle et microbiologique des aliments. En revanche, il connaît moins bien l'influence des procédés employés pour l'élaboration des produits alimentaires. Depuis plus de 60 ans, notre alimentation a fortement évolué. Nous sommes passés d'une alimentation traditionnelle élaborée à partir de produits de base issus assez directement des campagnes à une alimentation très riche en produits transformés. Cette évolution de l'offre alimentaire a été précédée par un profond changement des modes de production agroalimentaire. Or, l'impact de ces transformations sur la qualité nutritionnelle et la sécurité sanitaire des aliments se révèle être important. Parmi ces procédés, le traitement thermique semble jouer un rôle majeur dans la qualité globale des denrées alimentaires. En effet, il peut dégrader des composés d'intérêt nutritionnel comme les vitamines mais aussi générer des composés nouveaux, appelés composés néoformés. Il s'agit de composés non voulus, non souhaités, ayant potentiellement un effet indésirable pour la santé. D'une manière plus positive, le traitement thermique des aliments permet non seulement de réduire la toxicité de certains produits végétaux, d'assurer une certaine qualité microbiologique des aliments, mais aussi d'améliorer leurs qualités organoleptiques. Enfin, il peut augmenter la qualité nutritionnelle des aliments en formant de nouvelles molécules antioxydantes telles que les mélanoidines, ou en augmentant la biodisponibilité de certains micronutriments. Cependant, pendant la torréfaction des noix et graines, le produit subit un ensemble complexe de réactions chimiques comme l'oxydation, l'isomérisation *cis/trans* et la réaction de Maillard.

Le processus d'auto-oxydation met en jeu une réaction en chaîne radicalaire, qui entraîne l'oxydation des acides gras insaturés des lipides des noix et graines. Cette oxydation conduit à

une diminution de la valeur nutritionnelle par dégradation des acides gras essentiels (acide linoléique (C18:2 n-6)), des tocophérols, protecteurs de ces acides gras, qui se dégradent à une vitesse inversement proportionnelle à la vitesse d'oxydation des acides gras, et d'autres constituants nutritionnels tels que les polyphénols. En outre, elle aboutit à la formation de divers produits de décomposition qui leur confèrent vraisemblablement une certaine toxicité. Des effets mutagènes et carcinogènes sont imputables aux produits d'oxydation des lipides. Les produits d'oxydation des acides gras (peroxydes lipidiques) peuvent aboutir à des modifications du matériel génétique. Certains produits de dégradation secondaire des lipides comme le MDA ou les 4-hydroxyalcénals peuvent avoir des effets inhibiteurs sur les systèmes enzymatiques membranaires (chaîne respiratoire) et sur la synthèse protéique (Addis, 1986). L'isomérisation *cis-trans* est d'autant plus facile que l'acide gras est insaturé et que le traitement thermique est poussé (Judd et al., 1994). Une ration alimentaire qui apporterait plus que 2% de l'énergie sous forme d'acides gras *trans* (AGT) aurait un effet significatif sur le risque cardiovasculaire (Léger et Razanamahefa, 2005). En effet, les AGT augmentent le LDL-cholestérol et tendent à diminuer le HDL-cholestérol. Ils augmentent aussi les taux de lipoprotéine LDL par comparaison aux autres acides gras (Zock et Katan, 1997 ; Koletzko et Desci, 1997 ; Weggemans et al., 2004 ; Combe et al., 2000). Les acides gras *trans* pourraient aussi affecter le développement intra-utérin du fœtus (Boue et al., 2001 ; Billeaud, 2000 ; Stender et Dyerberg, 2004) et augmenter le risque de diabète type-2 (Salméron et al., 2001). De son côté, la réaction de Maillard est responsable de la majeure part du blocage de la lysine, acide-aminé limitant dans la tahina. C'est tout d'abord l'équipe scientifique d'Helen Vlassara qui a montré que la consommation d'aliments riches en produits de Maillard pouvait être préjudiciable à la santé. Depuis lors, le terme de glycotoxine a été proposé pour définir l'ensemble des produits de Maillard ingérés et potentiellement toxiques. La réaction de Maillard est considérée comme la voie majeure de formation de l'acrylamide (Grivas et al., 2002) et elle génère de nombreux autres composés suspects, comme l'hydroxyméthylfurfural (HMF), composé mutagène (Janowski et al., 2000) et la carboxyméthyllysine (CML), impliquée dans les réactions inflammatoires et auto-immunes (Vlassara et al., 2005). Récemment on a démontré lors d'une étude clinique que la CML est absorbée et biodisponible chez des enfants et des adultes sains (Birlouez-Aragon et al., 2007 ; Saavedra et al., 2008).

Toutes ces réactions génèrent un ensemble très important et très complexe de molécules. Celles-ci sont directement responsables de la production de saveurs caractéristiques des noix et graines torréfiées ; et elles participent aux transformations de ces dernières à l'échelle

macromoléculaire, comme le développement d'un brunissement et d'une texture croustillante. Ces réactions sont capitales pour le développement des qualités organoleptiques du produit et conditionnent son acceptabilité par le consommateur.

Le contrôle de la qualité des graines et fruits oléagineux transformés devra donc tenir compte de cette double exigence contradictoire, de la qualité nutritionnelle et santé et de la composante organoleptique, toutes deux dérivées des mêmes grandes réactions. A ceci vient s'ajouter une autre contrainte, celle de la salubrité microbiologique de ces produits, notamment le problème récent de la Salmonelle dans la tahina, nécessitant des barèmes thermiques suffisants pour l'éliminer. En effet, des échantillons de tahina produits au Liban et exportés vers l'Europe et l'Australie ont été détectés positifs pour la Salmonelle, ce qui a créé une crise nationale suivie d'une campagne menée par les ministères en charge, visant à détecter la source de contamination et prendre les mesures correctives adéquates. Les répercussions économiques et sociologiques qui en ont découlé ont touché le secteur entier (retrait des produits du marché, barrières à l'exportation, inquiétude du consommateur). Il s'avère donc nécessaire de trouver un compromis pour maîtriser les problèmes de sécurité chimique, microbiologique et organoleptique découlant du traitement thermique.

Pour répondre à cet enjeu, notre objectif a été de mieux comprendre l'impact du procédé de transformation des graines et fruits oléagineux sur la cinétique des réactions impliquées, d'une part dans la baisse de leur qualité nutritionnelle, et d'autre part, dans la formation de certains composés néoformés (produits d'oxydation, CML et AGT).

Etant donné la complexité des réactions mises en jeu au cours de la transformation industrielle des graines et fruits oléagineux, qui toutes contribuent à la construction de la qualité finale du produit, nous avons voulu développer une nouvelle approche analytique globale, basée sur les empreintes spectrales en fluorescence frontale. En effet, le suivi de la qualité des produits alimentaires pendant la production a souvent été analysée en employant des méthodes classiques, généralement spécifiques de chaque industrie. Ces analyses chimiques classiques sont en général longues, nécessitent parfois l'utilisation de réactifs onéreux et polluants, et ne sont utilisables que par des opérateurs qualifiés. Une méthode spectrale appropriée, telle que la spectroscopie de fluorescence en mode frontal, rend possible la réalisation de ce contrôle en quelques minutes. La mise au point d'équipements de fluorescence en mode frontal permet en effet de recueillir de manière non destructive la fluorescence sur l'échantillon sans traitement préalable. La capacité de cette méthode à contrôler et suivre l'altération des noix et graines au cours des opérations industrielles reste encore totalement inexplorée.

Par ailleurs, et d'après ce qu'on vient de voir concernant les risques de santé que peut présenter l'ingestion de ces composés néoformés, d'autres questions soulevant d'importants points de recherche peuvent aussi se dégager: Quels sont la fréquence et le niveau de présence des composés néoformés dans ces types d'aliments disponibles dans une région où les systèmes de contrôle alimentaire, des normes et des systèmes d'analyse des risques sont déficients? Et quels sont les niveaux d'exposition aux composés néoformés dans une population qui a un régime alimentaire relativement riche en fruits et graines oléagineux? En d'autres termes les composés néoformés constituent-ils un risque alimentaire pour une population d'une région type Moyen-Orient?

L'examen de ces questions nous a amenés à ancrer finalement nos recherches sur l'évaluation de l'exposition aux composés néoformés chez des adultes d'une population de la région du moyen orient: le Liban, où l'essor du secteur agro-alimentaire couplé à une déficience dans les systèmes de sécurité alimentaire et aux habitudes alimentaires locales est en faveur de la présence de ce type de risques alimentaires. Cette évaluation de l'exposition que nous avons entamée s'est faite à partir de bases scientifiques actuelles potentiellement exploitables pour l'évaluation scientifique des risques liés aux composés néoformés, et cela sans attendre le parachèvement des travaux d'évaluation scientifique du risque liés à ces molécules. On observe que globalement la prise en compte réglementaire reste faible, ce qui pose la question des niveaux de risque acceptables pour la protection des consommateurs. Jusqu'à présent la difficulté majeure était la détection et la quantification dans les denrées. Aujourd'hui, la difficulté majeure des néoformés réside dans l'évaluation des risques toxicologiques encore relativement mal connus qui peuvent leur être associés. Les progrès analytiques de détection des produits néoformés et l'évolution des technologies de fabrication renforcent et légitiment les interrogations sur l'éventuel risque sanitaire associé à la présence de ces produits dans les aliments.

Objectifs de l'étude

Deux sous-secteurs alimentaires ont été étudiés dans le cadre de cette thèse: les **noix et graines** grillées et les **produits des graines de sésame** (tahina). Ce projet de thèse se situe dans le contexte d'une thématique développée actuellement au niveau international, et visant à répondre aux besoins émergents des industries agroalimentaires de satisfaire aux demandes croissantes du consommateur pour un produit sain.

Dans cette thèse, nous avons poursuivi et répondu à 3 objectifs spécifiques :

1. Objectif technologique et amélioration des procédés

Pour les deux industries alimentaires considérées, un suivi de l'oxydation, de la formation des CNF et de la dégradation nutritionnelle tout au long de la chaîne de transformation a été réalisé. Les étapes du procédé de transformation responsables de l'amplification des réactions d'oxydation et de Maillard, ainsi que de la dégradation nutritionnelle ont été recherchées. L'objectif était alors d'identifier les étapes critiques du procédé de transformation des différents produits, afin de pouvoir proposer des solutions par des moyens techniques permettant de limiter le développement de ces réactions, donc l'optimisation de la chaîne de transformation.

Pour répondre à cet objectif, une description du procédé de transformation des produits étudiés (paramètres technologiques, notamment couple temps/température) ainsi que des prélèvements d'échantillons à différents niveaux de la chaîne de transformation depuis la matière première jusqu'au produit fini ont été réalisés. Les échantillons ont été ensuite analysés pour leur détérioration oxydative et leur niveau en CNF, et les différentes cinétiques de formation et de dégradation ont été décrites.

Les résultats répondant à ces objectifs font partie des articles I et II.

2. Objectif analytique

Un autre objectif a été de développer et valider des outils simples et rapides basés sur la fluorescence frontale, permettant à l'industriel, soucieux de garantir une qualité sanitaire satisfaisante, d'analyser, à moindre coût et très rapidement, le niveau de contamination de son produit, et de mieux maîtriser l'impact des différentes opérations de son procédé en contrôlant le niveau de contamination à chaque étape de production.

Afin de répondre à cet objectif, on a appliqué la déconvolution PARAFAC (PARAllel FACTor analysis) aux spectres de fluorescence en mode frontal enregistrés en 3D (matrices d'excitation et d'émission) pour les différents échantillons industriels. Ceci nous a permis d'identifier les différents fluorophores présents qui contribuent à la fluorescence globale de ces produits. En second lieu, des modèles de prédiction des CNF à partir du signal de fluorescence frontale au moyen de différents outils chimiométriques ont été élaborés. Un article axé autour de ces résultats (article III) a été publié.

3. Objectif analyse du risque

Un dernier objectif a été d'évaluer l'exposition alimentaire des adultes libanais aux CNF (CML et AGT) issus des noix et graines transformées.

Pour répondre à cet objectif, deux types de données ont été recueillies : des données de consommation et des données analytiques de contamination.

Dans un premier temps, une quantification des niveaux de consommation d'oléagineux par les adultes libanais a été réalisée par l'administration d'un questionnaire de fréquence ciblé sur les produits à base d'oléagineux sur un échantillon de 400 sujets adultes. Ensuite, les niveaux de CML et AGT ont été évalués dans des échantillons issus du marché libanais. Les 2 types de données ont été combinés afin d'évaluer le niveau d'exposition à ces composés.

Les résultats de cette étude font partie de l'article IV.

C'est autour de ces objectifs qu'est structuré le plan de la thèse qui comprend les parties et chapitres suivants:

Dans la **partie I**, une synthèse bibliographique est présentée, détaillant en premier lieu le contexte économique de la filière, la composition et les bienfaits nutritionnels des noix et graines, les différents procédés de transformation et leur impact sur la qualité du produit fini, les réactions mises en jeu lors de ces transformations et la toxicité des produits issus de ces réactions, ensuite les fondements de la fluorescence et son intérêt comme méthode alternative pour la caractérisation de la qualité des noix et graines, et enfin, les différentes méthodologies appliquées à l'évaluation de l'exposition au risque alimentaire.

Dans la **partie II**, les méthodes d'analyses conventionnelles utilisées dans ce travail, la préparation des échantillons et l'instrumentation utilisée sont décrites, ainsi que les méthodes chimométriques que nous avons appliquées. Sera aussi détaillée la méthode de recueil et d'analyse des données de consommation alimentaire.

Les résultats obtenus pour cette thèse sont inclus sous forme d'articles, publiés ou soumis pour publication, dans les **chapitres 1 à 4 de la partie III**. Le **chapitre 1** est consacré au suivi de l'oxydation lipidique et la formation des NFC au cours de la transformation industrielle des noix et graines (article I). Le **chapitre 2** étudie l'impact du procédé industriel sur la qualité nutritionnelle des noix et graines (article II). Le **chapitre 3** illustre l'intérêt de la fluorescence dans la caractérisation de la qualité des noix et graines transformées et dans la

prédiction des teneurs en NFC dans ces produits (article III). Le **chapitre 4** étudie les « patterns » de consommation des noix et graines transformées chez les adultes libanais, élabore une typologie des consommateurs, et estime l'exposition de ces adultes aux NFC issus de ces produits, tout en tenant compte d'un sous-groupe de population qui sont les forts consommateurs (article IV).

Enfin, tous les résultats sont récapitulés et leurs interprétations synthétisées dans une **discussion et conclusion générales** suivies de **perspectives** de recherche.

PARTIE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. Les fruits et graines oléagineux

I. Origines, production et contexte économique des noix et graines

Les noix et graines sont cultivées un peu partout dans le monde. Elles font partie intrinsèque des schémas alimentaires traditionnels dans de nombreuses régions où tant les taux de cholestérol sanguin que l'incidence des maladies cardiovasculaires sont faibles.

Au cours de l'histoire, les noix et graines ont été une denrée alimentaire essentielle dans le monde entier. Les rapports archéologiques and anthropologiques sont riches de références sur les noix et graines. Les excavations archéologiques révèlent que les noix et graines ont fait partie des régimes alimentaires mésolithiques, 10 000 ans avant J.C. Elles ont été mentionnées dans la Bible et d'autres littératures de ce temps.

Généralement, On donne le nom de noix aux fruits dont l'enveloppe dure renferme une amande. Les graines, elles, sont contenues dans le fruit de la plante et servent à la reproduction de ce dernier. De nos jours, les principales noix et graines oléagineuses sont la noix, la noisette, l'amande, la noix de cajou, la châtaigne, la pistache, l'arachide, les graines de tournesol et les graines de sésame. Les noix et les graines contiennent une grande quantité de matières grasses, souvent riches en acides gras polyinsaturés. Elles sont une excellente source de magnésium, de cuivre et de potassium, ainsi qu'une bonne source de thiamine et d'acide folique. Elles contiennent des traces de fer, de l'acide pantothénique et de la riboflavine.

Selon l'Atlas du commerce mondial, le total des exportations mondiales en 2003 des fruits oléagineux (arachide exclue) a dépassé les 3,9 billions de dollars. Actuellement, le plus gros producteur de fruits oléagineux (arachide exclue) est de loin les États-Unis, avec plus d'un tiers de la production mondiale, suivis de la Turquie (25 % de la production mondiale, principalement producteur de noisettes), la Chine (12%, principalement des noix), et l'Iran (5 %, principalement des pistaches). Les États-Unis représentent aussi le plus grand exportateur, avec 40% des exportations mondiales (Figures 1 et 2).

Selon la FAO, le Liban a exporté en 2004 environ 3811 tonnes métriques de noix élaborées (arachide exclue).

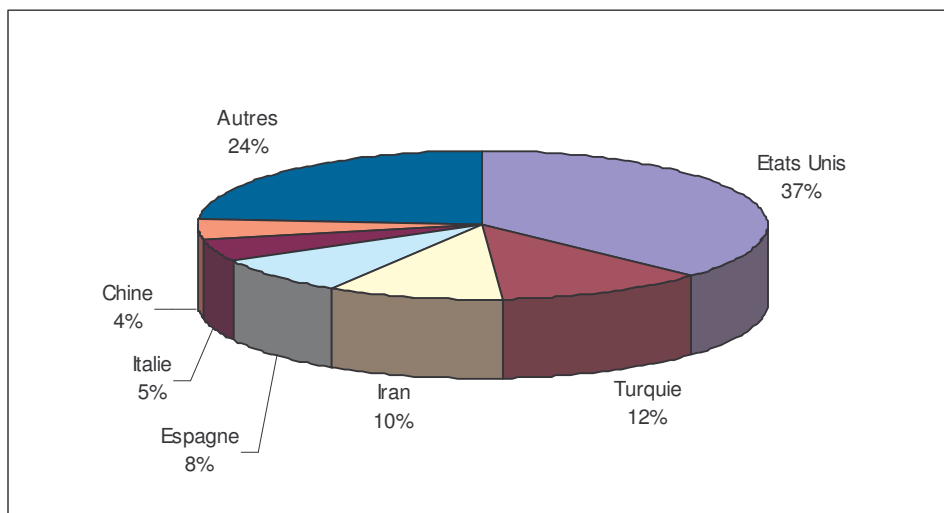


Figure 1. Part des pays dans l'exportation mondiale des noix (arachide exclu) en 2003 (d'après Global Atlas Trade).

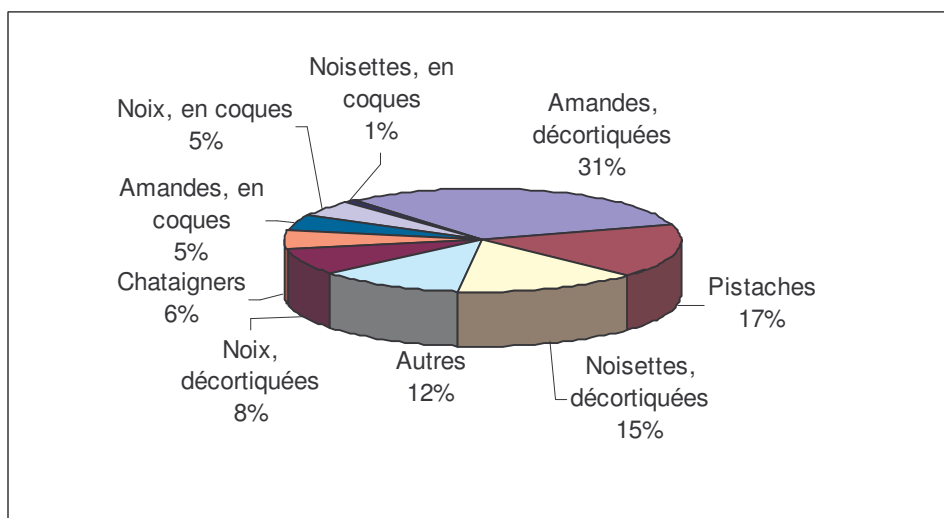


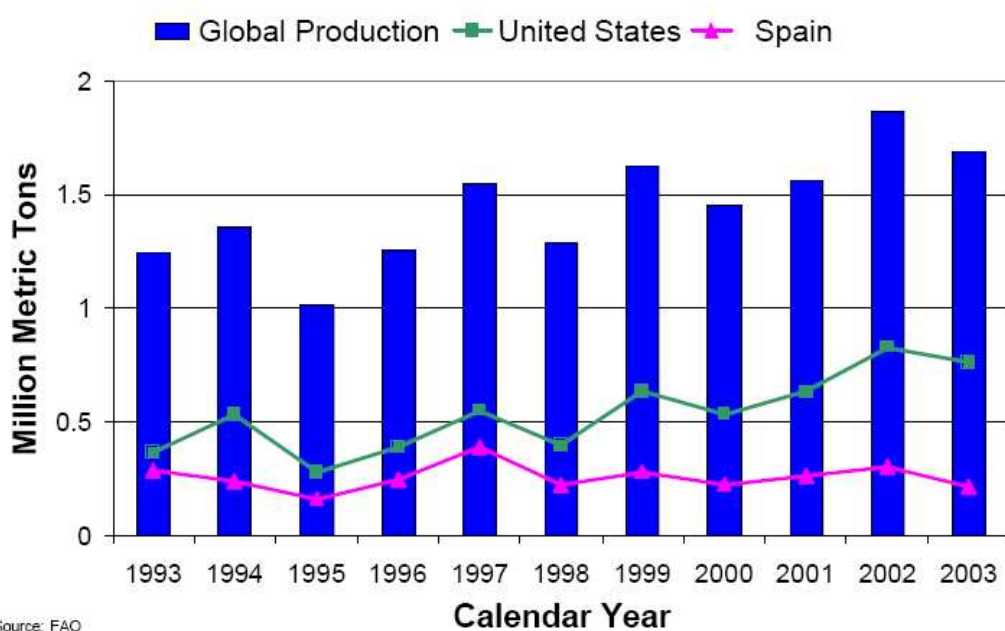
Figure 2. Part des différents types de noix dans l'exportation mondiale des noix en 2003 (d'après Global Atlas Trade).

L'amande

L'amande est le fruit de l'amandier (famille des rosacées). Il fait partie des plantes les plus anciennement cultivées. L'arbre est originaire des plateaux et des montagnes de l'Asie occidentale. Il est cultivé depuis 5 000 ou 6 000 ans en Iran. Il a été introduit en Egypte par les Hébreux et ramené en Europe par les Grecs. Les Romains rapportèrent ensuite l'amande, qu'ils appelaient "noix grecque", en Italie. L'amandier fut introduit dans le Midi de la France au Ve siècle avant Jésus-Christ, mais il ne prit son essor qu'au haut Moyen-âge. Les Arabes la propagèrent sur tout le pourtour méditerranéen, au fur et à mesure de leurs conquêtes. Au

milieu du XIXe siècle, l'amandier a été implanté aux États-Unis, devenu aujourd'hui le premier producteur mondial d'amandes, en particulier la Californie.

Environ 450 000 tonnes d'amandons (amandes décortiquées) sont produites dans le monde. La Californie en est le premier producteur mondial avec 250 000 tonnes, puis l'Espagne avec 60 000 tonnes, l'Italie avec 40 000 tonnes et la Grèce avec 16 000 tonnes (Figure 3). Parmi les autres producteurs, on trouve l'Iran, le Portugal, le Maroc, la Tunisie, Israël, la Turquie. La production de ces pays est généralement absorbée par leur consommation intérieure. Le niveau des importations et exportations des amandes au Liban pour les années 2005 à 2007, d'après la Chambre de Commerce, d'Industrie et d'Agriculture, est donné dans le Tableau 1.



Source: FAO

Figure 3. Production mondiale d'amandes (d'après la FAO).

Tableau 1. Niveau des importations et exportations des amandes au Liban (d'après la Chambre de Commerce, d'Industrie et d'Agriculture).

Année	Importations		Exportations	
	Milliers de \$	Tonnes	Milliers de \$	Tonnes
2007				
Amandes, en coques	147	225	157	108
Amandes, décortiquées	9,203	1,436	49	7
Total 2007	9,350	1,661	206	116
2006				
Amandes, en coques	368	571	56	104
Amandes, décortiquées	7665	1165	81	16
Total 2006	8,033	1,736	137	120
2005				
Amandes, en coques	884	1,584	70	70
Amandes, décortiquées	9,050	1,216	82	17
Total 2005	9,934	2,801	152	88

L'arachide

L'arachide est une plante de la famille des Fabacées (aussi appelées légumineuses) originaire du Mexique et cultivée dans les régions tropicales, sub-tropicales et tempérées pour ses graines oléagineuses. Elle présente la particularité d'enterrer ses fruits après la fécondation. Le terme désigne aussi bien le fruit (une gousse) que la graine elle-même, également appelée cacahuète.

La production mondiale d'arachides (en coques) s'est élevée à 36 millions de tonnes en 2003, dont deux pays, la Chine et l'Inde, représentent 59 % (Figure 4).

Les échanges d'arachide portent sur une faible part de la récolte : 4 millions de tonnes (année 2001), soit environ 11 % de la production, essentiellement sous forme d'arachides en coques (2,4 millions de tonnes). Les échanges de produits dérivés sont assez limités : beurre d'arachide : 49000 t, huile d'arachide : 270000 t.

Les principaux exportateurs sont la Chine (1,6 Mt), l'Argentine (0,5 Mt) et les États-Unis (0,4 Mt), les principaux importateurs les Pays-Bas (0,6 Mt), l'Indonésie (0,3 Mt), le Royaume-Uni et le Japon.

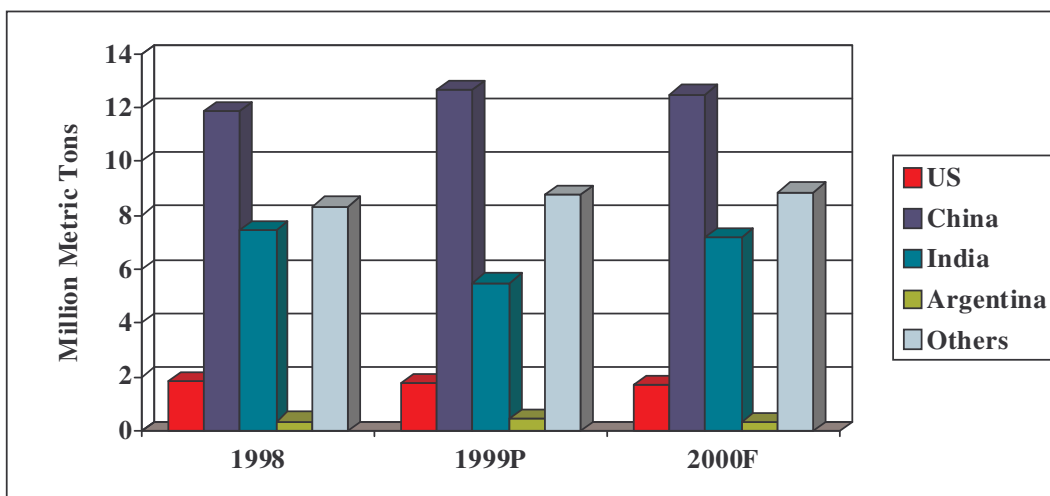


Figure 4. Production mondiale d'arachides (d'après l'USDA).

La pistache

La pistache est un fruit sec, produit par un arbuste méditerranéen, le pistachier vrai (*Pistachia vera* L.) de la famille des Anacardiacees. Cet arbre est originaire du Proche-Orient et de l'Asie centrale, plus particulièrement la Syrie, mais a été longtemps cultivé en région méditerranéenne et récemment dans le Sud des USA.

En 2005, la production mondiale d'arachides a dépassé les 500 milliers de tonnes selon la FAO. L'Iran est le principal producteur (38% de la production mondiale), suivi des États-Unis (principalement la Californie, 28%), la Turquie (12%), la Syrie (12%), la Chine (7%) et la Grèce (2%) (Figure 5). Le niveau des importations et exportations des pistaches au Liban pour les années 2005 à 2007, d'après la Chambre de Commerce, d'Industrie et d'Agriculture, est donné dans le Tableau 2.

Tableau 2. Niveau des importations et d'exportations des pistaches au Liban (d'après la Chambre de Commerce, d'Industrie et d'Agriculture).

Pistaches	Importations		Exportations	
	Milliers de \$	Tonnes	Milliers de \$	Tonnes
Total 2007	13,557	3,403	87	35
Total 2006	15,312	4,087	42	21
Total 2005	14,658	3,075	260	64

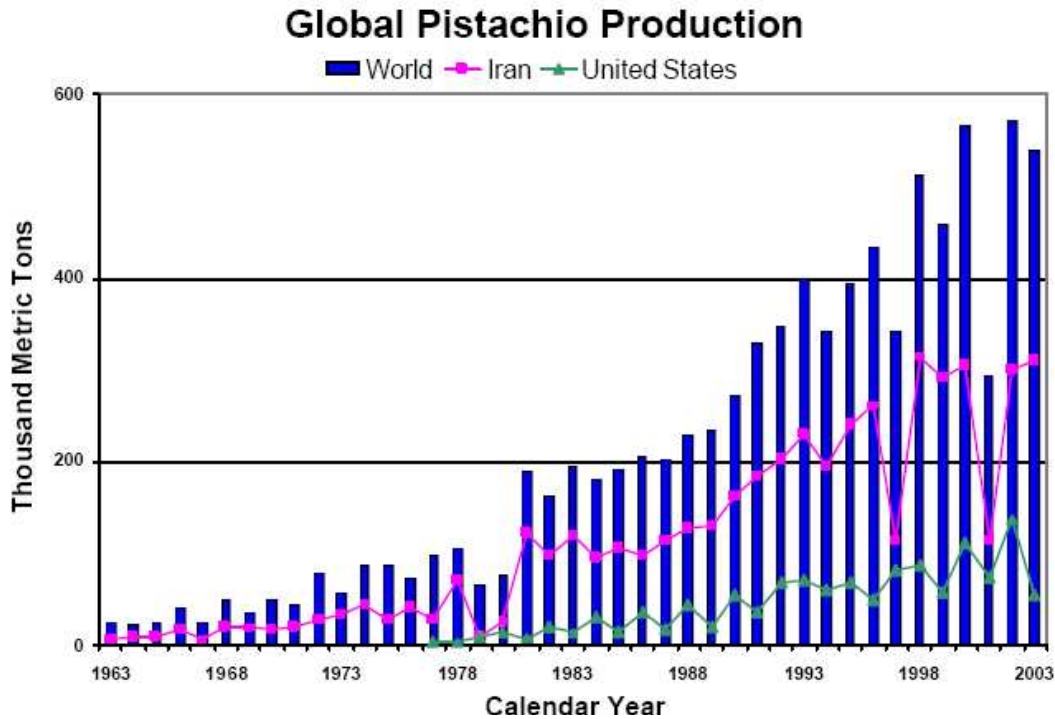


Figure 5. Production mondiale de pistaches (d'après la FAO).

Le sésame

Le sésame (*Sesamum indicum*) est une plante de la famille des Pédaliacées, largement cultivée pour ses graines. Les graines de sésame sont considérées comme une des premières graines oléagineuses jamais cultivées. Elles étaient consommées en Inde il y a plus de 7 500 ans et en Chine il y a 5 000 ans, comme en témoignent les vestiges archéologiques qu'on a mis au jour dans ces deux pays. Le sésame était fortement apprécié des Babyloniens et des Assyriens et s'est rapidement répandu en Afrique, en Asie mineure, au Proche et Moyen-Orient ainsi que dans tout le Sud du bassin méditerranéen. Parmi les qualités qui ont contribué à sa popularité sous ces climats, citons sa résistance à la sécheresse, la facilité avec laquelle on peut extraire son huile, de même que la grande stabilité de cette dernière, avantage certain à une époque où les réfrigérateurs étaient inexistantes, mais encore aujourd'hui où c'est toujours le cas dans bien des endroits du monde.

Les graines de sésame sont cultivées principalement dans les régions tropicales et subtropicales et récemment adaptées aux régions semi-arides (Johnson et al., 1979).

Au Moyen-Orient, les graines de sésame décortiquées sont principalement utilisées dans la production de « tahina » (pâte de graines de sésame), produit huileux de consistance pâteuse, obtenu par broyage des graines décortiquées et torréfiées soit à la vapeur soit à des températures plus élevées (Dagher, 1991).

L'huile de sésame est largement employée dans la cuisine asiatique. Au Japon, en Chine et en Corée, on lui attribue des propriétés médicinales. En Occident, l'huile de sésame sert surtout à la fabrication de margarines, de savons, de produits cosmétiques.

Selon la FAO, il se récolte dans le monde plus de trois millions de tonnes de graines de sésame, dont 65 % environ vont à la production d'huile. Le plus grand producteur est la Chine (22% de la production mondiale), suivie de l'Inde (21%), de la Birmanie (17%), du Soudan (9%), de l'Ouganda (3%) et d'autres pays africains. On en cultive également dans divers pays de l'Amérique latine et dans le Sud des États-Unis.

II. Composition des noix et graines

La composition en lipides, protéines, glucides, minéraux, acides gras et vitamines des principales noix et graines sont données dans le tableau 3. La composition complète est donnée en annexe 1.

La composition des noix et graines dépend beaucoup de la variété, l'origine géographique, les pratiques culturales et la date de récolte. Des différences de composition existent entre diverses variétés de sésame, mais aussi entre même variétés en provenance de différents pays (Johnson et al., 1979). Des différences variétales ont été observées chez les pistaches concernant la composition minérale (Na et Mg), en acides gras (acides oléique (C18 :1 n-9), palmitique (C16 :0), linoléique (C18 :2 n-6)) et en acides aminés (arginine, lysine, cystine) (Shokraii, 1977). Des différences dans les teneurs en protéines, lipides, Na, K, Ca, P, Zn ont été rapportées entre différentes variétés de cacahuètes (Khalil et Chughtai, 1983). Des différences dans le contenu lipidique, l'indice d'iode, l'indice de saponification, la gravité spécifique, la composition en acides aminés, le profil d'acide gras et la composition en stérols sont observées chez différentes variétés de noisettes (Yildiz et al., 2000 ; Villarroel et al., 1987). Le profil d'acides gras de certaines variétés de noisettes est très influencé par l'origine géographique et l'année de production (Parceriza et al., 1993a,b). La composition en acides gras dépend aussi de la période de récolte : pendant les étapes initiales de la fructification, l'acide linoléique (C18 :2 n-6) est prédominant, alors que la teneur en acide oléique (C18 :1 n-9) et en antioxydants augmente avec la maturité (Koyuncu et al., 1996). Donc le choix convenable du degré de maturité à la récolte constitue un facteur essentiel qui conditionne la qualité ultérieure du produit et sa stabilité au stockage.

Tableau 3. Composition nutritionnelle des noix et graines crues ou grillées (D'après l'USDA).

Composition (pour 100g de matière humide)	Amandes, grillées à sec	Pistaches, crues	Pistaches, grillées à sec	Arachides, crues	Arachides grillées à sec	Sésame, graines crues, déshydratées
Macronutriments						
Eau (g)	2,6	3,9	1,9	6,6	1,55	4,6
Cendres (g)	3,2	3	3	2,3	3,6	4,4
Protéines (g)	22	20,6	21,3	25,8	23,6	17,7
Lipides (g)	52,8	44,4	45,9	49,2	49,6	49,6
Glucides (g)	19,2	27,9	27,65	16,1	21,5	23,4
Énergie (kcal)	597	557	571	567	585	573
Sucres totaux (g)	4,9	7,64	7,81	3,9	4,1	0,3
Minéraux						
Ca (mg)	266	107	110	92	54	975
Fe (mg)	4,5	4,1	4,2	4,5	2,2	14,5
Mg (mg)	286	121	120	168	176	351
Vitamines						
carotène (µg)	1	332	157	0	0	5
Folates (µg)	33	51	50	240	145	97
Tocophérol, alpha (mg)	26	2	2	8	7	0
Acides gras						
AGS totaux (g)	4,04	5,44	5,55	6,83	6,89	6,95
AGMI totaux (g)	33,65	23,31	24,21	24,42	24,64	18,75
AGPI totaux (g)	12,649	13,45	13,89	15,559	15,694	21,773
18:2 (g)	12,649	13,2	13,63	15,555	15,690	21,375
18:3 (g)	0	0,25	0,26	0,003	0,003	0,376

Le contenu énergétique des noix et graines varie entre 23,7 et 29,3 KJ/g (ou entre 566 et 700 Kcal/100g) et le contenu lipidique varie entre 51 et 73 g/100g. Environ 79% de l'énergie obtenue vient des lipides (Kris-Etherton et al., 1999).

Les noix et graines sont pauvres en acides gras saturés et riches en acides gras mono- et polyinsaturés (>75% des acides gras totaux). Les acides gras prédominants sont les monoinsaturés. Ceux-ci contribuent à 62% de l'énergie obtenue à partir des lipides. Les acides gras mono- et polyinsaturés contribuent ensemble à 91% de l'énergie lipidique. De tous les fruits oléagineux, la noix est unique par sa richesse en acide α -linoléique (C18:3 n-3), constituant alors une source importante d'acides gras oméga-3. Par comparaison avec les fruits oléagineux, les noix et graines contiennent moins d'acides gras saturés que l'huile d'olive, de palme et de palmiste (Kris-Etherton et al., 1999).

Ces acides gras insaturés sont plus sensibles à l'oxydation que les acides gras saturés. Les vitesses d'oxydation des acides gras sont approximativement 1:10:100:200 pour les acides

stéarique (C18:0), oléique (C18:1 n-9), linoléique (C18:2 n-6) et linoléique (C18:3 n-3) respectivement (O'keefe et al., 1993). En conséquence, les graines et les variétés ayant des taux d'acide linoléique plus faibles et d'acide oléique (C18 :1 n-9) plus élevés sont plus stables à l'oxydation. Peshern et al. (1995) ont utilisé le rapport AG insaturés/AG saturés pour prédire la durée de vie des noisettes. Plus ce rapport est faible, plus la durée de vie augmente. Cependant la durée de vie est aussi affectée par l'activité enzymatique des oxydases (estérase, polyphénoloxydase, peroxydase, lipase), la présence et la concentration en composés prooxydants (oxygène, fer, cuivre et manganèse) et la concentration en antioxydants (tocophérols et phénols) (Bonvehi et al., 1993 ; Cuq, 1992 ; Parcerisa et al., 1995). Pour cette raison, il est recommandé d'utiliser des variétés plus pauvres en composés prooxydants tels que le fer et le manganèse, mais plus riches en antioxydants tels que les tocophérols. De plus, le conditionnement doit faire barrage à la lumière et l'oxygène pour améliorer la durée de vie du produit (Kinderlerer et Johnson, 1992 ; Bonvehi et al., 1993 ; Peshern et al., 1995).

L'acide glutamique, suivi par l'arginine et l'acide aspartique sont les acides aminés prédominants dans les noix et graines. Cette richesse en arginine constitue un facteur essentiel dans le rôle bénéfique des noix et graines pour la santé. La lysine est le premier acide aminé limitant des noix et graines (Khalil et Chughtai, 1983). D'où l'importance de contrôler et limiter la dégradation et le blocage de la lysine durant la transformation industrielle des noix et graines. Les acides aminés jouent aussi un rôle important dans le développement de couleur et d'arômes au cours de la torréfaction (Basha et Young, 1985), donc les variations de la composition en acides aminés conditionnent la qualité organoleptique du produit fini.

La composition en acides organiques contribue également au goût et à la saveur des noix et graines grillées (Botta et al., 1994).

III. Intérêt nutritionnel de la consommation des noix et graines : leurs bienfaits pour la santé

Les bienfaits de la consommation de noix et graines pour la santé, en particulier leur effet cardioprotecteur, sont souvent sous-estimés par les consommateurs. Les noix et graines constituent une source concentrée d'acides gras insaturés essentiels, de fibres et d'un certain nombre d'autres nutriments souvent négligés dans les régimes alimentaires modernes.

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques associent une consommation régulière de noix et graines à divers bienfaits pour la santé tels qu'un effet hypocholestérolémiant (Mukuddem-Petersen et al., 2005), une diminution du risque de maladies cardiovasculaires (MCV) (Hu et

Stampfer, 1999) et de diabète de type 2 (Lovejoy, 2005). D'autres études ont observé une diminution du risque de calculs biliaires chez l'homme (Tsai et al., 2004a), et une diminution du risque d'ablation de la vésicule biliaire (Tsai et al., 2004b) et de cancer du côlon chez la femme (Jenab et al., 2004).

A cause de leur richesse en graisses, devenues synonymes d'obésité et de facteur de risque de MCV, les noix et graines sont souvent évitées par les consommateurs. Cependant et contrairement à ce que l'on pourrait attendre de ces aliments riches en graisse, non seulement les taux de triglycérides et cholestérol n'augmentent pas mais au contraire le profil lipidique s'améliore. L'étude épidémiologique « *Nurses' Health Study* » a montré que des femmes consommant des noix et graines plus que 5 fois par semaine ont 35% moins de risque de MCV que celles consommant rarement des noix et graines (Hu et al., 1998).

III.1. Noix et santé cardiovasculaire

Les noix et graines ont une place importante dans les régimes alimentaires traditionnels de nombreuses régions du monde, qui sont par ailleurs caractérisées par un faible taux de cholestérol sanguin et une incidence réduite des maladies cardiovasculaires. Des études de populations montrent en effet qu'une consommation élevée de fruits oléagineux réduit le risque de MCV (Hu et Stampfer, 1999). Des expérimentations ont démontré que l'ajout de fruits oléagineux au régime alimentaire pouvait contribuer à réduire les taux de cholestérol sanguin et l'oxydation du cholestérol-LDL (lipoprotéine à faible densité), et à améliorer un certain nombre d'autres indices liés au risque de MCV (Sabaté et al., 1993).

Depuis la fin des années 80, de nombreuses études ont montré que la consommation des noix et graines réduit le risque des MCV (Fraser et al., 1992). Les premières preuves des bienfaits de la consommation de fruits secs ont été apportées par des études épidémiologiques prospectives sur de larges cohortes suivies sur de longues périodes. Dans quatre études réalisées aux États-Unis, *Adventist Health Study*, *Iowa Women's Health Study*, *Nurses' Health Study* et *Physicians' Health Study*, un total de plus de 160.000 hommes et femmes ont été suivis pendant 6 à 14 ans. Ces études ont donné des indications très cohérentes concernant les bienfaits des graines et fruits oléagineux pour la santé (Hu et al., 1998 ; Albert et al., 2002 ; Fraser et al., 1992).

Un certain nombre d'études ont analysé l'effet de l'intégration de fruits oléagineux dans le régime alimentaire sur les lipides sanguins et les lipoprotéines chez différents groupes de population. Celles-ci incluaient des populations présentant des taux de lipides situés dans la fourchette normale ainsi que des patients atteints d'hyperlipidémie.

En 1993, Sabaté et al. ont montré que la consommation des noix diminue le niveau du cholestérol sérique et la tension artérielle chez l'homme sain. Un an après, Abbey et al. (1994) ont révélé que le remplacement des graisses saturées par des noix ou des amandes diminuait le niveau plasmatique de cholestérol total et de LDL-cholestérol. Un effet hypocholestérolémiant a également été observé pour des régimes alimentaires supplémentés en pistaches (Edwards et al., 1999), amandes (Spiller et al., 1992) et cacahuètes (O'Byrne et al., 1997). Dans d'autres études, l'enrichissement du régime alimentaire avec des fruits oléagineux a conduit à un abaissement du taux des lipides sériques chez des sujets modérément hyperlipidémiques (Chisholm et al., 1998) et hypercholestérolémiques (Zambon et al., 2000). Une étude récente impliquant des personnes atteintes de diabète a montré que l'ajout d'amandes au régime alimentaire réduit le niveau du LDL-cholestérol chez ces personnes (Lovejoy et al., 2002). Dans l'ensemble, toutes les études menées aux États-Unis, l'Espagne et le Japon ont montré de manière cohérente que l'enrichissement du régime alimentaire avec des fruits secs réduit les niveaux plasmatiques du cholestérol total et du LDL-cholestérol.

On considère que les effets bénéfiques de consommation de noix et graines observés dans les études épidémiologiques et cliniques sont dus en premier lieu à leur profil lipidique cardioprotecteur: un rapport élevé entre acides gras insaturés et saturés (10,8 pour les amandes, 9,7 pour les pistaches, 7,4 pour les cacahuètes) ; un pourcentage important d'acides gras monoinsaturés (en particulier dans les amandes -69 %-) contribuant approximativement à 62 % de l'énergie totale apportée par les lipides; un pourcentage très bas d'acides gras saturés (7 à 10%) par rapport au contenu lipidique total, même plus bas que celui de l'huile d'olive (15%) (Maguire et al., 2004 ; Ryan et al., 2006).

Cependant, Kris-Etherton et al. (2001) ont noté que la réduction du risque cardiovasculaire associée à une consommation de noix n'est pas exclusivement due au profil lipidique, mais également à la présence d'autres constituants bioactifs. Les tables de compositions actuelles contiennent quelques données sur les noix concernant ces constituants bioactifs (Holland et al., 1993). En effet, les noix constituent une source unique de protéines riches en arginine, fibres, cuivre et magnésium, éléments importants pour la santé cardiovasculaire (Kris-Etherton et al., 1999).

Les taux de fibres alimentaires dans les fruits oléagineux varient de 5 % dans les noix de macadamia à 10-14 % dans les amandes et les pistaches, dont 25 % sont des fibres solubles, ce qui fait de ces fruits une des rares sources de graisses qui soit également riche en fibres. Les fibres solubles sont connues pour réduire les taux de cholestérol total et du LDL-

cholestérol, et d'améliorer le contrôle glycémique (Kris-Etherton et al., 1999). Ainsi, un régime alimentaire riche en noix et graines (100g) peut contribuer de manière appréciable à l'apport quotidien conseillé en fibres alimentaires (20-35 g/j) (Kris-Etherton et al., 1999).

On sait aussi qu'une déficience en cuivre et magnésium constitue un facteur de risque cardiovasculaire (du fait notamment d'une sensibilité accrue des cellules à la peroxydation lipidique) (Klevay, 1993). Or, ces fruits oléagineux ont un contenu élevé en cuivre et en magnésium (densité magnésienne forte : 15 à 22 mg aux 100 Kcal) possédant une excellente biodisponibilité. Une consommation de 28,4 grammes de noix et graines fournit à peu près 8 à 20 % et 18 % de l'apport quotidien conseillé en magnésium et en cuivre respectivement.

Les noix et graines contiennent également des teneurs élevées en tocophérols, phytostérols et squalène (Tableau 4).

Les tocophérols sont des antioxydants puissants qui, à des doses élevées (>100 UI/jour), réduisent le risque de MCV (Rimm et Stampfer, 1997). Cet effet protecteur des tocophérols s'oppose à l'oxydation du LDL-cholestérol, une étape clé du processus d'athérogenèse (Kris-Etherton et al., 1999). De même, un apport élevé en vitamine E est associé à un risque réduit de certaines maladies chroniques telles que l'hypertension, le cancer et la maladie d'Alzheimer (Ryan et al., 2006).

Le squalène agit comme précurseur biosynthétique de tous les stéroïdes chez les plantes et les animaux. Il présente des effets bénéfiques sur la santé, notamment une réduction du risque de différents cancers et des niveaux sériques du cholestérol a été décrite (Smith, 2000). Cet effet protecteur du squalène a été attribué à son pouvoir antioxydant : quenching de l'oxygène singulet dans des systèmes modèles (Kohn et al., 1995) et protection contre l'échange de chromatides sœurs induit par le peroxyde d'hydrogène dans les cellules V79 de hamster chinois (O'Sullivan et al., 2002).

Les phytostérols (β -sitostérol, campestérol et stigmastérol), constituants des membranes cellulaires végétales et analogues au cholestérol animal, peuvent inhiber l'absorption intestinale du cholestérol, réduisant ainsi le taux plasmatique de cholestérol total et LDL (De Jong et al., 2003).

L'acide folique est également présent dans les fruits oléagineux. Une consommation de 100 g de fruits secs fournit à peu près 16% de l'apport quotidien conseillé. Une consommation adéquate d'acide folique est importante pour la prévention de l'hyperhomocystéinémie (Selhub et al., 1995).

Finalement, les fruits oléagineux sont riches en polyphénols connus pour leur effet antioxydant (tableau 5). Le resvératrol que l'on trouve dans les cacahuètes, protège les

lipoprotéines LDL de l'oxydation. L'acide *p*-coumarique des cacahuètes est un antioxydant connu (Talcott et al., 2005). L'acide ellagique est un polyphénol que l'on trouve dans les noix et les pécanes permettant de ralentir la croissance des tumeurs (Rainey et Nyquist, 1997). Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur effet cardioprotecteur (Hertog et al., 1995). Les noix et graines contiennent la lutéoléine, un puissant antioxydant et des tocotriénols.

III.2. Les lignanes du sésame

La graine de sésame est l'un des aliments qui contient le plus de lignanes (Milder et al., 2005), des composés végétaux jouant un rôle semblable à celui de l'oestrogène; c'est pourquoi on les appelle aussi phytoestrogènes. Les lignanes sont considérées comme offrant un large éventail d'effets bénéfiques pour la santé. Le sésame et ses lignanes stimulent les niveaux d'antioxydants, diminuent l'inflammation, normalisent la pression sanguine et améliorent le profil lipidique. Ils agissent de façon synergique avec d'autres nutriments, comme le gamma-tocophérol, les huiles de poisson ou l'acide linoléique conjugué, augmentant leur biodisponibilité et leur efficacité.

La sésamine est l'une des principales lignanes du sésame : chaque gramme de graine en contient environ 2,24 mg (Cooney et al., 2001). En plus de posséder des propriétés antioxydantes (Ikeda et al., 2003 ; Kang et al., 2000 ; Kiso, 2004 ; Osawa, 1999 ; Suja et al., 2004), les lignanes du sésame pourraient avoir d'autres bienfaits. Chez des personnes hypercholestérolémiques, la consommation de sésamine semble diminuer le cholestérol total et LDL (Hirata et al., 1996). D'autres études cliniques, menées chez des personnes souffrant d'hypertension consommant de l'huile de sésame et chez des femmes ménopausées consommant des graines de sésame en poudre, ont rapporté une diminution de la tension artérielle et des lipides sanguins (Sankar et al., 2005). Les auteurs de ces recherches attribuent leurs résultats au moins en partie à la sésamine.

Chez l'humain, la consommation de graines de sésame entraîne une augmentation plus marquée de la concentration sanguine de gamma-tocophérol, en comparaison avec d'autres aliments offrant pourtant la même quantité de gamma-tocophérol (huile de soja, noisettes) (Cooney et al., 2001). Les chercheurs pensent que cette augmentation des tocophérols pourrait être attribuée à la présence des lignanes du sésame puisque leur consommation diminuerait la dégradation et l'élimination urinaire du gamma-tocophérol (Frank, 2005 ; Frank et al., 2004). Globalement, cette interaction pourrait être potentiellement bénéfique en favorisant le maintien de la vitamine E dans l'organisme, permettant ainsi de mieux profiter de ses bienfaits.

Tableau 4. Teneurs en tocophérols, squalène et phytostérols exprimées en mg/100g de lipides de certains fruits oléagineux.

Fruit oléagineux	α-tocophérol	γ-tocophérol	Squalène	Campestérol	Stigmastérol	β-sitostérol
Noisettes ¹	31	6,1	18,6	6,6	3,8	99,1
Noix de macadamia ¹	12,2	Trace	18,5	7,3	3,8	150,6
Cacahuètes ¹	8,7	6	9,8	19,8	16,3	136,3
Noix ¹	2	30	0,9	5,1	5,5	113
Amandes ¹	44	1,2	9,5	5,5	5,1	207,1
Noix de Pécan ²	1,2	16,8	15,1	5,2	34	157,2
Noix du Brésil ²	8,2	11,6	137,7	2,6	57,7	132,5
Pistaches ²	1,5	27,5	9,1	23,6	66,3	468,5
Noix de cajou ²	0,36	5,7	8,9	10,5	11,6	176,8

¹Maguire et al., 2004.

²Ryan et al., 2006.

Tableau 5. Tableau récapitulatif des principaux polyphénols des noix et graines

Composé phénolique	Classe	Amandes	Pistaches	Cacahuètes	Sésame
Flavonoïdes	Anthocyanidines	Cyanidine ^{1,2} Delphinidine ²	Cyanidine ^{1,5,6}		
	Flavon-3-ols	Epicatechine ^{1,3,4} Epigallocatechine ¹ Catéchine ^{1,3,4} Procyanidine B ₂ & B ₃ ²	Epicatechine ¹ Epigallocatechine ¹ Epigallocatechin 3-gallate ¹ Catéchine ¹	Epigallocatechin ¹ Epicatechin ⁷ Procyanidin B ₂ , B ₃ & B ₄ ⁷	
	Flavonones	Eryodictyol ⁴ Naringénine ^{1,3,4}	Eryodictyol ⁶ Naringénine ⁶		
	Flavones		Lutéoline ⁶ Apigénine ⁶		
	Flavonols	Isorhamnétine ^{2,3,4} Kaempferol ^{2,3,4} Quercétine ^{1,2,3,4}	Quercétine ^{1,6} Rutine ⁶		
Non-flavonoïdes	Acides phénoliques	Acide protocatéchuique ³ Acide vanillique ^{2,3} Acide p-hydroxybenzoïque ³ Acide caféique ² Acide p-coumarique ² Acide férulique ²		Acide p-hydroxybenzoïque ⁸ Acide p-coumarique ⁸ Acide caféique ⁹ Acide férulique ⁹ Acide syringique ⁹	Acide p-coumarique ⁹ Ferulic acid ⁹ Acide vanillique ⁹ Acide sinapique ⁹
	Lignanes				Sésamine ¹⁰ Sésamoline ¹⁰ Sésamolinol ¹⁰ Pinorésinol ¹⁰ Sésaminol ¹⁰ Sésamol ¹⁰

¹ Harnly et al., 2006

² Amarowicz et al., 2005

³ Chen et al., 2005

⁴ Milbury et al., 2006

⁵ Wu et al., 2004

⁶ Seeram et al., 2006

⁷ Lou et al., 2004

⁸ Talcott et al., 2005

⁹ Schmidt & Pokorny, 2005

¹⁰ Kumazawa et al., 2003

IV. Procédés de transformation industrielle des noix et graines

IV.1. Torréfaction des noix et graines

La torréfaction est une opération essentielle et l'un des procédés de transformation les plus fréquents pour les noix et graines (Moss et Otten, 1989 ; Buckholz et al., 1980 ; Shimoda et al., 1997). La torréfaction vise à augmenter la palatabilité du produit. Elle favorise significativement le développement de la couleur, flaveur, texture et apparence des noix et graines. Le produit résultant est raffiné et très apprécié du consommateur par comparaison au noix et graines crues (Pattee et al., 1982a,b ; Mayer, 1985 ; Sanders et al., 1989 ; Patte et al., 1995 ; Saklar, 1999). La torréfaction détruit également les microorganismes indésirables et inactive les enzymes qui favorisent la détérioration du produit au cours du stockage (Buckholz et al., 1980). De plus, la torréfaction peut donner naissance à des composés antioxydants, de type mélanoidines formées au cours de la réaction de Maillard. Mais les propriétés antioxydantes de ces produits peuvent être dues à la formation de structures de type phénols (Machiels et Istasse, 2002). Ces dernières peuvent avoir des propriétés anticancérigènes associées à leurs propriétés antioxydantes (Ames, 1988). Ledl et Schleicher (1990) supposent que les réactions impliquant des radicaux oxygène contribuent à piéger ces radicaux et les transforment en composés moins agressifs.

Dans ce mode de cuisson, les températures utilisées sont en général élevées (entre 140 et 180 °C) et les produits traités sont peu hydratés, ou se dessèchent rapidement en surface (Baltes et Bochmann, 1987 ; Chiou et al., 1993), si bien que les réactions de Maillard sont favorisées. Cependant, l'eau en s'évaporant entraîne avec elle les molécules volatiles. La quantité d'arômes restant dans le produit dépend fortement de la capacité de rétention des constituants macromoléculaires de l'aliment.

Le temps et la température sont les principaux facteurs contrôlés lors de la torréfaction industrielle. Ce couple temps/température joue un rôle important dans le développement de la qualité sensorielle de l'aliment, notamment dans les noix et graines, où la qualité organoleptique est le facteur clé du choix des consommateurs. Mais la teneur initiale en eau et la vélocité de l'air du chauffage affectent aussi le taux de transfert de chaleur, et par conséquent conditionnent la déshydratation et les changements physico-chimiques, en particulier des protéines (Chiou et Tsai, 1989 ; Saklar, 1999). Ces changements rhéologiques et physico-chimiques sont à l'origine du développement des flaveurs, arômes, couleur, texture, mais aussi de l'oxydation des lipides

(Figures 6 et 7). Ils mettent en jeu glucides, lipides, protéines et micronutriments tels que les vitamines. Les protéines peuvent se décomposer ou entrer en réactions croisées au niveau d'acides aminés souvent essentiels (lysine, cystéine, arginine), ce qui entraîne une baisse de la qualité nutritionnelle de celles-ci. Les lipides s'oxydent ou s'isomérisent, alors que les vitamines subissent des dégradations oxydatives, formant des composés réactifs qui réagissent à nouveau avec les protéines dans la réaction de Maillard. Les oligosaccharides peuvent s'hydrolyser et évoluer selon la réaction de caramélisation ou la réaction de Maillard. Par exemple, le saccharose peut s'hydrolyser en fructose et glucose (Muller et Bauer, 1990). Toutes ces réactions influencent les qualités nutritionnelle et organoleptique du produit fini. Pour cette raison, il est important d'appréhender et d'évaluer les changements qui ont lieu pendant la torréfaction afin de chercher à mieux maîtriser la qualité des produits grillés.

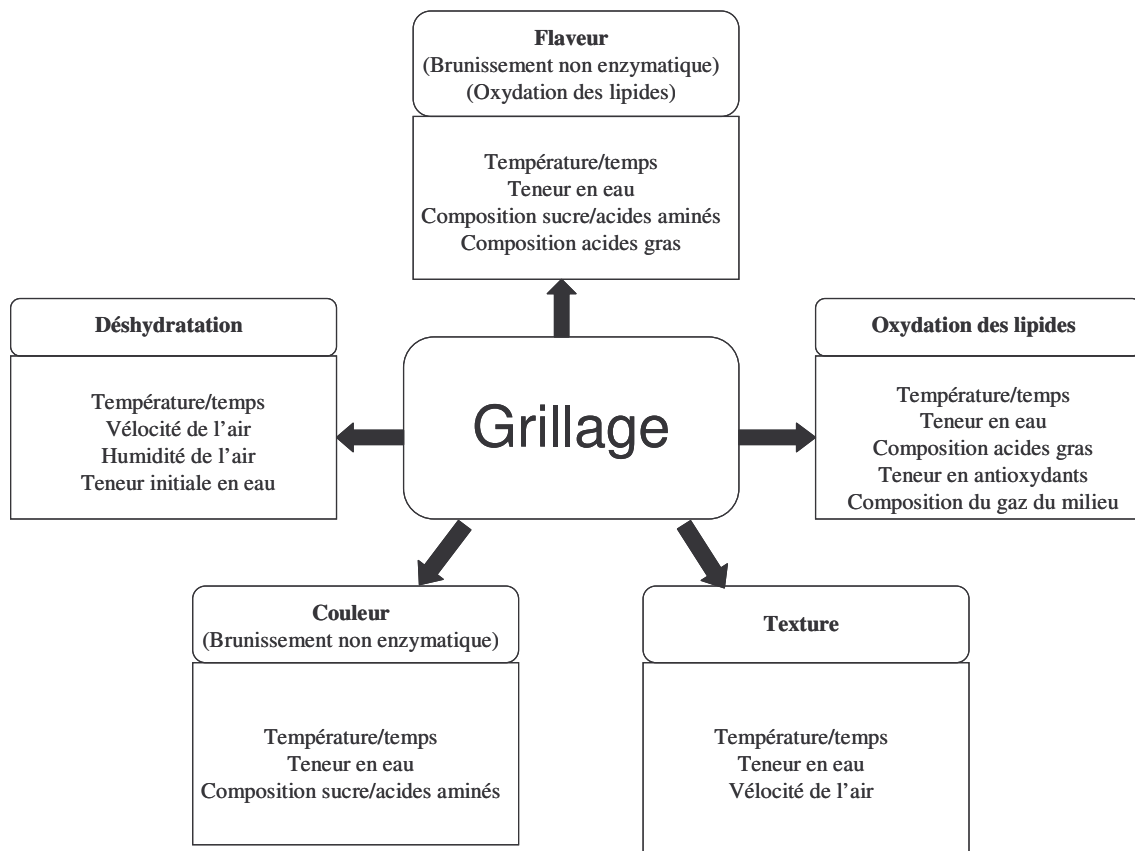


Figure 6. Effet de la torréfaction sur les noix et graines.

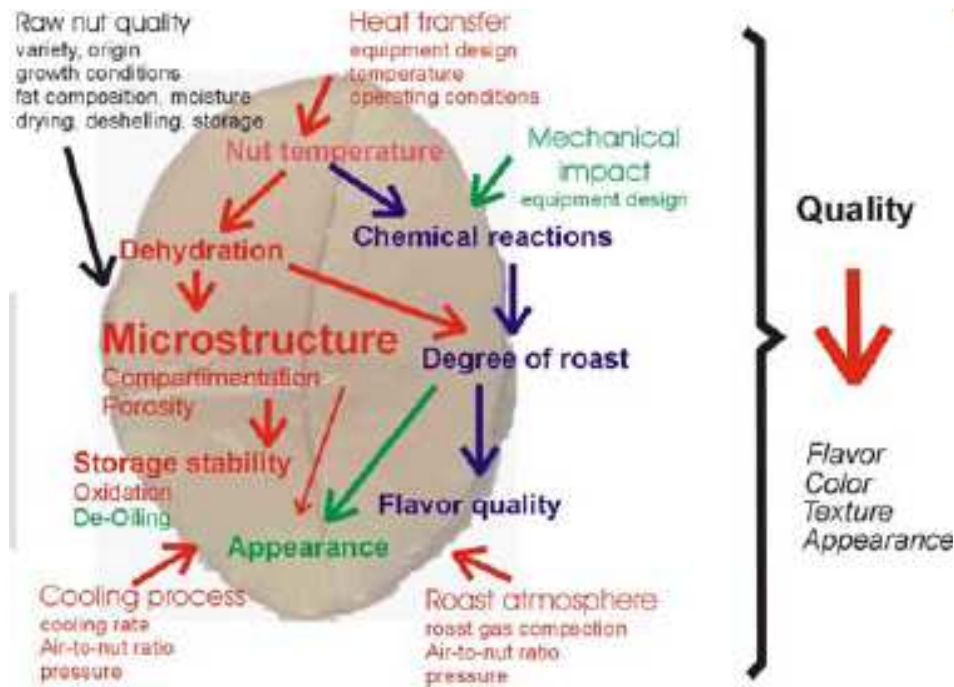


Figure 7. Effet des différents facteurs sur la qualité des noix et graines torrifiées (d'après Perren et al., 1996).

IV.1.1 Impact de la torrification sur le développement de la couleur

La couleur constitue un paramètre très important de l'acceptation des noix et graines par les consommateurs. Les changements de couleur sont particulièrement favorisés au cours de la torrification, et sont essentiellement dus aux réactions de brunissement non enzymatique (Mayer, 1985 ; Buckholz et al., 1980 ; Lopez et al., 1997a). Le développement de la couleur est donc le résultat de nombreuses réactions complexes du type: réaction de Maillard ou caramélisation et interaction lipides-protéines. Les différentes réactions seront détaillées dans le chapitre 2.

Cheftel et al. (1977) distinguent deux étapes lors du développement du brunissement non enzymatique. La première étape consiste en la formation de composés réactifs (aldéhydes, cétones, composés dicarbonylés, etc...) issus soit de la dégradation des sucres par caramélisation, soit de la réaction intermédiaire de Maillard. Mais l'oxydation des lipides dont le fruit est riche est également une réaction très efficace pour produire des composés aldéhydiques et dicarbonylés. Ces composés peuvent être considérés comme des précurseurs de la couleur. Ils polymérisent dans un deuxième temps sous l'effet de la chaleur et de la perte en eau. Ces polymères sont bruns et appelés mélanoidines lorsque les précurseurs sont issus de la réaction de

Maillard, ou caramel lorsqu'ils sont issus de la dégradation des sucres sans implication des amines (Hodge, 1953).

Les produits de ces réactions incluent une grande variété de composés de structure complexe qui, pour la majorité, sont insaturés. Les doubles liaisons dans ces structures absorbent la lumière, conférant à ces produits l'aptitude à se comporter comme des pigments bruns, ce qui contribue à une couleur plus foncée des noix et graines grillées (Lopez et al., 1997a; Cammarn et al., 1990). Puisque le contrôle et le suivi du procédé de torréfaction par le développement de la flaveur est très difficile, coûteux et exige une instrumentation sophistiquée, la couleur constitue un indicateur empirique et efficace vu que les pigments bruns augmentent avec la progression des réactions de brunissement et de caramélisation (Cammarn et al., 1990). De plus, on a associé la couleur des noix et graines grillées avec le développement de la flaveur et des arômes pendant la torréfaction (Morris et al., 1953). Cependant, la sélection du degré du rôtissage par le biais de la couleur seule peut amener à des saveurs défectueuses (Moss et Otten, 1989).

Parmi les sucres, le glucose et le fructose sont très réactifs dans les réactions de brunissement, et ont été rapportés comme les sucres réducteurs majeurs réagissant avec les acides aminés lors de la torréfaction des noix et graines (Newell et al., 1967). Le saccharose et l'amidon peuvent jouer un rôle dans les réactions de rôtissage après leur hydrolyse. La conversion du saccharose en fructose et glucose a été même proposée comme une voie majeure de l'implication des sucres dans ces réactions affectant les noix et graines (Mason et al., 1966), vu que le contenu en glucose et fructose est faible (Hodge, 1953). Ceci a été aussi observé par Chiou et al. (1991) puisque la teneur en glucose a augmenté pendant les premières minutes de torréfaction alors que la teneur en saccharose diminuait (Chiou, 1992). Le tableau 6 résume les changements affectant les différents sucres des noix et graines au cours de la torréfaction.

Les réactions de brunissement sont fonction de plusieurs paramètres liés au processus de torréfaction, tels que le temps de torréfaction, la température, l'humidité initiale et finale recherchée, la composition et le pH de l'aliment. Plus la température de torréfaction est élevée (pour un temps donné), plus la couleur finale est développée, et ceci est dû à la vitesse de la réaction mais aussi à la formation de polymères mélanoidines de poids moléculaire plus élevé (Ames et al., 1994). Par ailleurs, lorsque la teneur en eau est faible, la couleur tend à se développer plus rapidement aux pH élevés, alors que c'est l'inverse dans les systèmes aqueux, (Ames et al., 1994 ; Reineccius, 1990; Lingnert, 1990).

Tableau 6. Changements affectant les sucres au cours de la torréfaction des graines et noix.

Noix ou graine	Sucre			Référence
	Fructose, glucose	Saccharose	Amidon	
Noisettes		Hydrolyse	Hydrolyse	Kirbaşlar, 1998
Cacahuètes	Diminue	Hydrolyse		Oupadissakoon et Young, 1984
Cacao	Diminue	Hydrolyse		Rohan et Stewart, 1966
Pistaches	Diminue		Hydrolyse	Kashani et Valadon, 1984
Graines de soja	Augmente			Kato et al., 1981

IV.1.2 Impact de la torréfaction sur le développement de la flaveur

La torréfaction favorise considérablement le développement de la flaveur, augmentant ainsi la palatabilité des noix et graines (Mayer, 1985 ; Buckholz et al., 1980 ; Lopez et al., 1997a). Les monosaccharides et les acides aminés libres, libérés par hydrolyse des polypeptides et des glucides complexes lors du processus de torréfaction, constituent des précurseurs essentiels dans les réactions de Maillard, responsables de la formation des pyrazines (Mason et al., 1966). Les pyrazines sont bien caractérisées en tant que composés volatiles responsables de l'arôme caractéristique des aliments rôtis. Bien que très volatiles dans les systèmes aqueux, les pyrazines sont adsorbées et retenues par les lipides des noix et graines (Hashim et Chaveron, 1996). Les composés volatiles sont responsables de l'arôme des cacahuètes grillées avec plus de 300 composés en mélange (Ahmed et Young, 1982).

Les différentes classes de produits aromatiques de structure complexe issus des réactions de Maillard et de Strecker, tels que les aldéhydes, les pyrazines et les fragments de sucre, dépendent beaucoup de la composition en acides aminés (Cammarn et al., 1990). Les changements affectant les acides aminés durant la torréfaction des noix et graines dépendent de la nature du traitement thermique, la température interne et la teneur en eau des graines (Chiou et al., 1991). Les acides aminés libres diminuent significativement au cours de la torréfaction (Ozdemir et al., 2001). Newell et al. (1967) ont classé les acides aminés comme précurseurs typiques (acide aspartique, acide glutamique, phénylalanine et histidine) et atypiques (thréonine, lysine, tyrosine) d'arômes de cacahuètes. Les précurseurs atypiques d'arômes ne contribuent pas de manière positive dans le développement de la flaveur et sont alors indésirables. Dans les systèmes modèles, l'asparagine, l'acide aspartique et la glutamine ont donné les rendements les plus élevés en pyrazines (Koehler et al., 1970). Le degré de maturité et les dimensions de la graine affectent les caractéristiques de la flaveur des graines grillées. Ceci est dû aux différences de composition entre les graines de

différents degrés de maturité et dimensions (Rodriquez et al., 1989). Le tableau 7 résume les changements affectant les différents acides aminés libres des noix et graines au cours de la torréfaction.

Tableau 7. Changements affectant les acides aminés libres au cours de la torréfaction des graines et noix.

Noix ou graine	Acides aminés	Référence
Noisettes	Perte dans les acides aminés totaux	Kirbaşlar, 1998
Cacahuètes	Acide aspartique, acide glutamique, alanine, isoleucine, histidine, phénylalanine	Oupadissakoon & Young, 1984
Cacao	Thréonine, acide glutamique, phénylalanine, cystéine, histidine, arginine	Rohan & Stewart, 1966
pistaches	Lysine, arginine, méthionine	Kashani & Valadon, 1984

IV.1.3 Impact de la torréfaction sur l'oxydation des lipides

Comme on l'a évoqué plus tôt, la torréfaction favorise les réactions d'oxydation. Les mécanismes réactionnels de l'oxydation des lipides ainsi que les facteurs influents seront détaillés dans le chapitre 2 de cette partie. Pour le moment, on considèrera que la torréfaction affecte ces réactions selon les mécanismes suivants.

Durant la torréfaction des noix et graines, la température atteint des valeurs élevées, supérieures à 100°C accélérant les réactions d'autooxydation. En effet, la torréfaction des cacahuètes amorce et augmente l'oxydation des lipides ainsi que la formation des composés carbonylés (Bett et Bobylston, 1992). La torréfaction change aussi l'indice de réfraction et le temps d'écoulement de l'huile de cacahuètes indiquant la présence de polymères (Mostafa, 1987). Une augmentation de la viscosité de l'huile extraite des graines de sésame, a également été notée qui suppose la formation de polymères lipidiques (Elleuch et al., 2007). Ozdemir et al. (2001) ont aussi montré que la torréfaction des noisettes augmente l'indice de peroxyde.

Le couple temps/température de torréfaction, la température des noisettes à la sortie du torréfacteur, et la durée d'exposition à l'air avant le conditionnement et le stockage influent beaucoup sur la durée de vie des noisettes grillées (Perren et al., 1996). Cependant, la température de torréfaction paraît comme le facteur le plus important et le plus influent sur l'oxydation des

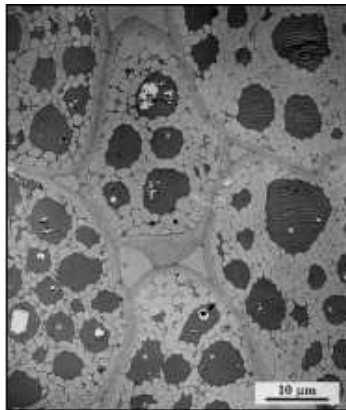
lipides des noix et graines : les taux d'oxydation des noix et graines grillées augmentent considérablement avec l'élévation de la température de torréfaction. La durée de torréfaction a en revanche une influence mineure sur les niveaux d'oxydation et la durée de vie ultérieure, pour cela des durées de torréfaction plus longues associées à des températures modérées (130-150°C) sont en général recommandées pour obtenir une stabilité oxydative optimale (Perren et Escher, 2007).

Par ailleurs, la torréfaction détruit la microstructure des cellules des noix et graines du fait de l'application de températures élevées (Saklar et al., 2003). En effet, dans les graines intactes, les cellules de stockage des lipides présentent un réseau endoplasmique en structure de nid d'abeille. Les lipides sont stockés alors au niveau des cavités subcellulaires dans des structures spécialisées appelées oléosomes (1 à 2 µm de diamètre) entourés d'une monocouche de phospholipides. Cette compartimentation et organisation subcellulaire réduit fortement l'accessibilité de l'oxygène à travers les pores extracellulaires, et limite par conséquent l'oxydation lipidique. Lors de la torréfaction, l'intégrité cellulaire est atteinte : le réseau endoplasmique est rompu et les oléosomes désintégrés. De même, les jonctions intercellulaires sont altérées et la surface interne élargie (Figure 8) (Saklar et al., 2003). Ceci augmente la diffusion de l'oxygène jusqu'à l'intérieur de la graine et met le substrat au contact des enzymes, favorisant ainsi les réactions d'oxydation aussi enzymatiques que non enzymatiques, et réduisant la stabilité oxydative des noix et graines grillées pendant le stockage (Perren et al., 1996).

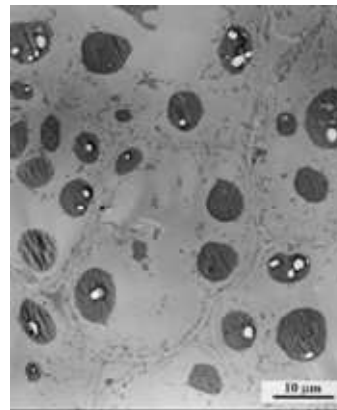
Chun et al. (2005) ont montré que les cacahuètes grillées étaient moins stables au stockage que les cacahuètes crues : sous les mêmes conditions de stockage (21°C, sous atmosphère normale), l'indice de peroxyde a atteint 47 mEq/kg après 12 semaines seulement dans les cacahuètes grillées, alors que celui des cacahuètes crues est resté au dessous d'une valeur de 2 mEq/kg même après 38 semaines. De même, 90% de la vitamine E s'est dégradé après 12 semaines de stockage dans les cacahuètes grillées, alors que plus de 70% est resté intact après 38 semaines dans les cacahuètes crues.

Une bonne adaptation du traitement thermique pendant la torréfaction favoriserait alors une durée de vie plus longue des noix et graines grillées. Récemment, un procédé de torréfaction à deux étapes (*two-step process*), utilisant une température de torréfaction relativement faible (~130°C) pendant la première phase afin de plastifier le produit, suivie par une période de torréfaction plus longue et des températures plus élevées (mais autant faibles que possible), a été proposé pour

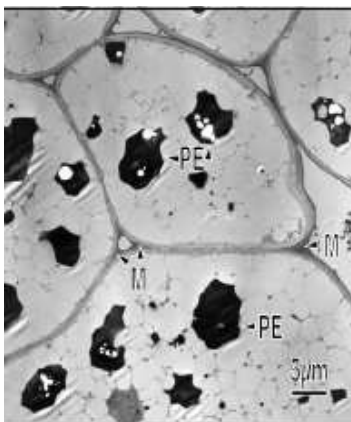
limiter l'oxydation pendant et après la torréfaction des noix et graines (Perren et Escher, 2007). Ce procédé à deux étapes permet en effet de minimiser l'augmentation de la taille des pores intracellulaires lors de la torréfaction augmentant ainsi la stabilité oxydative du produit fini tout en achevant la qualité organoleptique désirée (Perren et Escher, 2007).



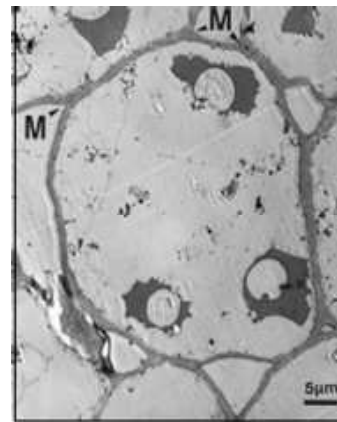
Amandes
crues



Amandes grillées
(150°C, 25 min)



Noisettes
crues



Noisettes grillées
(150°C, 25 min)

Figure 8. Images obtenues par microscopie électronique en transmission montrant la microstructure des graines d'amandes et de noisettes avant et après torréfaction (d'après Saklar et al., 2003).

IV.2. Procédé de transformation industrielle du sésame en tahina

La tahina est le produit liquide obtenu après décorticage, torréfaction et broyage des graines de sésame (Bedigian, 2004 ; Sawaya et al., 1985 ; El-Adawy et Mansour, 2000).

Presque tous les produits de tahina commercialisés sont produits dans des usines spécialisées qui existent dans des pays du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord. Par exemple, il existe au Liban

seulement, 40 usines qui produisent la tahina, dont quelques unes équipées avec des lignes de production perfectionnées et complètement automatisées (Chambre du Commerce, de l'Industrie et de l'Agriculture). La popularité de la tahina dans les pays du Moyen-Orient vient du fait qu'elle est utilisée dans la préparation de plusieurs plats populaires dans cette région (Sawaya et al., 1985). La tahina est d'habitude mélangée avec des pois-chiches cuits et macérés pour former le "*Hommos tahina*" ou avec de l'aubergine grillée et macérée pour former le "*Baba gannouj*", deux plats très populaires et connus au Moyen-Orient (Bedigian, 2004 ; El-Adawy et Mansour, 2000 ; Sawaya et al., 1985). La tahina sert aussi à préparer une sauce appelée "*Taratour*" (Bedigian, 2004) utilisée avec du poisson ou de la viande cuite (Sawaya et al., 1985). Elle sert également à l'assaisonnement des salades à base de légumes frais (Sawaya et al., 1985; El-Adawy et Mansour, 2000). Elle peut être aussi ajoutée à certains types de pains et produits de boulangerie (Sawaya et al., 1985), comme à certains aliments sucrés comme le miel et la mélasse (Nilüfer et Boyacioglû, 2002). Enfin lorsqu'elle est mélangée avec du sucre, de l'acide citrique et de l'extrait des racines de *Saponaria officinalis*, la tahina constitue l'ingrédient majeur de la "*Halawa tahinia*" (Nilüfer et Boyacioglû, 2002).

Les méthodes de production utilisées varient d'une usine à l'autre; cependant les principes de base suivis pour la préparation de la tahina sont les mêmes, qu'il s'agisse des anciennes méthodes conventionnelles ou des méthodes récentes automatisées (Sawaya et al., 1985). Les graines de sésame sont nettoyées (à sec ou à l'eau) puis décortiquées (soit grâce à une machine après immersion dans l'eau, soit par injection de vapeur d'eau puis d'air chaud). Les graines sont séparées des membranes par différence de densité après immersion dans une eau saline (gros sel). Les graines sont ensuite dessalées par lavage à l'eau douce puis séchées avant de passer à une machine à griller (100 - 120°C pendant 1-2 heures). Les graines grillées (de couleur brun-jaunâtre) sont ensuite refroidies puis broyées, soit par une pierre à broyer (>75°C) soit par des machines automatiques à haute vitesse (>100°C), pour former une pâte visqueuse qui est conditionnée dans des conteneurs en plastique et commercialisée sous le nom de tahina (Sawaya et al., 1985).

La tahina est composée à 100 % des grains de sésame. Aucun ajout d'additif ou autre huile n'est autorisé (LIBNOR, 1999).

Les caractéristiques de la tahina telles que définies par le LIBNOR (1999) sont les suivantes : 1)
Le produit doit être exempt de flaveur et goût indésirables, de moisissures, de rancidité, d'insectes

ou leurs résidus et de micro-organismes pathogènes, 2) le produit doit contenir un minimum de 50% de matière grasse et un maximum de 1% humidité.

Les propriétés analytiques et la composition en minéraux selon LIBNOR doivent suivre les critères cités dans le tableau 8.

Tableau 8. Indices de qualité du produit fini de tahina d'après LIBNOR

% cendres	≤ 3,5%
Humidité	≤ 1%
Acidité	≤ 1,8%
Protéines	> 27%
Lipides	> 45 %
Arsenic	0 mg/kg
Titanium	0 mg/kg
Plomb	<5 mg/kg
Cuivre	<10 mg/kg
Aluminium	45 mg/kg
Magnésium	3500 mg/kg

Pour pouvoir étudier l'effet de l'oxydation sur la tahina et sa prévention, il faut prendre en compte la composition du produit et l'ensemble de ses caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques. En effet, la tahina est dotée d'une valeur nutritionnelle élevée. Il est l'un des aliments les plus riches en acides gras essentiels, surtout en acide oléique (C18:1 n-9) et linoléique (C18:2 n-6) mais aussi en antioxydants endogènes tels que le γ -tocophérol, la sésamine, la sésamoline et le sésaminol (Abou-Gharbia et al., 1996).

La composition de la tahina est donnée dans le tableau 9. La tahina est riche en P, Mg, Fe, Cu, Mn et Zn mais pauvre en Ca et Se (Sawaya et al., 1985; El-Adawy et Mansour, 2000). Comparée à celle des graines de sésame, la concentration en calcium de la tahina est très faible, ce qui est dû au décortilage. Les concentrations en phosphore et magnésium de la tahina sont également plus faibles que celles des graines de sésame, tandis que celle des micro-éléments cuivre, manganèse et zinc sont comparables (Sawaya et al., 1985).

La tahina est hautement riche en acides gras insaturés avec prédominance des acides oléique (C18:1 n-9) et linoléique (C18:2 n-6) (Sawaya et al., 1985).

Le profil des acides aminés de la tahina indique que la lysine est le premier acide aminé limitant. Cependant, la tahina est riche en tryptophane et en acides aminés soufrés comme la méthionine et

la cystine, et qui sont d'habitude limitants dans d'autres aliments (Sawaya et al., 1985). La tahina est donc considérée comme un aliment très nutritif et qui peut être utilisé en combinaison avec d'autres types d'aliments. Grâce à sa teneur élevée en acides aminés soufrés, elle peut être utilisée en adjonction avec des régimes alimentaires à base de légumes, déficients en acides aminés soufrés mais riches en lysine, afin d'améliorer leur valeur nutritionnelle. La tahina est facilement digestible avec donc une haute valeur nutritionnelle (Sawaya et al., 1985; El-Adawy et Mansour, 2000). Grâce au décorticage des graines de sésame, la majeure partie des oxalates qui chélatent le Ca est éliminée (Sawaya et al., 1985).

La tahina est riche en niacine mais pauvre en pyridoxine et acide pantothénique. Une consommation de 100 g de tahina apporte entre 37,6 et 43,7 % du besoin quotidien en niacine d'un adulte (19-22 ans) (El-Adawy et Mansour, 2000).

Les saveurs de la tahina sont très caractéristiques. Elles sont semblables à celles du sésame grillé, elles mêmes le plus souvent liées à la conduite de la torréfaction (Manley et al., 1974). Ces saveurs sont un mélange de composés hétérocycliques, essentiellement des pyrazines, mais aussi d'autres produits volatiles également générés par la réaction de Maillard. Néanmoins, d'autres produits d'oxydation chimique et enzymatique ainsi que des produits d'autoxydation ont été identifiés dans la purée de sésame, et qui pourraient également participer aux saveurs de l'aliment (Shahidi et al., 1997). Malgré la présence abondante d'antioxydants naturels qui retardent l'oxydation lipidique, cette dernière se manifeste à un niveau assez élevé dès 65 °C (Abou-Gharbia et al., 1996). L'oxydation des lipides de la tahina dépend essentiellement des opérations de prétraitement et/ou de torréfaction des graines de sésame avant moulage (Abou-Gharbia et al., 1996).

Tableau 9. Composition nutritionnelle de la tahina (d'après Sawaya et al., 1985)

Composition	Nutriment	Concentration	
Chimique et minérale	Humidité %	0,7 ± 0,42	
	Protéines brutes %	24,7 ± 1,7	
	Lipides %	58,9 ± 2,54	
	Fibres %	2,3 ± 0,21	
	Cendres %	3,0 ± 0,18	
	Na (mg %)	251 ± 77,23	
	K (mg %)	354 ± 44,1	
	Ca (mg %)	61 ± 27,01	
	P (mg %)	692 ± 7,36	
	Mg (mg %)	362 ± 40,87	
	Fe (mg %)	7,19 ± 0,49	
	Zn (mg %)	7,82 ± 0,68	
	Cu (mg %)	1,96 ± 0,24	
	Mn (mg %)	1,46 ± 0,17	
	Se (mg %)	0,05 ± 0,01	
	Acides gras (g/100g)	Palmitique C16 : 0	9,8 ± 0,15
		Palmitoléique C16 : 1	0,1 ± 0,01
Heptadecanoïque C17 : 0		0,1 ± 0,014	
Stéarique C18 : 0		6,4 ± 0,34	
Oléique C18 : 1		42,4 ± 1,00	
Linoléique C18 : 2		39,7 ± 0,53	
Linoléinique C18 : 3		0,4 ± 0,42	
Arachidique C20 : 0		0,5 ± 0,01	
Béhénique C22 : 0		0,2 ± 0,03	
Acides aminés (g/100g de protéines)	Thréonine	4,04 ± 0,18	
	Valine	5,22 ± 0,3	
	Isoleucine	4,36 ± 0,24	
	Leucine	7,81 ± 0,43	
	Tyrosine T	3,22 ± 0,23	
	Phénylalanine P	5,1 ± 0,31	
	T + P	8,32 ± 0,47	
	Lysine	3,51 ± 0,17	
	Méthionine M	2,47 ± 0,36	
	Cystine C	2,23 ± 0,28	
	M + C	4,7 ± 0,43	
	Tryptophane	1,36 ± 0,05	
	Acide aspartique	9,0 ± 0,44	
	Sérine	5,09 ± 0,26	
	Acide glutamique	21,4 ± 1,87	
	Proline	3,42 ± 0,46	
	Glycine	5,5 ± 0,31	
Alanine	5,24 ± 0,22		
Histidine	2,75 ± 0,14		
Arginine	14,1 ± 1,16		
Vitamines du groupe B (mg/kg)	Thiamine	2,18	
	Riboflavine	1,57	
	Niacine	83,08	
	Pyridoxine	1,73	
	Acide pantothénique	2,42	

V. Conclusions

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, la production des noix et graines a été en constante augmentation durant ces dernières années. Ceci en fait donc un produit d'importance non négligeable sur le marché mondial des produits agroalimentaires. Par ailleurs, les nouveaux arguments apportés par les études épidémiologiques et cliniques récentes sur l'intérêt nutritionnel que revêt la consommation de ces noix et graines, viennent ajouter à leur réputation grandissante en tant qu'aliments de haute valeur nutritionnelle. Ces produits se trouvent sur le marché sous diverses formes, mais il paraît que les noix et graines sous leur forme grillée sont de loin les plus appréciées du consommateur en comparaison avec leur forme crue, du fait de leurs propriétés organoleptiques appétissantes.

Une première analyse bibliographique nous a permis de faire ressortir que la torréfaction est probablement l'étape la plus importante dans le développement de la qualité du produit final, permettant de révéler les caractéristiques organoleptiques des noix et graines transformées. La torréfaction des noix et graines paraît un procédé technologique complexe au cours duquel de multiples réactions entrent en jeu modifiant ainsi la couleur, la flaveur et la texture du produit fini. Au cours de cette phase, la graine subit d'importantes modifications, tant physiques que chimiques comme nous venons de le voir. En même temps que les effets recherchés se développent, la torréfaction engendre cependant des réactions d'altération indésirables induisant la formation de composés suspects de toxicité et réduisant de manière drastique la valeur nutritionnelle tant appréciée des noix et graines. Cette sensibilité au procédé est due à la composition des noix et graines particulièrement riches en acides gras insaturés, mais aussi en protéines. Ceci favorise simultanément les réactions d'oxydation et de Maillard au sein du produit torréfié. Il convient alors d'étudier ces différentes réactions susceptibles de se développer significativement, d'en comprendre les mécanismes réactionnels et d'identifier les facteurs influents, afin de pouvoir les contrôler ultérieurement.

CHAPITRE 2. Réactions d'altération à l'origine de la formation des composés néoformés – Impact sur la qualité nutritionnelle et la sécurité alimentaire des noix et graines

I. Les altérations des lipides des noix et graines

Les graines et fruits oléagineux se distinguent par une teneur élevée en lipides (autour de 50%), composés essentiellement d'acides gras insaturés. Ces acides gras possèdent des propriétés nutritionnelles recherchées et sont impliqués dans la prévention de nombreuses maladies cardiovasculaires et cancéreuses. Cependant, ils sont très sensibles aux réactions d'oxydation. L'hydrolyse et l'oxydation sont les principales voies d'altération des lipides au cours de la production, du stockage et de la transformation des fruits oléagineux (Figure 9). Ces modifications affectent la durée de vie, la qualité organoleptique, nutritionnelle et la sécurité alimentaire de ces fruits.

Les fruits oléagineux contiennent des lipides fonctionnels et de réserve. Les lipides de réserve consistent essentiellement en triacylglycérols servant de source d'énergie mobilisée pour les besoins de la graine. Les lipides fonctionnels consistent en phospho-, glyco-, et sulfolipides, stérols et leurs dérivés, etc., fonctionnant au niveau des membranes, organelles subcellulaires, ou autres particules spécialisées. L'oxydation des lipides de réserve constitue la source majeure de mauvaises saveurs et de dégradation de la qualité des fruits oléagineux transformés (Ory et al., 1985).

Les facteurs affectant la stabilité des lipides des noix et graines incluent les manutentions, la transformation industrielle et les facteurs environnementaux pendant la distribution. Ils comprennent le contact de la lumière avec la graine, le niveau d'oxygène présent pendant le stockage, la présence de métaux catalyseurs d'oxydation, l'humidité entourant la graine, et la quantité de chaleur à laquelle est exposée la graine pendant la torréfaction (O'keefe et al., 1993). Contrôler tous ces facteurs revêt une grande importance afin de maintenir une bonne qualité du produit fini.

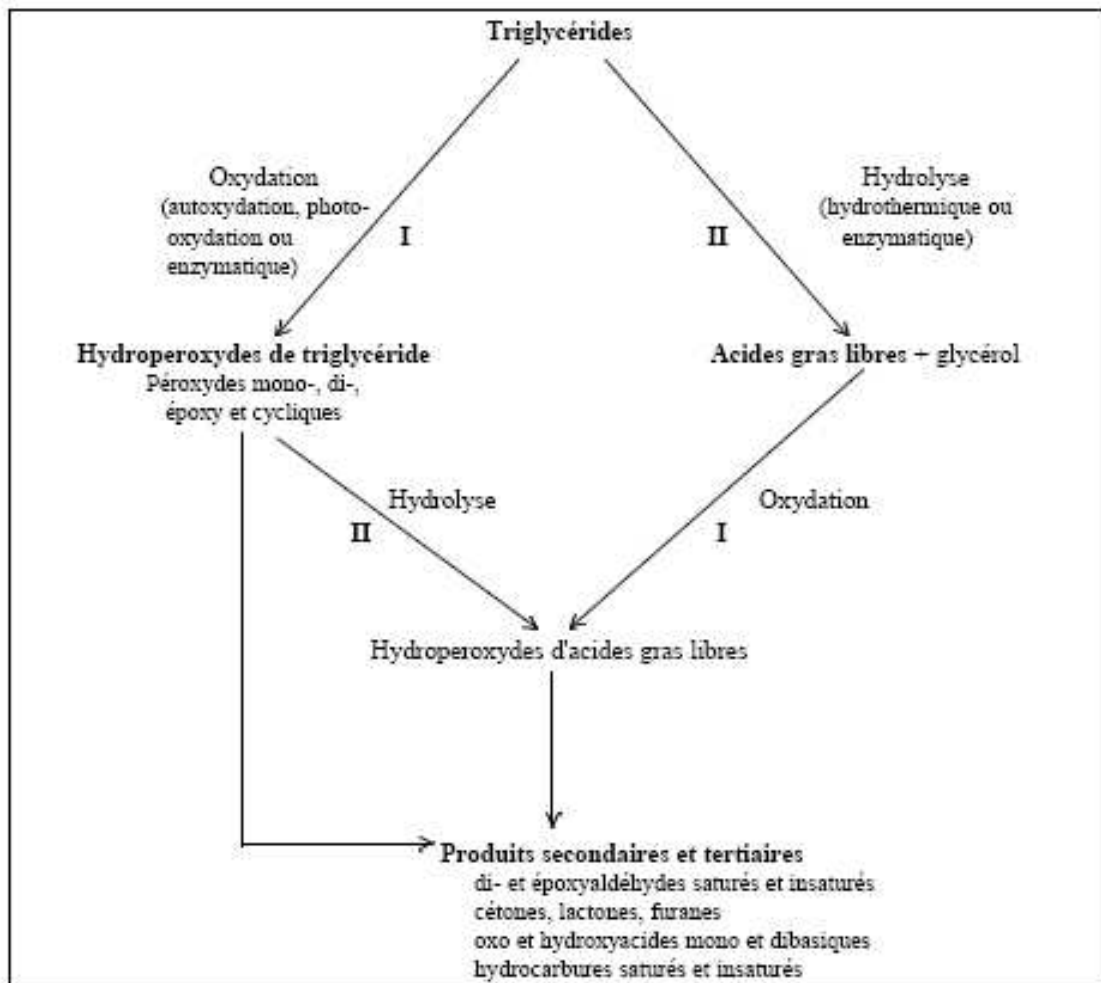


Figure 9. Schéma simplifié des voies d'altération des lipides.

I.1. La lipolyse

L'hydrolyse des lipides est principalement le fait d'enzymes lipolytiques. Chez les noix et graines, il s'agit de lipases, de phospholipases et d'estérases. Les lipases et les estérases hydrolysent les liaisons esters des glycérides et libèrent à partir des triglycérides des acides gras, des diglycérides et des monoglycérides. Les acides gras libres formés peuvent ensuite servir de substrats pour les réactions d'oxydation (Lopez et al., 1997b,c). Cependant, ces enzymes lipolytiques situées juste sous la pellicule des noix et graines ne peuvent pas attaquer les lipides dans les cellules non endommagées à cause de la structure particulière des oléosomes (empaquetage et protection des lipides de réserve) (Riedl et Mohr, 1979).

Ces activités enzymatiques sont indépendantes de l'oxygène. Celle des lipases dépend en premier lieu de la teneur en eau. Le degré de maturité de la graine détermine le niveau d'activité des lipases. La torréfaction réduit significativement cette activité (Grosch et al., 1983). Cependant, les estérases sont stables à la chaleur et peuvent rester actives même après la torréfaction (Keme et al., 1983). Vu que la torréfaction détruit la microstructure des graines, ces enzymes peuvent se trouver en contact intime avec leurs substrats, les lipides, réduisant alors la stabilité des noix et graines grillées au cours du stockage.

I.2. L'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

- l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase a surtout lieu dans les fruits crus, avant la transformation industrielle (récolte, transport, séchage, blanchiment, entreposage) (St Angelo, 1996).
- l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres : a surtout lieu pendant et après la transformation industrielle des noix et graines (St Angelo, 1996).

I.2.1 L'oxydation enzymatique

Le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés des fruits oléagineux peut être d'origine enzymatique. L'enzyme principalement impliquée est la lipoxygénase (St Angelo, 1996). La lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique, et aboutit à la formation d'hydroperoxydes. Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est donc souvent couplée avec celle des lipases et phospholipases.

L'oxydation enzymatique peut avoir lieu à basse température. Les lipoxygénases et les peroxydases peuvent être activées par des ruptures au niveau des membranes cellulaires, causées par des endommagements physiques au niveau des graines, mettant l'enzyme et le substrat en contact (Hadorn et al., 1977 ; Keme et al., 1983). Plus la durée du stockage avant la transformation industrielle est longue, plus la détérioration enzymatique sera prononcée (Ory et

al., 1985). Les lipoxygénases sont inactivées à des températures supérieures à 60°C, température à partir de laquelle l'oxydation non enzymatique est favorisée.

I.2.2 L'auto-oxydation

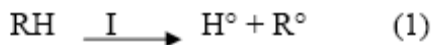
Dans le cas du chauffage des aliments riches en lipides, les phénomènes oxydatifs mettent en jeu des réactions complexes, qui associent une dégradation oxydative (autoxydation) et une dégradation thermique des acides gras libres ou estérifiés. L'autoxydation des acides oléique (C18 :1 n-9) et linoléique (C18 :2 n-6) produit la plupart des substances rances dans les noix (Grosch et al., 1983 ; Keme et al., 1983 ; Kinderlerer et Johnson, 1992 ; Fourie et Basson, 1989), tandis que dans les cacahuètes, c'est l'acide linoléique (C18 :2 n-6) qui est le plus touché (Mate et al., 1996).

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes (Figure 10). Une première réaction produit un radical libre par élimination d'un hydrogène labile de l'acide gras insaturé (initiation), la plupart du temps adjacent à la double liaison. Puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs espèces radicalaires dérivées de l'acide gras (propagation) qui se combinent pour former des composés non radicalaires (terminaison).

I.2.2.1 Mécanisme réactionnel de l'oxydation (d'après Bolland et Gee, 1946)

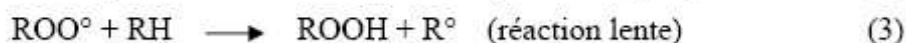
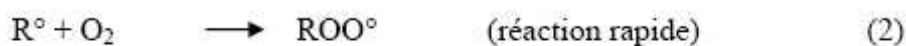
Initiation

En présence d'un initiateur (I), les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former sur l'acide gras touché, un radical libre centré sur le carbone (R°) (radical lipoylé).



Propagation

Le radical lipoylé, très réactif, fixe une molécule d'oxygène, pour former un radical hydroperoxyde instable, centré sur l'oxygène (2). Celui-ci arrache à son tour un hydrogène labile d'un deuxième acide gras, formant un hydroperoxyde non radicalaire plus stable (3), mais générant une nouvelle espèce radicalaire sur le deuxième acide gras.



Topallar et al. (1997) ont montré que la sensibilité des acides gras insaturés à l'oxydation dépend de la capacité de l'hydrogène allylique à réagir avec un radical hydroperoxyde. L'acide linoléique (C18 :2 n-6), après action de l'oxygène, donne essentiellement 2 hydroperoxydes isomères. Les hydroperoxydiènes conjugués, qui résultent du départ d'un hydrogène allylique (13-OOH et 9-OOH) sont très majoritaires par rapport aux autres (12-OOH et 10-OOH). L'acide linoléique (C18 :2 n-6) forme lui aussi 2 hydroperoxydes 12-OOH et 10-OOH, les formes 12-OOH et 10-OOH étant majoritaires. L'acide linoléique (C18 :2 n-6) forme lui aussi 2 hydroperoxydes 13-OOH et 9-OOH, les formes 13-OOH et 9-OOH étant majoritaires. L'acide linoléique (C18 :2 n-6) forme lui aussi 2 hydroperoxydes 12-OOH et 10-OOH, les formes 12-OOH et 10-OOH étant majoritaires.

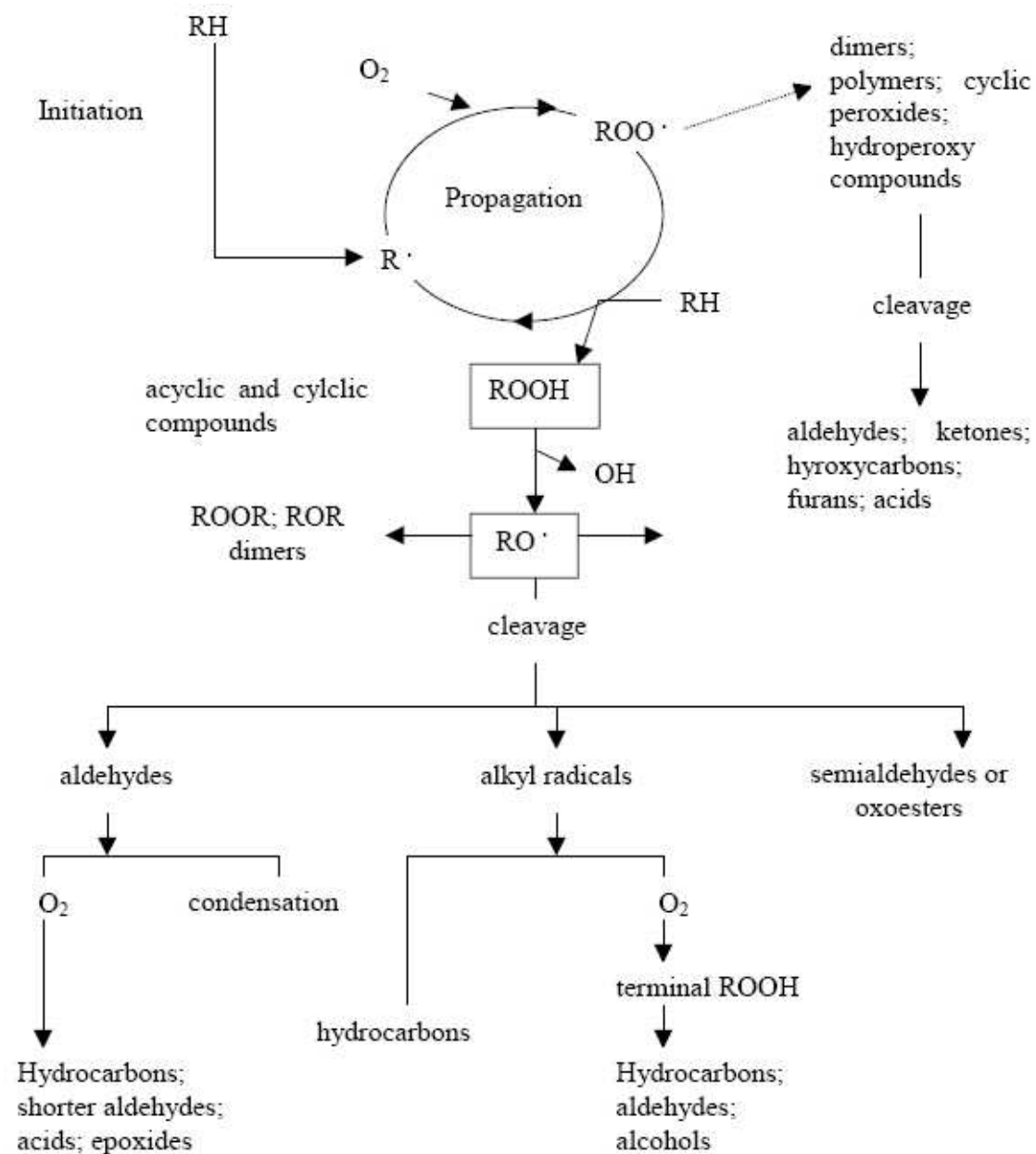
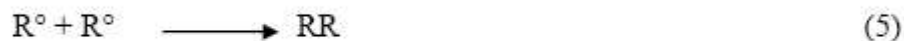
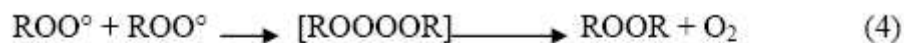


Figure 10. Schéma résumant l'autoxydation dans les aliments (d'après Nawar, 1996)

Terminaison

Pendant cette phase, les espèces radicalaires réagissent entre elles pour donner des espèces non radicalaires, mettant ainsi fin aux cycles réactionnels.



I.2.2.2 Produits formés au cours de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides conduit à la formation de produits primaires : hydroperoxydes, radicaux libres, diènes conjugués, très instables et rapidement décomposés en produits secondaires : aldéhydes, alcools, cétones. Ainsi, lors du développement des réactions d'oxydation vont successivement apparaître les produits primaires et secondaires de l'oxydation (Figure 9).

Produits primaires

Des radicaux libres sont formés au cours des phases d'initiation et de propagation de la réaction d'oxydation des lipides. Ces espèces très instables et très réactives sont des composés cytotoxiques susceptibles d'induire des altérations des molécules d'ADN (Kanazawa et al., 2000) et des protéines. Les diènes conjugués, se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé des acides gras polyinsaturés. Les hydroperoxydes sont des produits intermédiaires de l'oxydation des lipides sans odeur spécifique, ils se décomposent rapidement à la chaleur. Ce sont les précurseurs des composés volatils.

Les vitesses d'oxydation des acides gras sont approximativement 1:10:100:200 pour les acides stéarique (C18:0), oléique (C18:1 n-9), linoléique (C18:2 n-6) et linoléique (C18:3 n-3) respectivement (O'keefe et al., 1993).

Produits secondaires

Réarrangements intermoléculaires

Une fois les radicaux formés, il se produit de nombreux réarrangements : formation de radicaux endoperoxydes, via des endoperoxydes bicycliques et la formation de malondialdéhyde (MDA) (Janeiro, 1990), bien que d'autres voies soient aussi proposées par Dhale et al. (1962) ou Pryor et al. (1976) pour la formation du MDA.

Scissions des hydroperoxydes

La voie majoritaire de scission des hydroperoxydes donne lieu à des radicaux hydroxyles (OH*) et des oxyradicaux (RO*). Ces derniers engendrent divers produits d'oxydation ainsi que de nouveaux radicaux très réactifs pouvant entretenir la réaction ou réagir avec d'autres espèces chimiques (comme les amines, par exemple). Le remaniement des hydroperoxydes peut évoluer

vers des fonctions époxydes, cétones, hydroxyles, furanes plus stables, avec des possibilités de cumul sur une même chaîne.

Les hydroperoxydes ne sont pas une espèce chimique très stable à température ambiante, et cela est d'autant plus vrai que la température augmente. Chan et al. (1976) ont montré que les hydroperoxydes se décomposent spontanément au-dessus de 150°C. Lors de cette décomposition, la teneur en radicaux augmente rapidement et conduit à des réactions de terminaison. A des températures plus faibles (60-120°C), la décomposition des hydroperoxydes peut avoir lieu, via la formation d'esters avec d'autres acides gras. Pokorny et al. (1976) et Asakawa et al. (1980) ont montré que les sels de fer catalysent la scission des hydroperoxydes de l'acide linoléique (C18 :2 n-6) et linoléique (C18 :3 n-3), pour former du MDA.

Produits d'interaction entre les produits d'altération des lipides et les protéines

Les hydroperoxydes et les produits secondaires issus de l'oxydation des lipides interagissent avec les protéines et les acides aminés (tableau 10). Ces interactions ont un impact important sur la dégradation des propriétés fonctionnelles, sensorielles et nutritionnelles des aliments (Pokorny, 1977). La nature de ces interactions dépend du stade de l'oxydation des lipides c'est à dire de la teneur respective en hydroperoxydes et en produits secondaires (Ladikos et Lougovois, 1990).

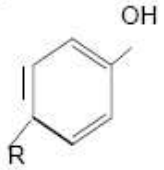
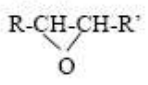
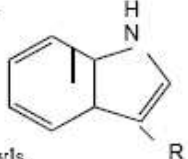
Les hydroperoxydes sont très réactifs avec les groupements aminés et sulphydryles des protéines. La réaction d'un hydroperoxyde avec un groupe α -aminé conduit à la formation d'un aldéhyde tandis que la réaction d'un hydroperoxyde avec un groupe ϵ -aminé libre d'une lysine conduit à la formation d'une imine. Les modifications chimiques induites par les interactions entre les hydroperoxydes de lipides et les protéines se traduisent par la formation de polymères protéine-protéine ou des produits d'addition lipide-protéine, entraînant une altération des acides aminés tels que les acides aminés essentiels réactifs, lysine, cystéine, méthionine et tryptophane (Gardner, 1979). En conséquence, on note une baisse de la valeur nutritionnelle des protéines.

Les composés carbonylés, notamment les aldéhydes, issus de l'oxydation des lipides réagissent avec les groupements aminés des protéines et forment ainsi des bases de Schiff. Les aldéhydes réagiraient préférentiellement avec les groupements thiol des cystéines et les groupements ϵ -aminés des lysines (Gardner, 1979). Les réactions du MDA avec les protéines conduisent à la formation de groupements carbonyles au niveau des chaînes d'acides aminés (Burcham et Kuhan,

1996). La solubilité et les propriétés rhéologiques des protéines sont affectées par les réactions entre les produits d'oxydation des lipides et les protéines.

Les liaisons contractées entre les produits d'oxydation des lipides et les protéines sont de trois types : liaison covalente, liaison ionique, liaison hydrogène entre les groupements polaires des lipides oxydés et les protéines (Pokorny, 1977).

Tableau 10. Groupements réactifs des produits d'oxydation des lipides et des protéines intervenant dans les réactions d'interaction lipides-protéines (d'après Pokorny, 1977).

Nature de la liaison formée	Groupements réactifs des produits d'oxydation des lipides	Groupements réactifs des protéines	
Liaisons covalentes	Hydroperoxydes R-OOH	Amines primaires R-NH ₂	
	Aldehyde saturé R-CH ₂ -CHO	Amines secondaires R-NH-R'	
	Aldehyde insaturé R-(CH=CH) _n -CHO	Thiols R-SH	
	Cétones R-CH=CH-CO-R'	Sulfures R-S-R'	
	Cétols R-CHOH-CO-R'	Disulfures R-S-S-R'	
	Bicétone R-CO-CO-R'	Phénols 	
	Epoxydes 	Indoles 	
	Liaisons hydrogène	Hydroxyls R-CH=CH-CHOH-R'	Hydroxyls R-OH
		Dihydroxyls R-CHOH-CHOH-R'	Liaison peptidique R-CO-NH-R'
		Carboxylique R-COOH	Carboxylique R-COOH

I.2.2.3 Les initiateurs de l'oxydation des lipides

La phase d'initiation de l'oxydation des lipides peut être déclenchée par plusieurs facteurs : les formes activées de l'oxygène, les métaux ou la chaleur (Frankel, 1998).

Initiation par les formes activées de l'oxygène

L'oxygène moléculaire est, dans son état fondamental, à l'état triplet. Il ne peut réagir directement avec les lipides car la barrière de spin est trop élevée. La réaction de l'oxygène avec

les acides gras insaturés est rendue possible par le départ d'un hydrogène d'une chaîne d'acide gras sous l'influence de différents initiateurs comme les ions des métaux de transition, et les formes activées de l'oxygène comme le radical hydroxyle. Le radical hydroxyle est très réactif, il peut arracher un hydrogène et former ainsi un radical alkyle qui va initier la peroxydation lipidique.

Initiation par les métaux

Les métaux de transition jouent un rôle important dans la génération des radicaux libres de l'oxygène, ils sont les premiers activateurs des molécules d'oxygène. L'initiation de l'oxydation lipidique par les métaux peut se faire par transfert d'électron ou par formation de complexes de transition ou de complexes avec le peroxyde d'hydrogène, qui catalysent l'auto-oxydation et la décomposition par la réaction redox (Frankel, 1998).

Les noix et graines sont très riches en métaux de transition, surtout le fer et le manganèse. Selon leur forme, ils catalysent à des vitesses variables l'oxydation des acides gras insaturés dans les graines grillées, même à des températures de stockage aussi faibles que 4°C (Cuq, 1992 ; St Angelo et Ory, 1975).

Facteurs environnementaux

Les principaux facteurs impliqués dans l'oxydation des lipides au cours des procédés de transformation des aliments sont : la température, le pH, l'activité de l'eau et la pression partielle en oxygène.

Une élévation de température favorise l'oxydation des lipides. L'oxydation des lipides est d'autant plus rapide que la température est importante : le départ des hydrogènes allyliques et la décomposition des hydroperoxydes en produits secondaires sont favorisés. Il est à noter cependant, que la solubilité de l'oxygène diminue quand la température augmente. Il existe donc un antagonisme entre ces deux paramètres. A basse température, la solubilité de l'oxygène est élevée: la température devient alors le facteur limitant de la peroxydation lipidique.

Le pH influence le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes (Genot et al., 2003). Premièrement, pour les réactions d'oxydo-réduction faisant intervenir des protons (H⁺) le potentiel redox décroît linéairement avec le pH. Un pH acide favorise donc la réaction d'oxydation, en particulier quand des espèces pro-oxydantes ou antioxydantes solubles en phase

aqueuse sont présentes. Le pH intervient également dans la solubilité des composés impliqués dans l'initiation de la réaction. Ainsi, plus le pH est bas, plus la solubilité et le potentiel redox de ces ions métalliques, et donc leur réactivité vis à vis des molécules oxydables est élevée.

L'activité de l'eau (a_w) d'un système influence les réactions d'oxydation des lipides. Par définition, l' a_w est le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau d'un produit sur la pression partielle de vapeur d'eau saturante exercée par l'eau pure à la même température.

L'effet de l'eau est lié aux propriétés de solvation des ions et des radicaux libres et à son activité chimique. Par solvation, l'eau permet la mobilisation des substances pro oxydantes ou antioxydantes. Elle interagit avec les cations métalliques et les rend plus ou moins disponibles dans la catalyse des réactions d'oxydation. En général, en présence de métaux de transition solubles, une a_w voisine de 0,3 (entre 0,3 et 0,4) correspond aux vitesses d'autoxydation les plus faibles. Ces valeurs correspondent à la formation d'une couche monomoléculaire d'eau autour des constituants. Une a_w comprise entre 0,6 et 0,8 correspond aux vitesses d'oxydation les plus grandes (Figure 11). Une très faible activité de l'eau est également favorable à l'oxydation (Frankel, 1998).

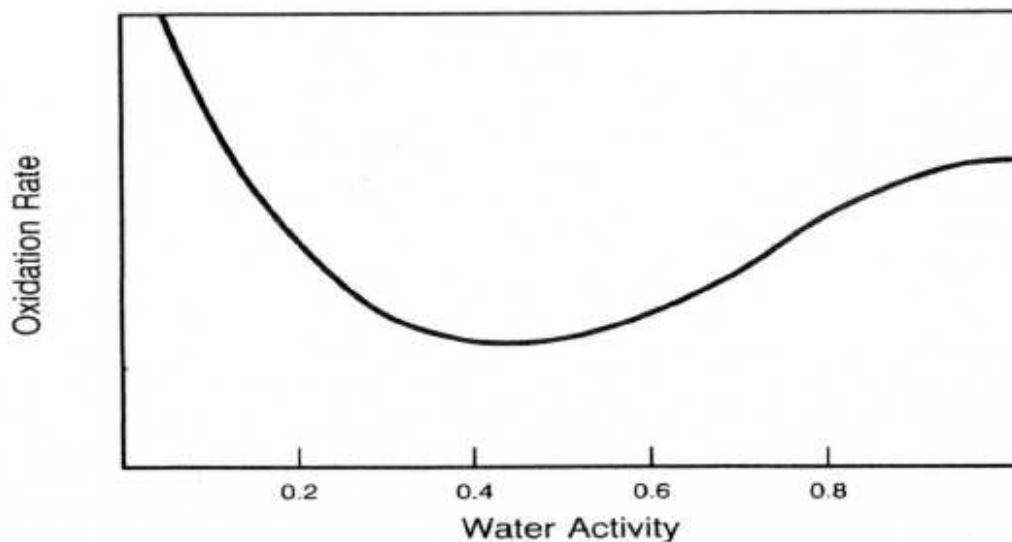


Figure 11. Effet de l'activité de l'eau sur la vitesse d'oxydation des lipides (d'après Nawar, 1996).

L'activité de l'eau joue un rôle important dans l'oxydation des noix et graines. Les noix et les cacahuètes s'oxydent moins et donc se conservent plus longtemps à des a_w intermédiaires (Mate et al., 1996). Evranuz (1993) a montré que les cacahuètes grillées s'oxydent plus rapidement pour des teneurs en eau faibles ($1,4 \pm 0,02\%$) et élevées ($3,9 \pm 0,06\%$), par comparaison à des teneurs

en eau intermédiaires ($2,2 \pm 0,04\%$) à cause du rôle protecteur de la couche monomoléculaire de l'eau contre l'oxydation des lipides (une a_w de 0,3 correspond à une teneur en eau des couches monomoléculaires des cacahuètes de 2,1%). La vitesse de la réaction procède en diminuant jusqu'à une valeur de a_w égale à 0,4 (teneur en eau de 3%), puis augmente à des valeurs plus élevées. Mais puisque le caractère croquant des cacahuètes grillées est perdu au delà d'une teneur en eau de 3%, alors cette dernière doit être maintenue à un niveau plus faible, même si elle est plus propice à l'oxydation (Shewfelt et Young, 1977 ; Evranuz, 1993 ; Mate et al., 1996). Contrairement aux cacahuètes grillées, la vitesse d'oxydation minimale des noisettes grillées correspond à la teneur en eau des couches monomoléculaires, alors qu'elle augmente en dessous et en dessus de cette valeur. Ceci a été attribué au mécanisme enzymatique de l'oxydation des lipides des noisettes (Mate et al., 1996).

Le choix de la teneur en eau initiale antérieurement à la torréfaction conditionne fortement la qualité du produit grillé.

La concentration d'oxygène (pression partielle en oxygène) dans l'espace environnant le produit et dans le produit lui-même influence la vitesse d'oxydation. Elle intervient également au niveau de la nature des produits secondaires formés par décomposition des hydroperoxydes. Son incidence porte donc à la fois sur la durée de conservation du produit et la nature des odeurs perçues quand le produit est oxydé. La relation entre vitesse d'oxydation et pression partielle en oxygène dépend de facteurs comme l'activité de l'eau, la température, la nature des catalyseurs. Selon les équations théoriques, quand la concentration en oxygène est suffisamment élevée, la vitesse d'oxydation est indépendante de cette concentration, puisque l'oxygène n'est plus le facteur limitant. Inversement, quand la concentration d'oxygène est faible, la vitesse d'oxydation est indépendante de la concentration en substrat et directement proportionnelle à la concentration d'oxygène. Pour les concentrations intermédiaires, la vitesse d'oxydation dépend à la fois des concentrations en oxygène et en substrat. En l'absence d'oxygène, l'oxydation des noix et graines est ralentie même à température ambiante entre 18 et 25°C (Keme et al., 1983 ; Mate et al., 1996).

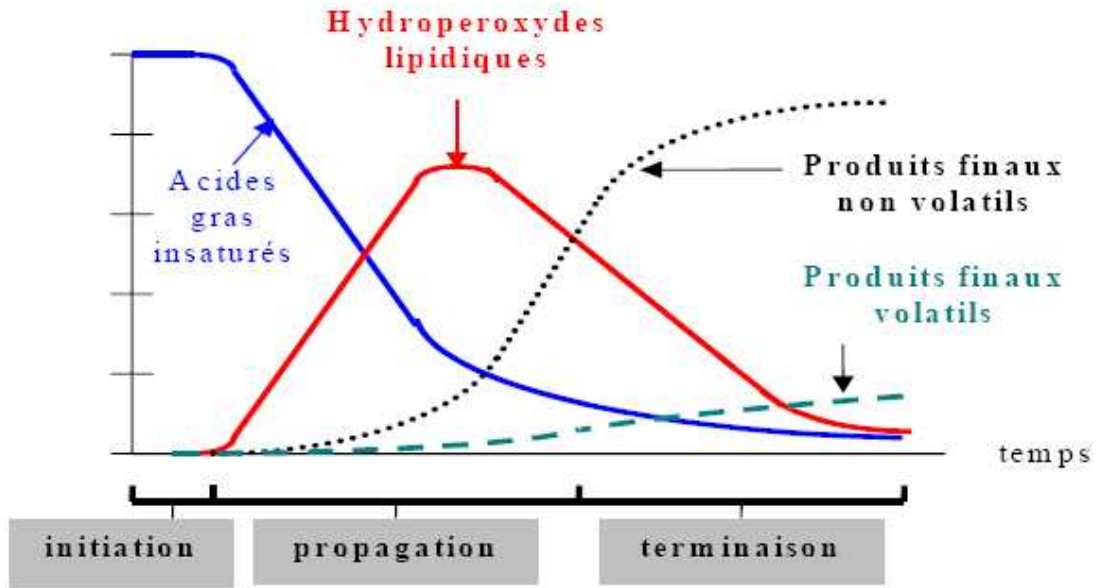


Figure 12. Schématisation de la cinétique d'oxydation des acides gras insaturés.

I.2.2.4 Nature et mode d'action des antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme "toute substance capable de retarder ou de ralentir le rancissement, la décoloration ou l'apparition de saveurs indésirables dues à l'oxydation". Ainsi, l'antioxydant peut augmenter la durée de vie d'un aliment et réduire les pertes en vitamines ou en acides gras essentiels. L'effet retard est directement mesurable sur la cinétique d'oxydation d'un acide gras. Le temps de demi-vie de l'acide gras est augmenté par des concentrations croissantes en antioxygène ajouté dans le milieu. Mais de fortes concentrations en antioxydants pourraient être responsables d'un effet prooxydant, comme cela a été démontré pour l' α -tocophérol (Cillard et al., 1980). En effet, si la concentration de la forme radicalaire de l'antioxydant produite par oxydation, augmente trop, celle-ci peut se comporter en initiateur de la peroxydation lipidique. Dans tous les cas, la durée de la protection de l'aliment est temporaire, l'antioxygène sous sa forme active disparaissant progressivement du milieu.

Les antioxydants phénoliques

De nombreux phénols font partie des antioxydants primaires, réagissant avec des radicaux lipidiques, en les convertissant en des produits thermodynamiquement plus stables (Shahidi et al., 1992) (figure 13).

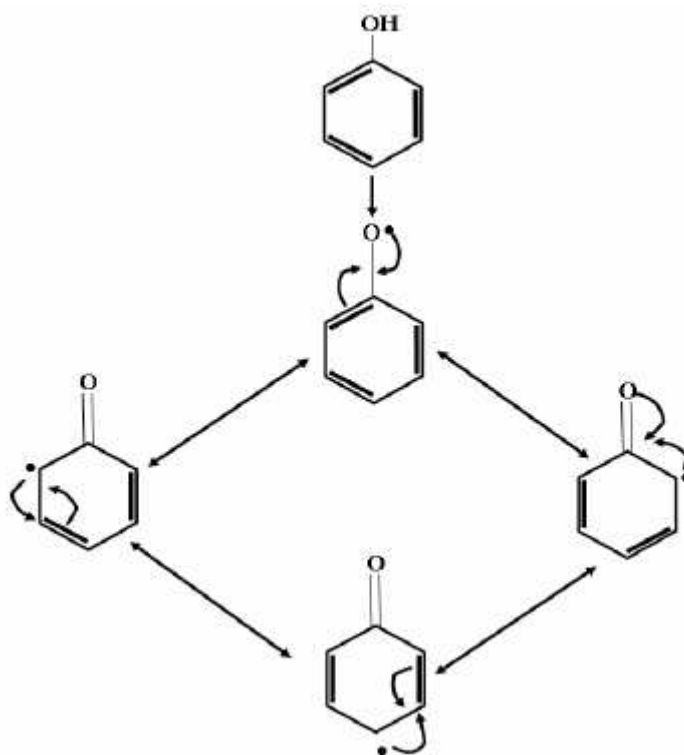


Figure 13. Activité antioxydante des composés phénoliques.

Les antioxydants les plus efficaces sont ceux qui ont les énergies de liaisons les plus faibles au niveau du groupe donneur d'hydrogène.

L'efficacité des antioxydants phénoliques est due en particulier à la stabilisation des radicaux phénoxyliques par la délocalisation des électrons autour du cycle aromatique. L'efficacité d'un composé phénolique dépend également du nombre de fonction OH à hydrogène labile.

Les graines et fruits oléagineux sont riches en polyphénols. Leur teneur en polyphénols totaux peut atteindre des valeurs d'ordre 1625 mg équivalent acide gallique/100g (Kornsteiner et al., 2006). Ils contiennent des substances phénoliques telles que l'acide gallique, acide *p*-hydroxy benzoïque, epicatéchine, acide caféique, acide sipanique, quercétine, et lutéoléine (tableau 5). Ces extraits phénoliques peuvent être ajoutés aux aliments en tant qu'antioxydants naturels (Andreoni, 1996). Les amandes sont riches en flavonoïdes et acides phénoliques. Les flavonoïdes prédominants sont : isorhamnétin 3-O-rutinoside et isorhamnetin-3-O-glucoside (en combinaison), catéchine, kaempférol-3-O-rutinoside, epicatéchine, quercétin-3-O-galactoside, et isorhamnétin-3-O-galactoside (Milbury et al., 2006). Dans les pistaches on trouve quercétine, lutéoléine, eriodictyol, rutine, naringénine, apigénine, et les anthocyanines, cyanidin-3-

galactoside et cyanidin-3-glucoside (Seeram et al., 2006). Lou et al. (2004) ont identifiés plusieurs procyanidines et épicatechines, capteurs de radicaux libres, dans les cacahuètes. Dans les graines de sésame, plusieurs composés phénoliques associés aux lignanes tels que le sésamolinol, pinorésinol, sésaminol et sésamol se sont révélés comme antioxydants (Kumazawa et al., 2003).

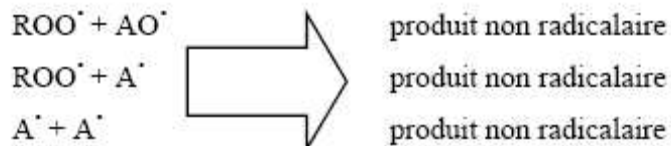
L'impact des phénols sur le rancissement des graines et fruits oléagineux a été peu évalué. En revanche, des études portant sur l'intérêt de l'addition d'extraits phénoliques de ces fruit et graines dans d'autres aliments ont été décrites (Andreoni, 1996). Duh et Yen (1997) ont pu démontrer que des composés antioxydants d'extraits méthanoliques obtenus à partir des enveloppes des cacahuètes présentent une efficacité antioxydante dans les huiles de cacahuètes et de soja. De même, ces composés phénoliques ont présenté des propriétés antioxydantes dans l'huile de tournesol (Nepote et al., 2002). Mohamed et Awatif (1998) ont montré que l'addition de la matière insaponifiable extraite des graines de sésame augmente la stabilité de l'huile de tournesol. Cette stabilité est encore plus prononcée dans le cas où la matière insaponifiable est obtenue à partir de graines de sésame grillées. Cet effet est probablement dû à l'action synergique du sésamol, formé lors de la décomposition de la sésamoline au cours de la torréfaction (Mohamed et Awatif, 1998). Chang et al. (2002) ont aussi rapporté que l'extrait méthanolique des enveloppes des graines de sésame possède une activité antioxydante similaire au tocophérol dans un système modèle formé d'acide linoléique (C18 :2 n-6). Dans le même esprit, Shahidi et al. (2006) ont observé que les graines de sésame et leurs enveloppes possèdent une activité antioxydante considérable. Yoshida et Takagi (1999) ont même montré que le sésamol ajouté à un taux de 800 mg/kg est plus efficace que les tocophérols (α , δ et γ) ajoutés individuellement à la même concentration dans la stabilisation de l'huile. Le sésamol posséderait une action synergétique avec le γ -tocophérol (Fukuda et al., 1986 ; Yoshida et Takagi, 1999). Récemment, Kumazawa et al. (2003) ont mesuré une augmentation de la concentration en sésaminols dans des graines de sésame au cours de la torréfaction. En effet, les sésaminols se trouvent sous forme de glycoside dans la graine crue. Or, ils sont dépourvus d'activité antioxydante sous cette forme. On pense que ces sésaminols se décomposent pendant la torréfaction pour donner des formes aglycones possédant une activité antioxydante et contribuant à la stabilité des huiles de sésame grillé (Kumazawa et al., 2003).

Les tocophérols

Les tocophérols permettent de piéger les radicaux libres :



Réactions minoritaires :



Les tocophérols sont présents dans les fruits oléagineux en quantité non négligeable, sous leurs différentes formes α , β , γ , δ ; les formes α (33 et 24 mg/100g de lipides dans les noix de macadamia et les amandes respectivement) et γ (29.3 mg/100g de lipides dans les pistaches) étant les plus fréquentes (Kornsteiner et al., 2006). Les tocophérols sont des dérivés du 8-méthylchroman-6-ol, possédant une chaîne latérale de 3 unités terpènes saturées. Lorsque ces chaînes sont insaturées, on parle de tocotriénols. Les tocophérols et certains dérivés possèdent des propriétés antioxydantes, c'est à dire la capacité à céder des atomes d'hydrogène à des radicaux libres afin de les stabiliser. A forte concentration (> à 4%), les tocophérols deviennent oxydants. En revanche, à des concentrations plus basses, ils contribuent à augmenter la stabilité vis-à-vis de l'oxydation, particulièrement pour des lipides à haute teneur en acide oléique (C18 :1 n-9).

Les tocophérols sont des antioxydants classés comme antioxydants de rupture de chaîne, c'est à dire qu'ils agissent au niveau de l'étape de propagation et de terminaison. L' α - tocophérol est le plus antioxydant, le δ -tocophérol le moins, cette activité étant directement liée à la vitesse d'oxydation du vitamère. Outre l'inhibition de l'autooxydation des acides gras polyinsaturés, les tocophérols permettent d'orienter les produits de l'autooxydation (Léger, 1992).

La forme α -tocophérol est celle qui a la plus grande activité vitaminique (vitamine E), car elle seule est retenue par le foie grâce à des récepteurs spécifiques, pour être incorporée dans les lipoprotéines circulantes. Mais c'est aussi la forme la moins stable lors du chauffage. Chen et al., (2002) ont montré qu'un mélange de tocophérols était plus efficace vis-à-vis de la peroxydation lipidique que l' α -tocophérol seul.

I.3. L'isomérisation *trans* des lipides

Outre l'autooxydation, les lipides des aliments peuvent subir une isomérisation *trans* pendant leur transformation industrielle.

Comme pour toute chaîne carbonée, une double liaison sur un acide gras peut s'arranger selon deux géométries possibles : soit une configuration *cis* – les deux atomes d'hydrogène du même côté du plan de la liaison –, cas le plus fréquent dans la nature, notamment pour les AG alimentaires, soit une configuration *trans* – les deux atomes d'hydrogène sont de part et d'autre du plan de la liaison –, cas moins fréquent (Figure 14) (Adrian et al., 1999). Un Acide gras *trans* (AG *trans*) est un acide gras insaturé possédant une ou plusieurs doubles liaisons de configuration géométrique *trans*, c'est-à-dire dont les substituants (ou les atomes d'hydrogène) se situent de part et d'autre du plan de la liaison (Adrian et al., 1999).

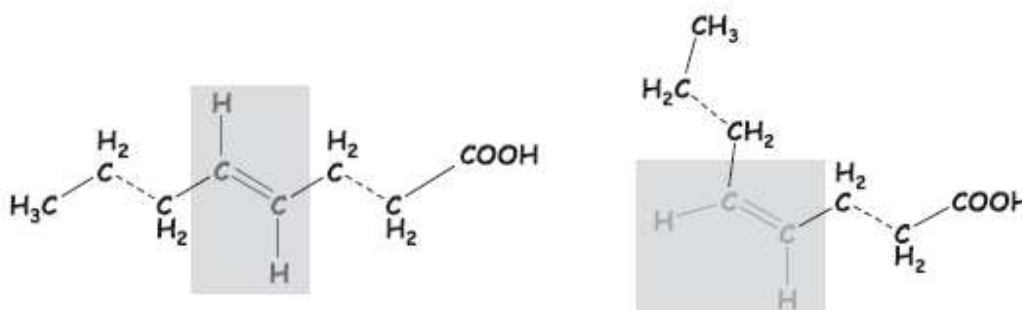


Figure 14. Isoméries géométriques *trans* (à gauche) et *cis* (à droite).

La configuration géométrique *trans* des doubles liaisons conserve approximativement la linéarité de la chaîne carbonée insaturée de manière similaire à celle d'un AG saturé. La chaîne insaturée de configuration *trans* devient alors plus rigide que son homologue *cis*. Au contraire des doubles liaisons *trans*, les doubles liaisons *cis* provoquent en effet l'incurvation des chaînes carbonées. La présence de la configuration *trans* permet donc d'augmenter le point de fusion d'un acide gras insaturé, ainsi que d'autres paramètres « physico-chimiques » de la molécule tels que la polarité globale de l'acide gras, ce qui permet dans certaines conditions chromatographiques de séparer les isomères *cis* des isomères *trans*. Les liaisons *trans* modifient également les propriétés spectrométriques (absorption UV, infrarouge, etc.) des acides gras, point intéressant pour leur identification.

Les AG *trans* présents dans les aliments proviennent de trois origines principales :

- La **biohydrogénation ruminale** et différentes réactions enzymatiques annexes, responsables de la présence d'AG *trans* dans le lait et les denrées alimentaires issues des ruminants (viande, produits d'origine laitière) ;
- L'**hydrogénation catalytique** partielle d'huiles ou de graisses, responsable de la présence d'AG *trans* dans les huiles partiellement hydrogénées et les « shortenings » (margarines et mélanges de matières grasses anhydres destinés principalement à l'industrie) ;
- Les **traitements thermiques**, responsables de la formation d'AG *trans* dans les huiles, les graisses, et tout aliment contenant des corps gras. Ils peuvent être d'origine industrielle ou domestique.

Dans ce chapitre, on va s'intéresser uniquement aux acides gras *trans* issus des traitements thermiques.

Les traitements thermiques des huiles et graisses (désodorisation lors du raffinage, cuisson, fritures, grillades, etc.) génèrent des AG *trans*. Contrairement à l'hydrogénation catalytique, le chauffage induit peu d'isomères 18:1-*trans*, mais surtout des acides di- et tri-énoïques mono-voire di-*trans*. Les traitements thermiques produisent surtout des isomères géométriques, peu d'isomères positionnels (ex acide vaccénique): les doubles liaisons migrent peu ou pas, mais s'isomérisent de *cis* en *trans* (Wolff et Sébédio, 1991 ; Wolff, 1993).

La littérature mentionne principalement l'effet du chauffage sur l'acide linoléique 18:2 9*c*,12*c* (n-6) et l'acide α -linoléique 18:3 9*c*,12*c*,15*c* (n-3) (Ackman et al., 1974, Sébédio et al., 1988, Sébédio et Chardigny, 1998 ; Wolff, 1995). Cependant certaines publications font état de l'isomérisation de l'acide γ -linoléique 18:3 6*c*,9*c*,12*c* (Wolff et Sébédio, 1994). Les isomères formés et les taux d'AG *trans* produits dépendent surtout de la température, mais également du temps d'application du traitement (Devinat et al., 1980, Grandgirard, 1992 ; Wolff, 1995).

II. La réaction de Maillard

La réaction non enzymatique entre sucres et groupements aminés a été pour la première fois décrite en 1908 par les deux Anglais Ling et Malting qui étudiaient le développement de la couleur dans la bière. En 1912, Louis Camille Maillard, chimiste français, a découvert que la réaction non enzymatique à haute température entre des sucres réducteurs et des acides aminés conduit au développement d'une coloration brune (Maillard, 1912). C'est en travaillant sur la

synthèse des protéines qu'il a découvert une succession de réactions entre sucres réducteurs et acides aminés. En voulant obtenir une méthode de synthèse des peptides, Maillard a utilisé des sucres à la place du glycérol pour étudier la formation de polypeptides par la réaction d'acides aminés avec des oses. Il a montré que les fonctions aldéhydes sont beaucoup plus réactives que les groupements hydroxyles. Ces expériences l'ont amené à la découverte de la réaction qui porte aujourd'hui son nom. Il faut attendre 1953 pour voir publier un rapport par Hodge dont le remarquable schéma général sur le mécanisme de brunissement dans des systèmes amine-sucres (figure 15A) sert encore aujourd'hui de référence (Hodge, 1953). Son étude complète et développe les découvertes de Maillard. Depuis, de nombreuses études ont précisé l'intérêt agronomique ou médical des produits de cette réaction. Cette réaction, aujourd'hui connue des professionnels du secteur alimentaire, est finalement la première cause du brunissement des aliments chauffés. Les industries agro-alimentaires s'y intéressent tout particulièrement car cette réaction conditionne fortement la formation d'arômes et le développement de textures croustillantes. Paradoxalement d'autres études ont montré l'apparition, à chaque grande étape de cette réaction, de composés moins désirables, voire potentiellement toxiques.

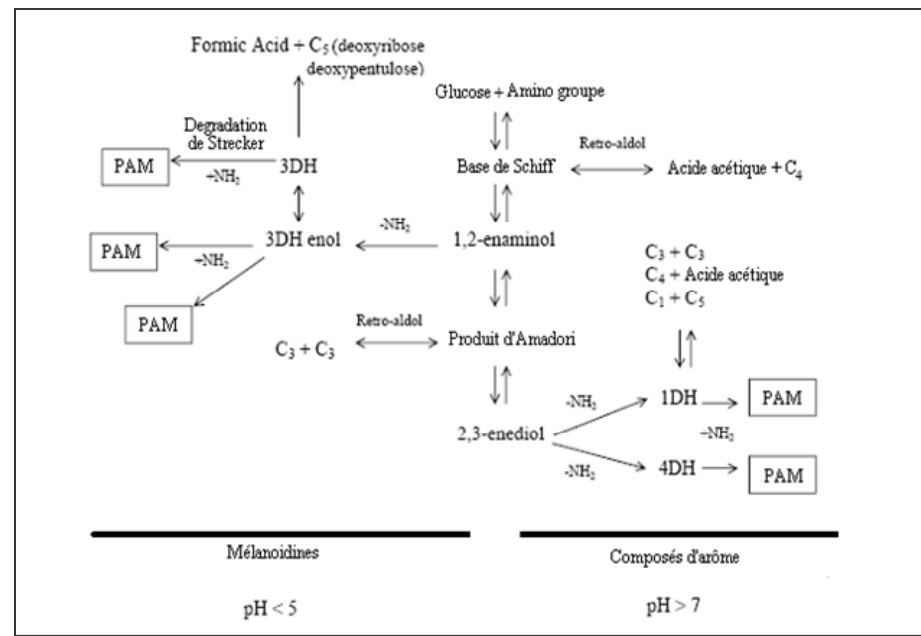
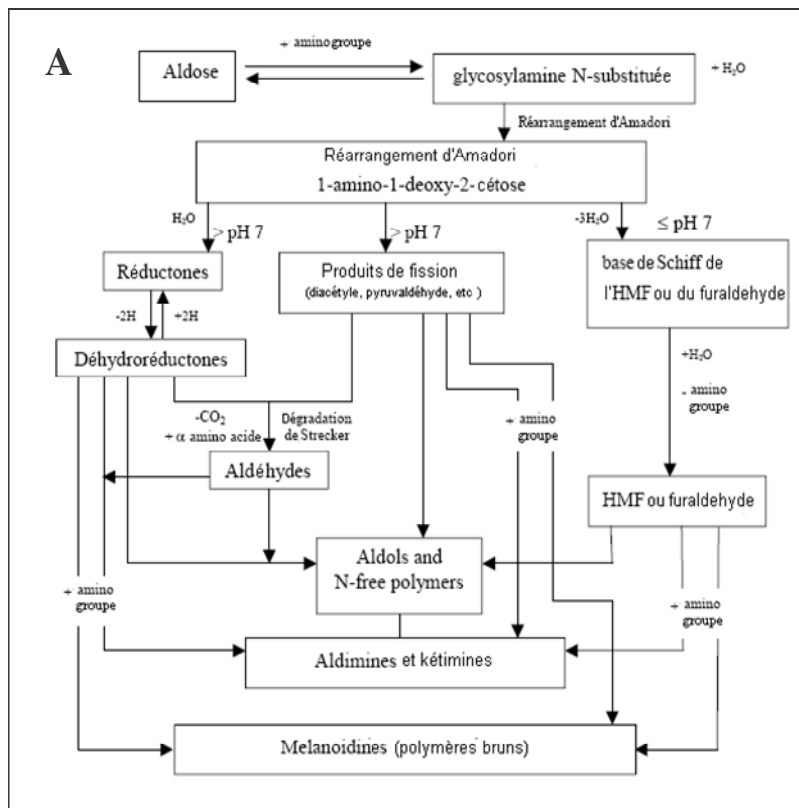


Figure 15. Schéma de la réaction de Maillard, A : Selon Hodge (1953), B : Selon Tressl et al. (1994)

II.1. Les grandes étapes de la réaction

La réaction de Maillard peut être décomposée de trois étapes principales. Une première étape conduit à la glycation, correspondant à une liaison covalente entre le groupement carbonyle d'un sucre réducteur et le groupe α ou ε -NH₂ d'un acide aminé libre ou protéique. Puis une seconde étape (étape avancée) aboutit à la formation de produits bruns ou fluorescents appelés AGE (Advanced Glycated End products) ou PTG (Produits Terminaux de Glycation). Dans les aliments, cette étape conduit à un mélange complexe et mal connu de composés. Certains composés de type pyrazines ou aldéhydes constituent souvent des molécules aromatiques, alors que d'autres molécules ont été récemment identifiées comme potentiellement toxiques (acrylamide, furane, CML). Enfin, l'étape finale conduit à la polymérisation en mélanoidines.

L'étape initiale

La glycation correspond à la formation non enzymatique d'une liaison covalente entre le groupement carbonyle d'un aldose ou d'un cétose (ou autres composés aldéhydiques comme les produits de peroxydation secondaire) et le groupement amine libre d'un acide aminé (figures 16 et 17). Il en résulte un produit d'addition hautement instable en solution aqueuse qui, en perdant une molécule d'eau, conduit à une base de Schiff. Ces réactions sont réversibles et en milieu fortement acide, le sucre et l'acide aminé peuvent être totalement régénérés. Toutefois, une isomérisation irréversible de la base de Schiff conduit à la formation de produits plus stables, produits d'Amadori (cétosamines) lorsque le sucre de départ est un aldose, et produits de Heyns-Carson lorsque le sucre de départ est une cétose (aldosamines).

Dans la plupart des produits alimentaires, les résidus lysine protéiques étant beaucoup plus concentrés que les résidus lysine libres, ce sont les groupements ε -amine des résidus de lysine qui représentent la plus importante source de groupements amines réactifs. Suite à leur blocage par le produit d'Amadori, ces résidus de lysine ne sont plus disponibles pour l'organisme, ce qui entraîne une baisse de la valeur nutritionnelle de la protéine lorsque l'acide-aminé est limitant.

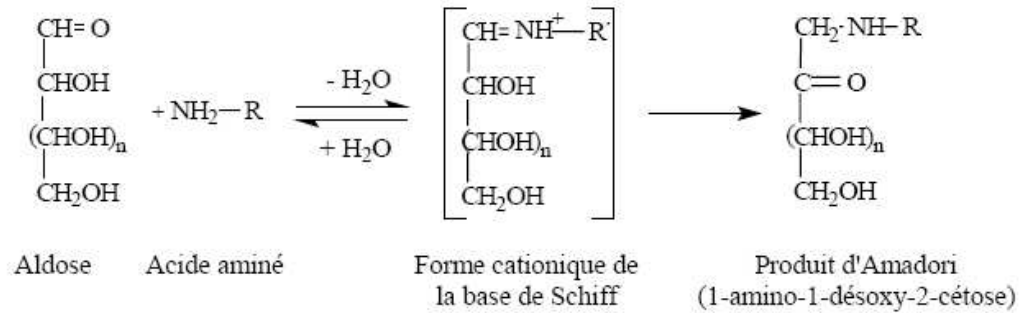


Figure 16. Première étape de la réaction de Maillard entre un acide aminé et un aldose.

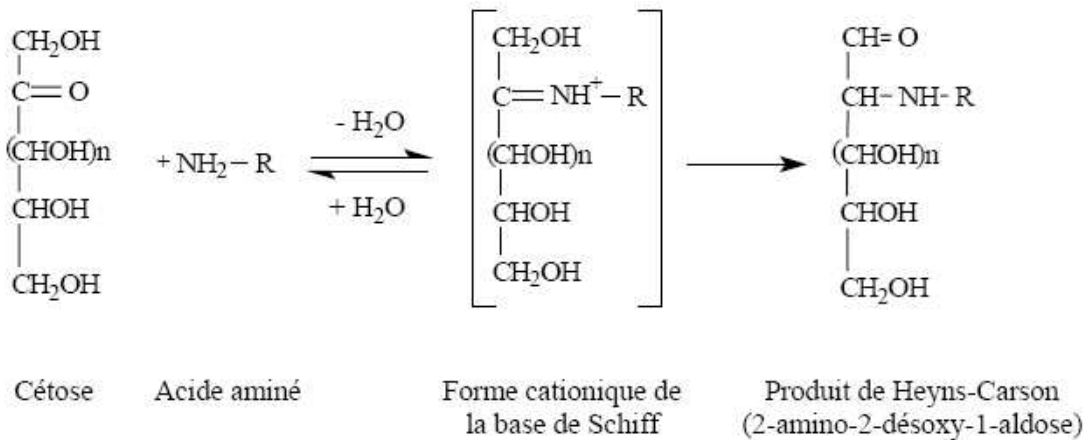


Figure 17. Première étape de la réaction de Maillard entre un acide aminé et un cétose.

L'étape avancée

Cette étape est plus complexe car composée de différentes réactions. Récemment, un autre schéma de la réaction a été proposé par Tressl et al. (1994) (figure 15B). Il place les desoxyhexosuloses au cœur du système réactionnel, comme produits intermédiaires clés de la réaction de Maillard. Toutefois, trois voies se distinguent : deux types d'énolisation selon le pH, et une troisième voie de scission des aldosamines ou cétosamines.

La première est appelée déshydratation modérée. Elle est favorisée aux pH neutres et légèrement alcalins, et consiste en une énolisation irréversible entre les carbones 2 et 3 (soit énolisation 2,3) et une perte du résidu aminé. Le composé intermédiaire, 1-méthyl-2,3-dicarbonyl, est une réductone (dicétone) responsable du caractère autocatalytique de la réaction de Maillard. Cette réductone se décompose de manière complexe en une grande variété de composés à fonction mono et dicarbonyl : furanones, cyclopentanones, isomaltols.

La deuxième est appelée déshydratation forte, favorisée par les pH acides. Elle est la principale voie de dégradation des cétosamines. Elle débute par la formation d'un ène-diol entre les carbones 1 et 2 de la glycosylamine N-substituée (soit énoisation 1,2). Puis un réarrangement conduit à une double liaison 2, 3 et à la désamination du carbone 1. Ce produit intermédiaire est aussi une réductone. Suite à la perte d'une molécule d'eau il se forme un composé dicarboxylé insaturé qui, par cyclisation, conduit aux furfuraldéhydes, dont fait partie l'hydroxyméthyl furfural (HMF).

Ces deux premières voies sont souvent associées à une décarboxylation de l'acide aminé par la voie de Strecker. Cette réaction est autocatalytique dans le sens où les réductones réagissent avec les acides aminés selon le même schéma que la réaction initiale de Maillard. Ainsi, elle provoque un dégagement de CO₂, pouvant former des mousses dans les produits à longue durée de conservation ; elle libère un aldéhyde pouvant lui même réagir avec un nouveau groupement amine. Cette réaction détruit les acides aminés sans blocage, induisant de fortes pertes après initiation. Néanmoins, les aldéhydes formés sont des composés aromatiques importants (Ledl et Schleicher, 1990).

La condensation de deux aminocétones, produits secondaires de la réaction de Strecker, donne des pyrazines, molécules fortement aromatiques. Elles sont présentes dans les produits alimentaires, en particulier dans les noix et graines grillées, auxquels elles donnent des arômes spécifiques, plus ou moins désirables.

Les réductones donnent également, par réaction avec des acides aminés, puis par de multiples réactions intramoléculaires, des composés très colorés.

La troisième voie démarre avec la scission de l'aldose lié à l'amine. Celle-ci libère alors de petites molécules carbonylées ou acides, qui, par condensation aldolique, donneront les polymères et produits odorants caractéristiques de la réaction de Maillard.

Bien sûr, dans la réalité alimentaire, ces réactions sont étroitement interreliées et on ne connaît mal à la fois les mécanismes réactionnels et les produits finis.

L'étape finale

L'étape finale correspond à la formation des polymères bruns de produits avancés de Maillard formés par les différentes voies. Il s'agit des mélanoidines représentant un mélange hétérogène de composés caractérisés par leur couleur brune et leur haut poids moléculaire allant jusqu'à

100,000 Da. De nombreuses études ont entrepris d'isoler et de purifier les mélanoidines provenant de différentes matrices alimentaires telles que le café, la sauce au soja, le malt torréfié ou encore la bière. Cependant, les études sont assez limitées en raison de leur faible solubilité (Borrelli et Fogliano, 2005). Concernant les mélanoidines issues du pain, une digestion enzymatique a permis de surmonter ce problème (Borrelli et Fogliano, 2005).

Malgré les efforts engagés, les structures ainsi que les mécanismes de formation des mélanoidines restent encore peu connus. A ce jour, trois propositions de structures ont été faites pour décrire les mélanoidines. 1 - Hofmann a détecté des composés colorés de faible poids moléculaire capables de se lier aux protéines via les groupements ϵ -NH₂ des lysines et arginines qui produiraient ensuite des mélanoidines de haut poids moléculaire (Hofmann, 1998). 2 - D'autres auteurs proposent que les mélanoidines seraient des polymères comprenant des motifs furanes et/ou pyrroles (Heyns et Hauber, 1970 ; Tressl et al., 1998). 3 - Enfin, Kato et Tsuchida (1981) et plus récemment Cämmerer et al. (1995 et 2002) suggèrent que le squelette des mélanoidines est principalement composé de produits de dégradation des sucres, formés dans l'étape précoce de la réaction de Maillard puis polymérisés et liés aux composés aminés (Kato et Tsuchida, 1981 ; Cämmerer et Kroh, 1995 ; Cämmerer et al., 2002).

Finalement, il est probable que les mélanoidines soient constituées d'un mélange des différentes structures proposées ci-dessus.

II.2. Les facteurs influents

Plusieurs facteurs influent sur la vitesse et les voies de réaction: la température, le pH, l'activité de l'eau, la présence de certains sels et vitamines.

Les facteurs réactionnels

La température est certainement le facteur le plus influent par sa participation dans l'équation d'Arrhénius. Cet effet dépend bien sûr de l'énergie d'activation de la réaction. Ces réactions sont favorisées par un pH alcalin, avec un optimum à pH 10, du fait de la réactivité de l'amine libre sous sa forme basique (Ajandouz et al., 1999). L'étude de Renn et Sathe (1997) montre que le taux de réaction du glucose augmente également lorsque le pH augmente. La protonation de la fonction amine, à pH inférieur au pKa du composé aminé est souvent évoquée pour expliquer l'effet du pH sur la vitesse de réaction : la nucléophilie de la fonction amine est diminuée par la protonation. Mais cet effet du pH sur la vitesse de réaction dépend également d'autres paramètres

réactionnels tels que la température (Clotet et al., 1994). En plus de modifier la vitesse de réaction, le pH modifie également le profil des composés formés. Par exemple, comme nous l'avons vu plus haut (cf chapitre 2, section II.1), la réaction de Maillard en milieu alcalin entraîne la formation de pyrazines là où des pH bas favorisent la formation de furfural, de 5-hydroxyméthylfurfural ou de methional (Yaylayan, 1990).

La réaction de Maillard se développe de façon intense lorsque la teneur en eau est faible avec un maximum pour des activités d'eau comprises entre 0,55 et 0,75. En effet, aux fortes teneurs en eau, de fait de la loi d'action des masses, la première étape de réaction étant une déshydratation, l'effet de dilution des réactants entraîne une limitation de la réaction. Aux très faibles teneurs en eau en revanche, la solubilité des réactants est réduite ce qui entraîne un ralentissement de la réaction (Ames et al., 1993).

Les réactants

L'initiation de la réaction de Maillard dépend de plusieurs paramètres, tels que la nature des sucres, la nature de la source aminée et les conditions physico-chimiques.

De manière générale, les pentoses provoquent un brunissement plus important que les hexoses. Assoumani et al. (1993) ont montré que l'intensité du brunissement associé à un blocage donné de lysine est plus élevée avec les pentoses, qu'avec les hexoses. Les sucres de petite taille sont de meilleurs substrats car ils pénètrent plus aisément au sein des protéines. Par ailleurs, Dills (1993) rapporte que la vitesse de réaction de la première étape semble plus élevée avec les cétooses qu'avec les aldoses. Le saccharose, bien qu'étant un sucre non réducteur, subit également la réaction de Maillard. En effet, il est hydrolysé lors du chauffage. Le glucose et le fructose ainsi libérés peuvent ensuite intervenir dans la réaction de Maillard (Buera et al., 1987).

Il existe d'autres molécules avec des fonctions réductrices pouvant entrer dans les réactions de Maillard. Arnoldi et al. (1990) ont établi que les lipides peroxydés forment des aldéhydes pouvant réagir avec les acides aminés pour donner des bases de Schiff. Yen et Lai (1987) ont étudié l'effet de l'addition de certains antioxydants: l'acide ascorbique ou l' α -tocophérol provoquent une baisse du blocage de la lysine disponible dans un système modèle caséine-lactose. Par contre, des études récentes ont montré que l'acide ascorbique semble être un précurseur de la CML beaucoup plus efficace que le glucose. En effet, l'ascorbate oxydé présente deux fonctions carbonyles réactives sur la lysine des protéines (Leclère et al., 2002). En 2004,

Birlouez-Aragon et al. ont soulevé le problème de la présence de CML en concentrations importantes dans les laits infantiles, en raison de la présence simultanée de fer et de vitamine C dans ces aliments.

Ashoor et Zent (1984) ont étudié la réaction de Maillard en fonction des acides aminés communs. Les plus réactifs sont la lysine, la glycine et la méthionine, les moins réactifs étant la cystéine, l'acide glutamique et l'asparagine. Il convient de rappeler que les principales sources aminées de la réaction de Maillard sont des protéines, leurs fonctions amines en α formant des liaisons peptidiques. Les seuls substrats sont alors les acides aminés en position N-terminale ou ayant une fonction amine sur leur chaîne latérale : la lysine, l'arginine et l'histidine. Il paraît difficile de dresser une relation structure / réactivité des acides aminés : différents acides aminés basiques peuvent avoir des réactivités variables. Par ailleurs, en considérant la vitesse de disparition de l'acide aminé, Ajandouz et Puigserver (1999) ont montré que la thréonine qui développe un faible brunissement est l'acide aminé le plus réactif après la lysine. Ces mêmes auteurs ont également souligné l'influence du pH sur la réactivité de l'acide aminé : cette dernière est élevée lorsque le pH réactionnel est proche du pKa du groupement aminé. Ainsi à pH 9, lysine, arginine et thréonine ont une réactivité comparable.

III. Interaction entre réaction d'oxydation lipidique et réaction de Maillard

La grande similarité dans les mécanismes de déroulement de ces deux grands types de réactions (formation d'un produit réactif dans la première étape de la réaction : hydroperoxyde dans le cas de l'oxydation des lipides et produit d'Amadori dans le cas de la réaction de Maillard ; réactions ultérieures conduisant à la formation de composés carbonylés plus réactifs vis-à-vis des amines que les composés de départ), suggère l'existence d'une interdépendance entre les réactions d'oxydation des lipides et les réactions de Maillard (Zamora et Hidalgo, 2005).

La réaction de Maillard génère des radicaux libres et des composés prooxydants, alors que par ailleurs elle est activée par les radicaux libres (Tessier et Birlouez-Aragon, 1998 ; Leclère et al., 2002). De son côté l'oxydation des lipides est favorisée par la présence de radicaux libres, donc par certains produits de Maillard. Mais cette réaction à son tour génère des composés aldéhydiques réactifs vis-à-vis des amines. Cependant l'activité antioxydante des mélanoidines, tout particulièrement vis-à-vis des lipides a été bien décrite.

III.1. Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'oxydation des lipides

Les études d'Ames (2001) ont montré que les produits de Maillard favorisent l'oxydation des lipides. De même, Breitling-Utzmann et al. (2001) ont montré que les produits d'Amadori augmentent l'oxydation des phospholipides. Bucala et al. (1993) ont aussi prouvé que la glycation des phospholipides favorise la peroxydation lipidique. Ceci est vraisemblablement lié à la formation d'intermédiaires radicalaires pro-oxydants tels que le radical pyridinium. Cependant, un effet antioxydant des produits de Maillard a également été montré. Le mécanisme semble pourtant légèrement différent puisqu'il met en jeu les mélanoidines chélateurs de métaux et de radicaux libres, donc à activité antioxydante (Farag et al., 1982 ; Franzke et Iwainsky, 1954 ; Manzocco et al., 2001 ; Morales et Babel, 2002 ; Park et Kim, 1983).

III.2. Rôle des produits de l'oxydation des lipides dans la réaction de Maillard

De façon analogue, les produits d'oxydation des lipides sont également capables d'agir sur la réaction de Maillard en favorisant la réaction ou en réagissant avec certains de ses intermédiaires, produisant ainsi des composés différents de ceux qui seront formés en l'absence des lipides (Zamora et Hidalgo, 2005). En effet, les études ont montré que les lipides interagissent dans la réaction de Maillard d'une part au travers du groupement amine de la partie polaire des phospholipides et d'autre part, par l'intermédiaire composés carbonylés (MDA, glyoxal, méthylglyoxal) qui réagissent avec les amines. Ces études ont aussi montré que la formation des produits de Maillard est plus rapide lorsque l'aliment contient une grande proportion d'acides gras polyinsaturés (Macleod et Seyyedain-Ardebili, 1981 ; Meynier et Gandemer, 1994).

III.3. L'existence d'intermédiaires communs aux deux réactions

Les réactions d'oxydation des lipides et les réactions de Maillard possèdent des intermédiaires communs. En effet, divers composés volatiles (Zamora et al., 1994) et hétérocycles non volatiles (Hidalgo et al., 1999) comme le *N*-hydroxyalkylpyrrole sont des produits communs aux deux réactions (Zamora et Hidalgo, 2005). Le glyoxal et le méthylglyoxal sont aussi des composés carbonylés communs aux deux réactions (Zamora et Hidalgo, 2005). La carboxyméthyllysine est également un produit commun aux deux réactions (Fu et al., 1996).

De tout ce qui précède, on peut conclure que les deux réactions sont interdépendantes, et il faut donc les considérer simultanément pour comprendre la formation des produits de Maillard en présence des lipides et les réactions d'oxydation des lipides en présence d'acides aminés (figure 18).

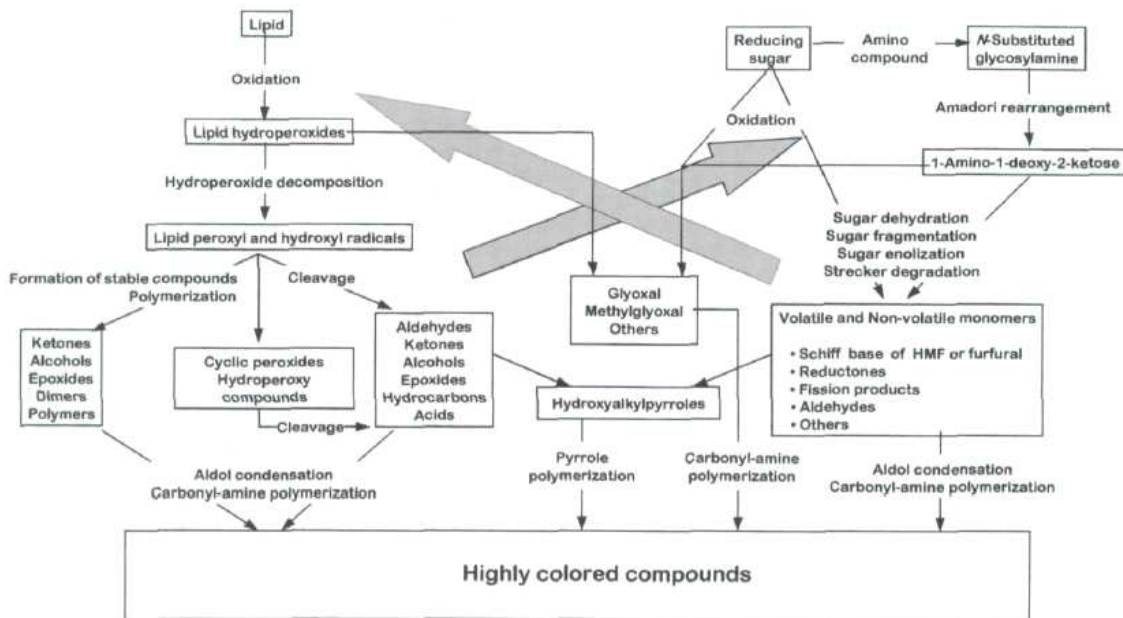


Figure 18. Les interactions connues entre les réactions de Maillard et d'oxydation des lipides (d'après Zamora et Hidalgo, 2005).

IV. Impact des réactions d'oxydation lipidique et de Maillard sur la qualité nutritionnelle des noix et graines

Les nombreuses réactions décrites plus haut (réactions d'oxydation des lipides et réaction de Maillard) sont connues pour abaisser la qualité nutritionnelle globale des aliments (Ledl et Schleicher, 1990 ; Hodge, 1953). Cette baisse de qualité nutritionnelle concerne à la fois les lipides, les protéines, les antioxydants et les vitamines.

En effet, l'oxydation des lipides et leur dégradation thermique pendant la transformation des noix et graines induit une perte au niveau des acides gras essentiels, en particulier les acides les plus insaturés, linoléique et linoléique. Luh et al. (1982) ont montré que la torréfaction des pistaches provoque une diminution de la teneur en acides oléique (C18 :1 n-9) et linoléique (C18 :2 n-6).

L'une des conséquences majeure en terme de perte de qualité des protéines est une diminution de la digestibilité globale des protéines liée à la formation de pontages interpeptidiques résistants à l'action des enzymes et limitant leur accessibilité. Par ailleurs, certains produits de Maillard inhibent les protéases (Adrian et al., 2000). D'autre part, certains acides aminés essentiels sont détruits par la dégradation de Strecker ou modifiés irréversiblement par la réaction de Maillard.

La lysine est l'acide aminé le plus réactif et les formes bloquées de l'acide aminé sont indisponibles pour l'organisme. Il en résulte une baisse nette de la valeur biologique de la protéine particulièrement dans le cas des noix et graines où la lysine est l'acide aminé limitant. La lysine peut être bloquée à la fois par les sucres réducteurs, ou par les composés aldéhydiques dérivés de la dégradation thermique des hydroperoxydes. Or, les noix et graines contiennent à la fois des sucres, des protéines et des lipides. On s'attend donc à un blocage de l'acide aminé par ces différents substrats. De plus, cette réaction étant favorisée à faible teneur en eau, elles se développeront facilement dans les noix et graines grillées. Certaines études sur la transformation des noix et graines ont démontré l'effet du traitement thermique sur la disponibilité des acides aminés. Luh et al. (1982) rapportent que le blanchiment, le séchage et la torréfaction des pistaches provoquent successivement une perte de la disponibilité de certains acides aminés dans ces produits. Damame et al. (1990) ont montré que le traitement thermique appliqué au cours de la torréfaction des cacahuètes diminue significativement les teneurs en méthionine, tryptophane et la digestibilité des protéines *in vitro*. De même, Khalil et Chughtai (1983) ont mis en évidence une diminution de la teneur en lysine, thréonine, méthionine, cystine, arginine, tyrosine et tryptophane au cours de la torréfaction (150°C, 30 min) des cacahuètes. Finalement, le traitement thermique provoque une dégradation des tocophérols et de certains polyphénols et phytostérols (Seeram et al., 2006). La torréfaction des noisettes peut conduire à une diminution maximale de 10 % de leur contenu en vitamine E et 14 % en phytostérols, selon la température et le temps de la cuisson (Amaral et al., 2006).

V. Impact des composés néoformés sur la sécurité alimentaire – toxicité des composés néoformés.

V.1. Les produits générés dans les matrices alimentaires lors d'un chauffage à haute température

Le traitement thermique des matrices alimentaires est à l'origine des nombreuses réactions chimiques de dégradation décrites dans le chapitre précédent, entraînant la disparition de composés initiaux (thermosensibles) ou/et la synthèse de nouveaux composés néoformés (figure 19). Les réactions d'interaction à la chaleur entre les différents constituants de la matrice alimentaire sont très nombreuses et difficiles à anticiper. Les traitements thermiques peuvent

ainsi entraîner des effets positifs (stérilisation, disparition de toxines, augmentation de digestibilité) et des effets négatifs (disparition de vitamines, de protéines et d'acides gras essentiels, apparition de composés toxiques). De plus, certains des produits néoformés peuvent jouer un rôle prépondérant dans les propriétés organoleptiques des aliments (goût "grillé", "fumé" ou "caramélisé").

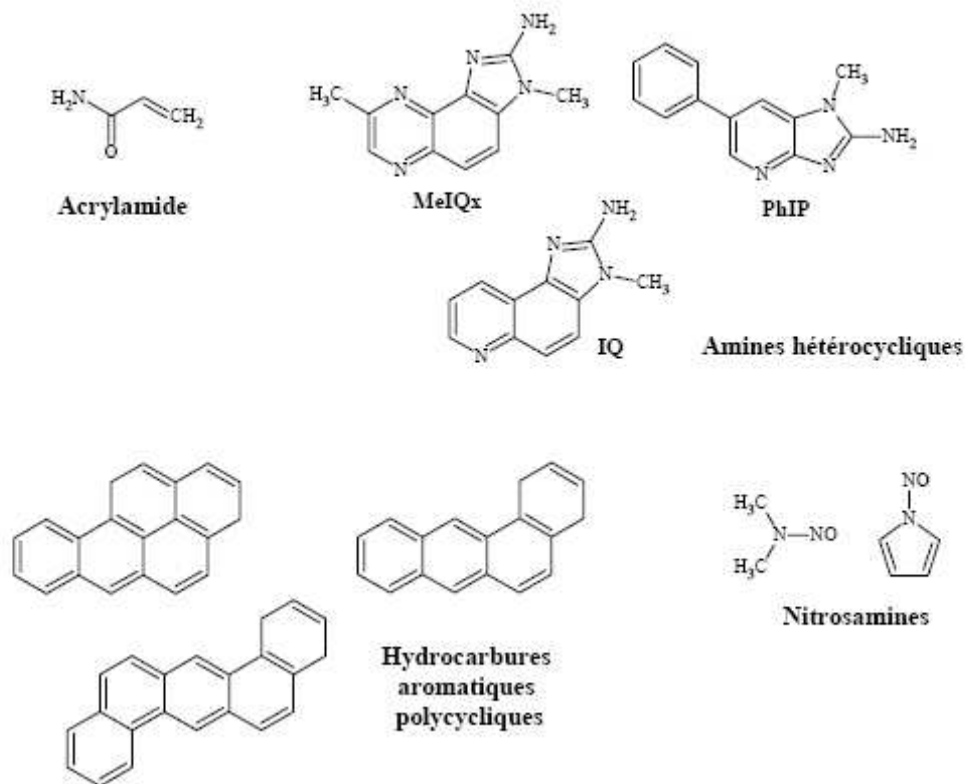


Figure 19. Quelques exemples de composés potentiellement cancérigènes formés par chauffage et cuisson d'aliments.

Les produits carnés

Les extraits de viandes cuites à haute température pendant des durées prolongées sont nettement mutagènes dans le test d'Ames. Les composés en cause sont : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les produits de pyrolyse des acides aminés (Trp P, Glu P) et les amines aromatiques hétérocycliques de type imidazoles (IQ, IQx). Ces composés sont des initiateurs de cancérogenèse par formation d'adduits à l'ADN.

Il existe de nombreuses études épidémiologiques (Norat et al., 2002) conduites sur la relation entre la consommation de viandes et de poissons grillés et le développement de cancers digestifs.

Les études *in vivo*, quant à elles, ont révélé des effets initiateurs et promoteurs des produits de thermolyse des protéines et des viandes. La plupart de ces substances néoformées ont été classées « 2B » sur la base d'études expérimentales sur un long terme chez les rongeurs par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), soit "L'agent (le mélange) est peut-être cancérigène pour l'Homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont peut-être cancérigènes pour l'Homme".

Les glucides

Il n'a jamais été mis en évidence d'effets mutagènes des extraits d'amidons cuits (pomme de terre, pain, frites). De plus, aucun argument épidémiologique n'a pu être identifié concernant d'éventuels effets cancérigènes après cuisson des amidons. En revanche, le traitement thermique des matrices alimentaires à forte teneur en sucres et en présence d'acides aminés conduit à la réaction de Maillard qui implique, d'une part, des produits d'Amadori formés à partir des sucres et, d'autre part, l'ammoniac généré par dégradation de Strecker des protéines.

Les produits de la réaction de Maillard (PRM) sont très nombreux et n'ont pas tous été identifiés. Pris dans leur ensemble, les PRM sont néphrotoxiques à fortes doses. Certains d'entre eux présentent des effets mutagènes (Skog, 1993), d'autres, à l'inverse ont un effet protecteur de la mutagénèse (Yen et al., 1992). La principale famille de composés identifiés est celle des furanoses qui sont des sucres dont la structure cyclique comprend un atome d'oxygène et 4 atomes de carbone, par opposition aux formes pyranoses, où la structure cyclique comprend 1 atome d'oxygène et 5 atomes de carbone. On peut citer : hydroxyméthylfurfural, furanosine, furfuraldéhyde.

Ces composés sont mutagènes (après activation par les Cytochromes P450), positifs en test d'Ames et induisent *in vivo* des micronoyaux chez la souris. De plus, de fortes concentrations (20%) de produits de thermolyse de sucres administrés pendant 90 jours à des rats ont un effet promoteur dans des modèles de cancérogenèse colique induite.

Au contraire, des amidons cuits et refroidis (amidons rétrogradés) ont un effet protecteur dans les mêmes conditions expérimentales. Les composés néoformés à partir des sucres ne sont pas classés cancérigènes par le CIRC qui estime les données actuelles insuffisantes. De plus, l'OMS considère, que les données toxicologiques disponibles sur les produits de la réaction de Maillard ne permettent pas d'établir une Dose Journalière Tolérable (DJT). Cependant, des données

récentes suggèrent un rôle prooxydant et proinflammatoire des produits de Maillard, sans doute ceux de faible poids moléculaire et à groupements dicarboxylés.

Les lipides

L'action des hautes températures sur les lipides est susceptible de générer des produits toxiques par des mécanismes d'oxydation. On peut alors trouver des composés oxydés (oxycholestérol), mais aussi des produits de dégradation (MDA) ou des produits complexes de cyclisation (endoperoxydes) ou de condensation (polymères de peroxydes).

Le MDA est un agent réticulant, mutagène, capable de former des pontages entre des brins d'ADN, des protéines, ou encore entre l'ADN et les protéines.

Par chauffage à haute température des lipides contenus dans les aliments ou bien utilisés pour la cuisson, il peut également se former de l'acroléine qui est un agent génotoxique, tératogène. De plus, des acides gras *trans* générés par l'isomérisation des acides gras des lipides insaturés peuvent avoir des effets néfastes sur la santé, parmi lesquels une augmentation du risque cardiovasculaire dû à l'athérogénicité de ces isomères.

V.2. Toxicité et effets physiologiques des composés néoformés

V.2.1 La toxicité des produits de la réaction de Maillard (PRM)

La réaction de Maillard est à l'origine de très nombreux composés aussi bien dans les aliments qu'*in vivo*. Il apparaît que beaucoup de ces molécules sont liées à certains troubles voire à des pathologies graves. En effet, comme le démontrent les travaux présentés lors du neuvième symposium international sur la réaction de Maillard (2007), l'étendue du rôle de cette réaction dans les pathologies liées au vieillissement (l'arthrite, l'athérosclérose, les diabètes et les maladies neurodégénératives) est devenue un axe majeur de la recherche médicale.

A ce stade, il convient de séparer l'étude des produits de la réaction de Maillard dans les aliments (que l'on va nommer PRM) de celle des produits de glycation dans l'organisme.

V.2.1.1 Effets immunologiques et toxicologiques des produits de Maillard

L'aspect négatif de la réaction de Maillard le plus souvent évoqué est la diminution de la biodisponibilité des acides aminés, et notamment des acides aminés essentiels. Il existe d'autres

phénomènes ayant des conséquences physiologiques néfastes dues à l'apport exogène de PRM par l'alimentation ou à la modification des protéines par la réaction de Maillard.

Effets sur les propriétés allergisantes des protéines

Les préoccupations des consommateurs vis-à-vis des allergies alimentaires sont grandissantes. Des recherches sur les cacahuètes ont montré que la torréfaction augmente leur caractère allergène en conférant aux protéines allergisantes une plus grande résistance à la digestion (Maleki et al., 2000 ; Maleki et Yamaki, 2007).

Effets mutagènes et principaux PRM toxiques

Nous examinerons dans un premier temps les principaux PRM, en traitant séparément la CML et les amines Hétérocycliques (AH) qui apparaissent comme les plus nombreux et les plus étudiés. Nous commenterons ensuite les résultats des études les plus récentes, notamment celles consacrées à l'acrylamide.

a. Les PRM

Il faut attendre la fin des années 1970, avec l'apparition de la technique GC/MS (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) pour pouvoir identifier un très grand nombre de PRM (Figure 20).

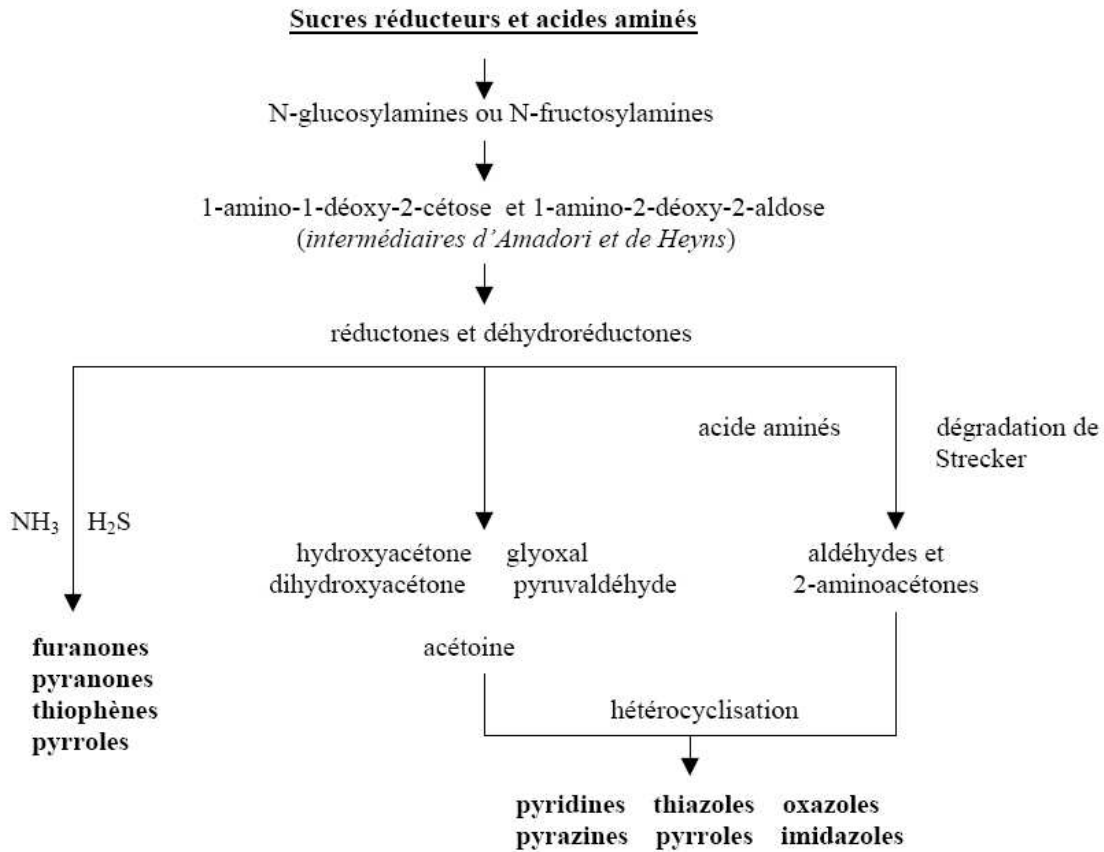


Figure 20. Formation des hétérocycles dans les aliments par réaction de Maillard (d'après Fernandez et al., 2002).

- **Les composés dicarboxylés**

De nombreux composés dicarboxylés sont issus de la réaction de Maillard (figure 21). Le maltol et le glyoxal sont présents dans le café et les produits céréaliers. Nagao et al. (1986) ont identifié le glyoxal et ses dérivés alkyls dans de nombreuses boissons (café, thé, vin, bourbon,...), dans le pain, et les dérivés du soja. Le mutatest d'AMES a montré que le diacétylglyoxal, le glyoxal et le maltol, le méthylglyoxal, le glycéraldéhyde, le dihydroxyacétone et l'acide glyoxalique sont mutagènes.

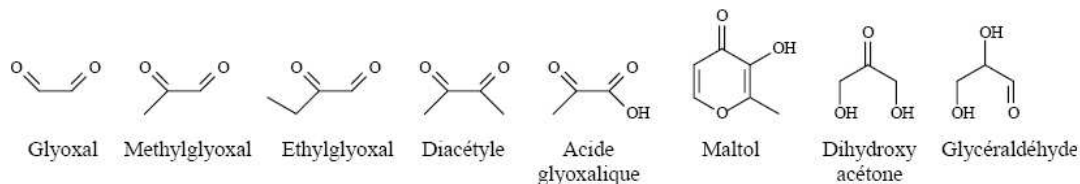


Figure 21. Principaux composés dicarbonylés produits par la réaction de Maillard (d'après Wong et Shibamoto, 1996).

- **Les furanes et furfurals**

Les furanes et leurs dérivés, en particulier le furfural, sont parmi les premiers composés hétérocycliques identifiés dans les PRM. Ceux-ci ont montré un faible pouvoir mutagène en comparaison avec le benzo(a)pyrène. Ces composés font actuellement l'objet d'observations par l'*US Food and Drug Administration* (2006).

L'étude *in vitro* de l'HMF révèle des effets mutagènes et carcinogènes (Yen et al., 1993; Lee et al., 1995; Janzowski et al., 2000) ainsi que des effets cytotoxiques (Vagnarelli et al., 1991). Il n'existe cependant pas d'études épidémiologiques permettant d'évaluer l'association de l'HMF avec le risque de cancer chez l'homme.

L'effet mutagène de l'HMF reste controversé ; cependant, il est souvent dosé dans les aliments sucrés comme indicateur de la qualité du traitement thermique appliqué à l'aliment. En effet, bien qu'ayant des activités cytotoxiques, génotoxiques et tumorigènes, l'HMF ne semble pas poser de problèmes de santé même si les concentrations élevées en HMF (1000 ppm) de certains aliments, en particulier les fruits secs, approchent les concentrations pour lesquelles il a été observé des effets biologiques dans les systèmes cellulaires (Janzowski et al., 2000). Par contre, le furane, qui semble être plutôt formé par dégradation de la vitamine C et des acides gras polyinsaturés à la chaleur, est lui considéré comme possiblement cancérigène pour l'homme (CIRC, 1995) et surveillé par la FDA et l'EFSA. Sa forte volatilité pourrait fortement atténuer son impact chez l'homme.

- **Les pyrazines**

Les pyrazines sont des pigments du brunissement non enzymatique. L'intensité de la couleur jaune des systèmes modèles est proportionnelle à leur concentration. Il en est de même pour la mutagénicité. Stich et al. (1980) ont étudié quatre alkylpyrazines qui ne sont pas mutagènes pour *Salmonella typhimurium* mais qui le sont pour *Saccharomyces cerevisiae*. Elles augmentent la

fréquence des aberrations chromosomiques pour les ovocytes de hamster chinois. Shibamoto (1980) a isolé à partir de milieux modèles des pyrazines tricycliques mutagènes pour *S. typhimurium* TA98 sans activation S-9, qui n'ont pas été caractérisées dans les aliments.

b. Les amines hétérocycliques

A la fin des années 1970, Nagao et al. (1977) découvrent la présence de composés mutagènes à la surface de viandes et poissons cuits. L'isolement et l'identification de ces composés a permis de mettre en évidence une nouvelle famille d'amines hétérocycliques (AH). Des données épidémiologiques montrent que les consommateurs de viande bien cuite, notamment la viande de bœuf, ont un risque plus élevé de cancer du sein ou du colon. Chez le rat, les AH induisent des cancers dans ces organes mais aussi dans la prostate et le pancréas. De plus ils affectent le système vasculaire (Weisburger, 2002). Sugimura (2002) estime que les AH peuvent également avoir d'autres effets toxiques comme l'atrophie des glandes salivaires.

Il existe deux groupes d'AH. D'une part les aminoimidazoazaarènes (AIA) comprenant les imidazoquinolines, les imidazoquinoxalines et les imidazopyridines, et d'autre part les carbolines ou pyrido-imidazoles et pyrido-indoles (Robbana-Barnat et al., 1996). Leurs concentrations respectives dépendent du type de viande et du mode de cuisson.

Les imidazoquinolines (IQ) et imidazoquinoxalines (IQx) sont relativement bien connues et très étudiées (Felton et al., 1986 ; Felton et Knize, 1990 ; Jagerstad et Skog, 1991 ; Skog, 1993 ; Eisenbrand et Tang, 1993 ; Robbana-Barnat et al., 1996). Elles sont formées à partir de la créatinine par condensation avec un produit issu de la dégradation de Strecker. Le PhIP est l'AH la plus fréquemment trouvée dans les viandes et poissons, par exemple dans le maquereau (Gu et al., 2002). Toutes les données disponibles confirment l'impact toxique de ces composés (Gross et al., 1993).

c. L'acrylamide

Au mois d'avril 2002, l'Agence Suédoise des Aliments (Swedish National Food Administration) annonçait avoir découvert la présence d'acrylamide dans certains aliments cuits. En France l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) est en charge de faire le point sur les risques et l'exposition de la population à l'acrylamide dans les aliments. En Février 2003

elle publie un premier bilan avec plus de 200 données provenant de l'industrie agro-alimentaire et de l'AFSSA. Elles ont été regroupées selon la classification du Codex alimentarius.

Depuis les premiers résultats publiés sur les niveaux d'acrylamide dans les aliments, d'autres concentrations ont été communiquées pour différents aliments et produits alimentaires. On trouvera au tableau 11 un résumé des résultats de l'analyse sur l'acrylamide dans les aliments jusqu'en 2004. Pour certains de ces groupes d'aliments, les analyses réalisées sont peu nombreuses. Il a été constaté que les concentrations d'acrylamide pouvaient varier considérablement entre des aliments appartenant à une même catégorie et à des lots transformés dans des conditions semblables.

Formation de l'acrylamide dans les aliments

Une des premières publications sur le mécanisme de formation de l'acrylamide dans les aliments est celle de Mottram et al. (2002). Les auteurs montrent qu'une des voies prédominantes serait celle qui implique, au cours de la réaction de Maillard, l'interaction entre l'asparagine et des sucres réducteurs libres. Le contenu en asparagine représente 40 % des acides aminés totaux dans les chips, 14 % dans la farine de blé et 18 % dans des produits à base de seigle, riche en protéines. Ceci expliquerait les fortes variations en acrylamide observées dans différents produits manufacturés d'origine végétale (céréales, pomme de terre). Une seconde étude de Biedermann et al. (2002) illustre la complexité du rôle des différents paramètres physico-chimiques (température et temps de cuisson, taux d'humidité, pH). De même Yaylayan et al. (2003) explorent la complexité de cette réaction pour en conclure que les sucres et la température élevée sont indispensables à la formation d'acrylamide. Enfin Rydberg et al. (2003) démontrent que la quantité d'acrylamide présente dans les aliments résulte de réactions complexes de formation et d'élimination simultanée de ce composé. Les lipides pourraient, théoriquement, être impliqués dans la formation de l'aldéhyde après celle de l'acroléine. En effet, l'hydrolyse des lipides conduit à la libération de glycérol qui, après déshydratation interne et oxydation, peut conduire à la formation d'acroléine (un aldéhyde comprenant 3 carbones et une liaison éthylénique), qui pourrait se dégrader en acrylamide. Cependant, les températures nécessaires pour réaliser la déshydratation interne du glycérol sont très élevées, supérieures aux températures classiques des grillages et fritures. Dans les huiles, on observe de tels phénomènes lorsque les températures des huiles dépassent 250°C (AFSSA, 2002).

L'ensemble des études confirme que de nombreux paramètres jouent un rôle dans la formation de l'acrylamide dans le produit fini et que les effets de ces paramètres sont étroitement imbriqués. Il apparaît en conséquence difficile à l'heure actuelle de dégager l'influence de chaque paramètre à des fins de maîtrise du processus.

Tableau 11. Synthèse des données de contamination des différents aliments par l'acrylamide entre 2002 et 2004 (D'après Leblanc, 2005).

Produits	Nombre d'échantillons	Concentration moyenne d'acrylamide ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Coefficient de variation (%)
Céréales et produits à base de céréales	3304	343	156
Céréales et pâtes, crues ou bouillies	113	15	71
Céréales et pâtes, crues ou bouillies (grillées ou frites)	200	123	110
Pains et Rolls	2991	366	151
Pâtisseries et biscuits	1294	446	130
Céréales de petit déjeuner	1270	350	162
Pizza	369	96	131
Poissons et fruits de mer (panés ou frits)	52	25	180
Viandes et abats (cuits ou frits)	138	19	174
Lait et produits laitiers	62	5,8	119
Noix et graines	81	84	233
Légumineuses	44	51	137
Pommes de terre et produits à base de PDT	2068	477	108
Purée de PDT	33	16	92
PDT cuites au four	22	169	150
Chips de PDT	874	752	73
PDT frites	1097	334	128
Café (moulu, instantané ou torréfié)	205	288	51
Sucres, miel, chocolat	58	24	88
Légumes crues et bouillies	45	4,2	103
Légumes grillées ou frites	39	59	109
Fruits frais	11	0,8	188
Fruits secs ou frits ou grillés	37	131	125
Boissons alcooliques (bière, vin)	66	6,6	143
Condiments et sauces	20	71	345
Produits infantiles	32	181	106

Toxicologie de l'acrylamide

L'acrylamide est une substance classée par le CIRC (Centre International de Recherche contre le Cancer) en 2 A : « probablement cancérigène pour l'homme ».

Jusqu'en 2003, seuls des résultats d'études à partir d'acrylamide pure sont disponibles (AFSSA, 2002).

L'acrylamide n'est pas mutagène dans le test de AMES ni dans d'autres tests de mutagenèse in vitro mais elle est seulement positive dans le test sur lymphomes de souris. De ce fait, elle est considérée comme faiblement mutagène (AFSSA, 2002).

Dans le cas des essais in vivo sur cellules germinales, l'acrylamide a été capable d'induire des mutations transmissibles. De plus, ce composé est positif dans le test de dominance létale. L'acrylamide est un produit clastogène (à l'origine d'aberrations chromosomiques) donc considéré comme génotoxique (AFSSA, 2002).

Du fait de la forte capacité de l'acrylamide à se lier aux protéines, les adduits à l'hémoglobine constituent des marqueurs d'exposition chez l'homme. La réactivité envers l'ADN est plus faible et on note essentiellement des méthylations à forte dose. Le mécanisme d'activation doit probablement passer par une époxydation de la double liaison en 2-3 en glycidamide. Cette oxydation semble favorisée in vivo après absorption, puisque l'on détecte la formation d'adduit glycidamide liée à l'hémoglobine après ingestion d'aliment contenant de l'acrylamide (AFSSA, 2002).

Les études de cancérogenèse réalisées chez le rat à partir d'acrylamide ajoutée à l'eau de boisson montrent un effet cancérigène à 2 mg/kg avec apparition de tumeurs bénignes et malignes, thyroïdiennes, mammaires, du scrotum et du système nerveux central. A la dose de 0,5 mg/kg, on n'observe plus d'effet cancérigène. Chez l'homme, aucun effet cancérigène n'a été observé dans le cas d'exposition professionnelle. La formation d'adduits à l'hémoglobine servant de marqueur d'exposition, on note seulement des niveaux élevés d'adduits à l'hémoglobine chez les travailleurs exposés à l'acrylamide.

Plusieurs études cas-témoins sur la relation entre exposition à l'acrylamide par voie alimentaire et cancer ont été publiées. Aucune de ces études n'a permis de mettre en évidence un lien entre exposition alimentaire à l'acrylamide et augmentation du taux de cancers du rein, du sein, de l'intestin et de la vessie (Mucci et al., 2003; Pelucchi et al., 2003). Il convient toutefois de souligner que la méthodologie appliquée par ces études permet seulement d'étudier les grands

risques et que les résultats ne permettent pas de supprimer toute mise en garde. En contrepartie, des études très récentes associent une consommation élevée d'aliments riches en acrylamide à un risque plus élevé des cancers de sein et de rein (EFSA, 2008).

d. La carboxyméthyllysine

La carboxyméthyllysine (CML) est l'une des peu de molécules d'AGE qui ont été bien identifiées dans les tissus humains *in vivo* (Ahmed et al., 1986). On a montré que cette molécule est capable de s'accumuler avec l'âge, chez les personnes diabétiques, et dans le cas d'urémie (Dunn et al., 1991). De même, on a montré que la CML est un antigène majeur dans les protéines des tissus (Reddy et al., 1995 ; Ikeda et al., 1996). Par ailleurs, la formation de la CML exige des conditions oxydatives. En effet, l'apparition de la CML *in vitro* peut être inhibée par l'élimination de l'oxygène ou par l'utilisation des pièges des radicaux oxygène réactifs. Ainsi la formation de la CML peut être accélérée par l'introduction des radicaux oxygène réactifs tels que le radical hydroxyle, ou par celle de métaux de transition. Ces résultats montrent que la CML peut être utilisée comme un indicateur biologique du stress oxydatif (Cai et Hurst, 1999)

De nombreuses publications traitent de l'implication de la CML dans diverses maladies dégénératives, comme le développement de la cataracte, les complications vasculaires des sujets diabétiques, la neurodégénérescence, l'arthrite, l'athérosclérose (Dunn et al., 1991; Dyer et al., 1993; Hoffmann et al., 2002). En effet, la fixation de la carboxyméthyllysine aux récepteurs RAGEs endothéliaux induit un stress oxydant et une série de modifications fonctionnelles (Wautier et al., 1996). Les radicaux libres générés (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle) activent les MAP kinases et le facteur de transcription NFκB. Il y a alors augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL1-α, IL6, TNF- α) (Zoukourian et al., 1995).

La CML peut être formée au cours de l'auto-oxydation des glucides (aldoses et cétones, 3-deoxyglucosone (Niwa et al., 1998), ascorbate (Dunn et al., 1990) et à partir de la base de Schiff (Glomb et Monnier, 1995).

Elle est aussi formée après clivage oxydatif du produit d'Amadori en présence de métaux. La clivage a lieu entre le carbone n° 2 et le carbone n° 3 de la chaîne glucidique selon un mécanisme faisant intervenir des radicaux libres (Ahmed et al., 1986), et plus précisément des radicaux hydroxyyles générés par le couple Cu⁺ ou Fe²⁺/H₂O₂ (Nagai et al., 2000). Parallèlement, l'acide

érythronique est formé. La CML a été décrite comme un produit final de glycoxydation en raison de sa double appartenance aux phénomènes de glycation et d'oxydation (Dunn et al., 1991).

La CML se forme aussi par auto-oxydation des acides gras insaturés et condensation avec la lysine (Anderson et al., 1999). On parle alors d'ALEs (Advanced Lipoxidation End-products) (Fu et al., 1996).

Par ailleurs, la CML peut être formée par glycosylation oxydative, c'est-à-dire par réaction entre la lysine et le glyoxal issu de la dégradation oxydative du lactose (Wells-Knecht et al., 1995). La formation de CML à partir du glyoxal est beaucoup plus rapide que la dégradation du produit d'Amadori en CML. Le glyoxal pourrait constituer le produit commun dans les voies réactionnelles mettant en jeu l'acide ascorbique et les acides gras polyinsaturés (Figure 22) (Hamada et al., 1996).

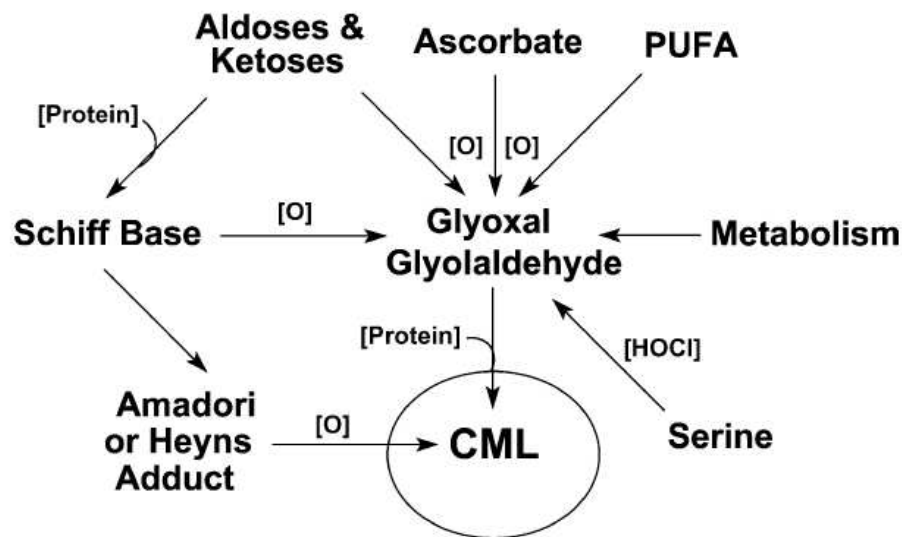


Figure 22. Les différentes voies possibles de formation de la CML (d'après Thorpe et Baynes, 2002).

Dans les aliments, Erbersdobler et al. (1989) a été le premier à mettre en évidence sa présence en quantités importantes dans des échantillons de lait stérilisés contenant de l'acide ascorbique. Cependant, depuis cette époque, peu d'études ont été réalisées sur la CML dans les aliments. La CML a été proposée comme marqueur des traitements thermiques sévères par Hewedi et al. (1994), car il ne se forme significativement qu'au-delà de barèmes thermiques élevés. Birlouez-Aragon et al. (2004) on soulevé le problème de la présence de CML en concentrations

importantes dans les laits infantiles, en raison de la présence simultanée de fer et de vitamine C dans ces aliments. En effet, la vitamine C semble un précurseur de la CML beaucoup plus efficace que le glucose (Leclère et Birlouez-Aragon, 2001).

Goldberg et al. (2004) ont déterminé récemment la teneur en CML dans 250 aliments du commerce. Ils notent la présence de concentrations considérables de CML les aliments à forte teneur en matière grasse (amandes grillées, huile, beurre, mayonnaise) ainsi que dans viandes (bœuf, porc et poulet) et poissons (saumon, truite et thon) cuits. Les valeurs les plus faibles ont été observées dans les céréales, le pain, le lait et les fruits et légumes. Notons cependant que la méthode utilisée pour ces dosages est un test ELISA qui semble peu appropriée pour l'analyse d'aliments aussi divers.

Le travail de Hoffmann et al. (2002) a révélé l'impact de l'ingestion de produits de Maillard, en particulier de la CML sur le niveau d'inflammation circulant (activité des macrophages et monocytes) chez des sujets diabétiques. Depuis, on a confirmé ces résultats chez des sujets sains, et a mis en évidence chez l'animal l'impact de ces composés de Maillard sur la réponse immunitaire et la cicatrisation (Hoffmann et al., 2002). Certaines de ces données ont été confirmées par d'autres auteurs ; récemment on a démontré lors d'une étude clinique que la CML est absorbée et biodisponible chez des enfants et des adultes sains (Birlouez-Aragon et al., 2007 ; Saavedra et al., 2008), mais les travaux restent très peu abondants.

V.2.2 La toxicité des produits d'oxydation et d'isomérisation des lipides

V.2.2.1 Les produits d'oxydation lipidique

De nombreuses études ont été menées sur la toxicité des lipides oxydés et de leurs produits de dégradation (Kubow, 1990 ; Ohta, 1985 ; Edem, 2002). Ces études ont concerné soit la toxicité des produits de peroxydation isolés, soit celle des huiles oxydées.

Toxicité

Bien que les hydroperoxydes lipidiques soient très toxiques lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse (lésions aortiques chez le lapin) (Addis, 1986), l'administration orale de ces hydroperoxydes à des animaux s'avère considérablement moins toxique, probablement à cause de leur faible biodisponibilité ou leur bioconversion en substances moins toxiques. Il semble que la glutathion peroxydase joue un rôle majeur dans ce processus de détoxification (Kubow, 1992).

Cependant, certaines études ont montré que, chez le rat, les hydroperoxydes de l'acide linoléique (C18 :2 n-6) sont absorbés dans le système circulatoire et incorporés au foie induisant alors de nombreux effets délétères tels qu'une hypertrophie du foie, une augmentation des activités transaminases sériques et une augmentation des niveaux d'hydroperoxydes hépatiques (Kanazawa et al., 1985).

En revanche, de nombreuses études confirment que les produits secondaires de peroxydation sont absorbés dans le système circulatoire après administration orale et distribués dans les différents organes, en particulier le foie où ils exercent de nombreux effets néfastes tels qu'une hypertrophie du foie. Outre les effets directs sur les organes, les produits secondaires de peroxydation d'origine alimentaire accentuent le stress oxydant en favorisant l'oxydation lipidique *in vivo* (Kubow, 1992).

Par ailleurs, des études de toxicité à long-terme chez des animaux ont montré que des huiles modérément oxydées (conditions réalistes) provoquent des lésions cardiaques et hépatiques (Kubow, 1992).

Athérogenèse

Des études menées sur l'animal et sur l'homme confirment le rôle athérogène des produits de peroxydation d'origine alimentaire. En effet, les études sur les animaux ont mis en évidence une association entre la consommation de rations alimentaires riches en produits de peroxydation et l'athérosclérose. D'autre part, des études cliniques sur l'homme ont montré que les niveaux de TBARS sont plus élevés dans les cholestérols des individus consommant de l'huile de soja oxydée thermiquement par comparaison avec les sujets contrôles consommant de l'huile non oxydée. D'autres études ont montré que les produits de peroxydation d'origine alimentaire peuvent accélérer l'accumulation des lipides oxydés dans les macrophages et monocytes chez l'homme, étape clé dans le processus d'athérogenèse. En effet, la reconnaissance et l'internalisation des LDL par les macrophages devient significative dès que les LDL sont sous forme oxydée, donc en particulier suite à l'ingestion de lipides oxydés. Ceci induit une augmentation non régulée de l'absorption des esters de cholestérol par les macrophages, suivie par une migration de ces derniers enrichis en lipides vers la surface de l'endothélium, causant la formation de plaque (Kubow et al., 1992).

Mutagénicité et carcinogénicité

Des études sur la mutagénicité et carcinogénicité des aliments oxydés ont suggéré le rôle des produits dérivés des hydroperoxydes dans le développement de tumeurs coliques en agissant comme mutagènes sur la muqueuse du colon. D'autre part, on a montré que les produits d'oxydation secondaire volatils, tels que les aldéhydes saturés et insaturés, les composés dicarbonylés et l'acroléine, sont mutagènes. Une activité mutagène modérée a été détectée dans la fraction polaire d'huiles de fritures (températures de fritures ne dépassant pas les 182°C).

Parmi les produits secondaires de peroxydation, le MDA a été le plus étudié en raison de ses activités mutagènes et cancérigènes. En raison de son poids moléculaire faible, le MDA est facilement absorbé, distribué et métabolisé, ce qui augmente son potentiel de toxicité. Par voie orale, le MDA induit chez des souris le développement de néoplasmes au niveau de l'estomac et du foie, ainsi que des lésions pancréatiques dues à des cellules exocrines atrophiées (Kubow, 1992 ; Fujioka et Shibamoto, 2004). En tant que dialdéhyde, le MDA entre dans des réactions croisées avec les protéines, réagit avec l'ADN, inactive la ribonucléase et induit des aberrations chromosomiques (Addis, 1986).

De même, on a montré que le glyoxal exerce une activité tumorigène au niveau de l'estomac du rat, alors que le méthylglyoxal inhibe la synthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN dans les cellules coliques de souris, et que le 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) provoque une nécrose au niveau des lymphocytes du thymus (Fujioka et Shibamoto, 2004). Du fait de son caractère électrophile, le 4-HNE entre en réaction avec les groupements thiols du glutathion et des protéines et inhibe la division cellulaire chez des cellules de mammifères ainsi que l'activité de certaines enzymes liées aux membranes et aux microsomes (Kubow, 1992).

V.2.2.2 Les acides gras *trans*

Peu d'études toxicologiques au sens strict du terme ont été effectuées sur les AG *trans*. Celles qui existent portent sur le mélange équipondéral synthétique de deux isomères conjugués de l'acide linoléique : le 18:2 9*c*,11*t* et le 18:2 10*t*,12*c*. Ce mélange, à des doses de 3 à 6 g/j, n'a pas entraîné d'effets sur les paramètres habituellement mesurés en toxicologie (AFSSA, 2005).

En revanche, les nombreuses études d'intervention ou épidémiologiques chez l'homme ont montré que l'augmentation de consommation en AGT entraîne un accroissement du risque cardiovasculaire. Pour des niveaux élevés de consommation, les AGT augmentent le LDL-

cholestérol tout comme les acides gras saturés et tendent à diminuer le HDL-cholestérol. Ces effets pourraient être induits par la protéine de transport des esters de cholestérol. Les acides gras *trans* augmentent aussi les taux de lipoprotéine LDL par comparaison aux autres acides gras (Zock et Katan, 1997 ; Koletzko et Desci, 1997 ; Weggemans et al., 2004 ; Combe et al., 2000).

Les effets cancérigènes éventuels des acides gras *trans* sont très controversés. Chez l'homme les résultats d'études portant sur l'influence des acides gras *trans* sur le cancer du sein et le cancer colorectal restent très nuancées ; en effet, certaines études ont démontré une association positive entre les acides gras *trans* et ces cancers (Lecerf et Cristiani, 2004 ; Bakker et al., 1997 ; Kohlmeier et al., 1997), alors que d'autres études ont confirmé le contraire (Holmes et al., 1999). En revanche, il semblerait qu'il n'y ait pas de relation entre les acides gras *trans* et le cancer de la prostate (Lecerf et Christiani, 2004 ; Stender et Dyerberg, 2004).

Par ailleurs, certaines études ont mis en évidence le passage des acides gras *trans* à travers le placenta et suggéré leur interférence avec le métabolisme des acides gras essentiels chez le fœtus. Les acides gras *trans* pourraient donc affecter le développement intra-utérin du fœtus. Il a été démontré que les acides gras *trans* réduisent le poids à la naissance et le périmètre crânien (Boue et al., 2001 ; Billeaud, 2000 ; Stender et Dyerberg, 2004).

D'autre part, certaines études ont trouvé une association positive entre la consommation des acides gras *trans* et le risque de diabète type-2 (Salméron et al., 2001). En effet, il paraît que la composition en acides gras des muscles et les acides gras d'origine alimentaire modulent l'action de l'insuline, et que les acides gras *trans* semblent augmenter la résistance insulinique (Bray et al., 2002 ; Christiansen et al., 1997 ; Alstrup et al., 1999).

V.2.2.3 Les oxyphytostérols

Les oxyphytostérols constituent une famille de composés dont les effets *in vivo* sont encore mal connus, mais dont l'importance pourrait être considérable. Ces composés ne sont présents qu'en petite quantité dans les aliments et les niveaux ingérés par l'homme sont faibles : van de Bovenkamp et al. (1988) estiment à quelques milligrammes les quantités ingérées par jour. La présence des oxyphytostérols dans la circulation sanguine est préoccupante et peut avoir des implications importantes sur la santé. En effet, les oxyphytostérols sont soupçonnés d'avoir divers effets cytotoxiques ou mutagènes (Meyer et Spiteller, 1997 ; Meyer et al., 1998). Dans une étude récente (Ryan et al., 2005), des effets toxiques similaires sur des cultures de cellules

humaines ont été trouvés pour les oxystérols et les oxyphytostérols. Cependant des concentrations plus élevées d'oxyphytostérols ont été nécessaires pour induire le même niveau de toxicité que celui des oxystérols. De plus, des études récentes ont détecté des niveaux significatifs d'oxyphytostérols dans le plasma de sujets sains (Grandgirard et al., 2004), car jusqu'ici seule la présence d'oxyphytostérols a été détectée dans le plasma de sujets présentant certaines pathologies telles que des sujets phytostérolaémiques (Plat et al., 2001). Cependant l'origine de ces oxyphytostérols dans le plasma humain n'est pas très connue. En effet, ils peuvent être d'origine alimentaire comme ils peuvent se former par oxydation in vivo des phytostérols présents dans le plasma sanguin (Grandgirard et al., 2004). Cependant, les effets biologiques des oxyphytostérols et leur biodisponibilité restent cependant très peu connus.

V.2.2.4 Conclusion sur la toxicité des composés néoformés

Le niveau de risque associé à l'ingestion des contaminants néoformés (CNF) est encore mal appréhendé. En effet, si la toxicité aiguë est suffisamment bien caractérisée pour permettre de fixer les seuils de toxicité, celle liée à une ingestion chronique à faible dose est encore débattue. En effet, la biodisponibilité de ces molécules n'est pas encore clairement établie, en particulier l'impact de la matrice alimentaire. De plus, les possibles effets de synergie ou d'antagonisme entre les différents contaminants néoformés ne sont pas encore étudiés. Enfin, l'impact biologique de ces contaminants à faible dose est mal caractérisé par manque de biomarqueurs pertinents, sensibles et précoces. Cependant, une étude clinique récente dans le cadre du projet ICARE, portant sur des volontaires sains, non fumeurs et soumis à deux régimes alimentaires contrastés quant à leur niveau de contamination en composés néoformés (régime standard constitué de produits grillés et frits, riches en composés néoformés indésirables et un régime vapeur, équivalent sur le plan nutritionnel, mais dont tous les aliments ont subi des transformations douces limitant la production des contaminants néoformés) a permis de mettre en évidence une absorption faible mais significative des contaminants néoformés, une diminution de l'insulinémie, des triglycérides plasmatiques et du cholestérol total chez les sujets soumis au régime pauvre en CNF, ainsi qu'une augmentation des taux plasmatiques d'acide gras oméga 3 totaux et des vitamines antioxydantes C et E chez les mêmes sujets, suggérant une baisse du stress oxydant. Le rôle spécifique des produits de Maillard formés au cours de ces cuissons et

absorbés, est mis en évidence par des corrélations significatives entre les produits de Maillard circulants ou urinaires et les changements métaboliques observés (Birlouez-Aragon et al., 2007).

VI. Conclusions

Les noix et graines représentent un milieu complexe où interagissent diverses entités chimiques. A température ambiante, les vitesses des réactions chimiques induites (oxydation lipidique et réaction de Maillard) sont faibles, mais une fois la matrice soumise à un traitement thermique, ces réactions s'accroissent selon les divers schémas réactionnels décrits dans ce chapitre, pour donner naissance à un produit texturé, poreux, coloré et ayant une odeur caractéristique des produits torréfiés.

Les mécanismes de ces réactions ne sont pas encore totalement élucidés, et les facteurs influençant leurs évolutions sont encore loin d'être connus surtout dans les aliments transformés. Ces réactions sont responsables d'une part, d'une perte de la qualité nutritionnelle des noix et graines du fait d'un blocage de la lysine (acide aminé essentiel et limitant dans les noix et graines) et d'une baisse de la digestibilité et, d'autre part, de la formation de nouvelles molécules, dites néoformées dont les répercussions sur la santé sont controversées. Citons la carboxyméthyllysine, produit commun de la réaction de Maillard générée par les sucres et les lipides oxydés et bon indicateur de l'ensemble des produits de Maillard (PRMs), et les produits de peroxydation lipidiques, dont nous avons étudié en détail dans ce chapitre le niveau de toxicité et les possibles effets physiologiques divers. Ces mélanges sont tellement complexes que seule une approche globale basée sur l'étude de quelques indicateurs paraît possible aujourd'hui. Aussi est-il important de disposer d'indicateurs et de méthodes simples pour les quantifier et pour évaluer la qualité nutritionnelle et toxicologique du produit, ainsi que suivre l'évolution des différentes réactions au cours de sa transformation industrielle. C'est l'objectif que nous nous sommes fixés pour l'étude de l'impact de la torréfaction. Nous avons donc choisi des marqueurs stables de ces réactions, que nous avons dosés par des méthodes analytiques standardisées dans les échantillons en cours de transformation. Mais parallèlement, nous avons également développé une approche rapide et non destructive, la fluorescence frontale, couplée à des méthodes chimiométriques, pour obtenir des informations globales sur l'impact du procédé sur le produit, et pour prédire la concentration en chacun des indicateurs d'intérêt.

CHAPITRE 3. Intérêt de la fluorescence frontale comme méthode alternative pour la caractérisation de la qualité des noix et graines transformées

Les techniques spectroscopiques sont de plus en plus utilisées dans les industries agroalimentaires. Avec l'adoption de plus en plus large du proche infrarouge comme moyen de caractérisation de la matière première, les industriels se familiarisent avec le principe de méthodes spectrales globales qui permettent une analyse indirecte de paramètres de qualité à un moindre coût. Les méthodes d'analyse conventionnelle sont pour leur part lentes, coûteuses, polluantes, demandent des techniciens hautement qualifiés et sont mal adaptées au contrôle des aliments sur une chaîne de production. De plus ces méthodes chimiques ne sont pas capables de couvrir la demande croissante des industries en analyses de routine (Karoui et al., 2003).

Pour répondre à ces besoins, un grand nombre de techniques instrumentales non destructives, comme la fluorescence, ont été développées, principalement pour déterminer la composition des aliments. Ces techniques analytiques présentent l'avantage d'être rapides, simples, moins coûteuses, non polluantes et pour autant au moins aussi sensibles que les méthodes conventionnelles. Elles peuvent être appliquées à la fois dans le domaine de la recherche fondamentale et de l'industrie alimentaire sur une chaîne de production (Karoui et al., 2003).

I. Principe de la fluorescence

La fluorescence est un phénomène physique qui résulte de l'émission de photons par une molécule appelée fluorophore à partir de l'énergie qu'elle a absorbée suite à son excitation par une radiation lumineuse dans l'ultraviolet et le visible. Le fluorophore en question est capable d'absorber l'énergie lumineuse d'une radiation dont le spectre énergétique présente un recouvrement presque total avec le spectre d'absorption de la molécule. L'énergie absorbée est relibérée ensuite sous forme de lumière selon un spectre d'émission de plus faible énergie, soit avec émission de photons de longueur d'onde plus élevée, selon le diagramme de Jablonski présenté dans la figure 23. Perrin a été le premier à caractériser les relations entre niveau d'énergie et fluorescence. Ultérieurement, Jablonski a proposé une représentation des différents

niveaux d'énergie et des sauts entre ces niveaux associés au phénomène de fluorescence (Jablonski, 1935).

La première étape du phénomène commence par l'excitation. Le fluorophore absorbe l'énergie E_0 provenant d'une source lumineuse et passe d'un état fondamental S_0 à un état excité S_1 avec changement d'orbitale des électrons.

Cet état excité S_1 a une durée de vie très courte (de l'ordre de la nanoseconde). Des changements de conformation et des interactions avec les molécules environnantes font passer progressivement la molécule au niveau énergétique excité le plus faible S'_1 : c'est la conversion interne.

Le passage de l'état excité S'_1 à l'état fondamental S_0 se fait avec libération d'un photon d'énergie E_1 , inférieure à E_0 , et donc de longueur d'onde supérieure à celle du photon absorbé : C'est l'émission de fluorescence (Strasburg et al., 1995 ; Christensen, 2005).

Les photons émis n'ont pas tous la même énergie. Elle dépend du niveau vibrationnel de l'état fondamental dans lequel se trouve le fluorophore après sa désexcitation : le spectre d'émission rend compte des propriétés spectrales de la lumière émise. Le spectre d'émission ne varie généralement pas en fonction de la longueur d'onde d'excitation. On observe un léger décalage vers le rouge du spectre lorsque l'on excite à l'extrême bordure rouge du spectre d'absorption. Cet effet rend compte des propriétés particulières d'interaction du fluorophore à l'état excité avec le solvant (Lakowicz, 1983).

Le spectre d'émission semble être l'image du spectre d'absorption à travers un miroir. Le déplacement vers le rouge du spectre d'émission par rapport au spectre d'absorption correspond à la perte d'énergie entre photon absorbé et photon émis. Cet effet est connu sous le nom de déplacement de Stokes. Il s'explique par les relaxations vibrationnelles qui s'opèrent au sein du fluorophore durant le phénomène de fluorescence.

Pour la plupart des autres molécules capables d'absorber l'énergie lumineuse, cette énergie est dissipée sous forme de chaleur : ces molécules absorbent la lumière mais ne fluorescent pas, ce sont donc des chromophores.

On considère qu'une molécule est fluorescente à partir du moment où au moins 50% des électrons excités retournent à l'état fondamental avec émission d'énergie lumineuse. Le rapport entre le nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés par le fluorophore correspond au rendement quantique de fluorescence Φ . Plus ce rendement est élevé, plus la fluorescence est efficace.

L'intensité de fluorescence d'une solution est ainsi proportionnelle à l'intensité d'excitation, à la concentration du fluorophore, à son coefficient d'extinction molaire, qui est une propriété intrinsèque de la molécule, et à son rendement quantique, qui, lui, varie en fonction du microenvironnement du fluorophore.

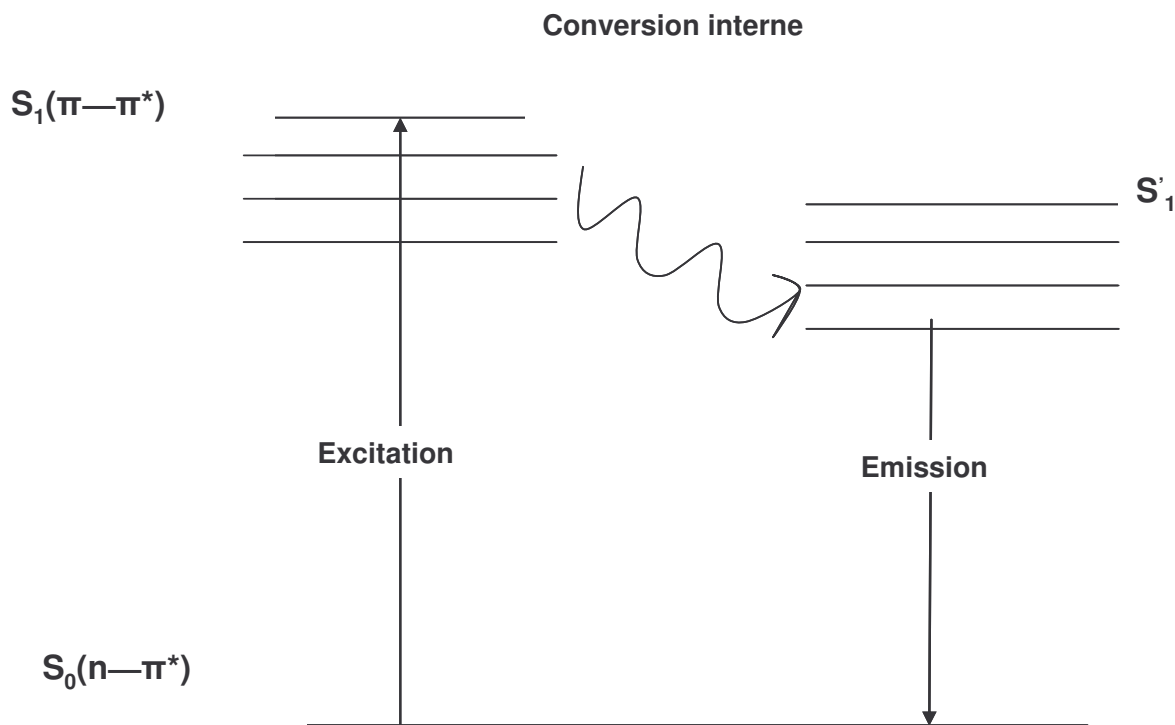


Figure 23. Principe de la fluorescence (Diagramme de Jablonski).

II. Phénomènes parasites en fluorimétrie

Divers phénomènes peuvent interférer avec la fluorescence, modifiant ainsi la forme et l'intensité du signal acquis.

a) « Quenching »: désexcitation des fluorophores par transfert d'énergie à d'autres molécules. Il existe deux types de quenching, collisionnel et statique, qui se distinguent par leur influence sur le temps de vie de fluorescence du fluorophore.

- Extinction par collision ("quenching" dynamique). Le contact d'un fluorophore à l'état excité avec une molécule dite extinctrice (la plus connue est l'oxygène) désexcite le fluorophore sans émission de photons. La diminution est fonction de la probabilité de collision entre l'extincteur et le fluorophore qui dépend soit de la diffusion moléculaire de l'extincteur dans la solution, et donc

de la viscosité du milieu, soit de la concentration de l'extincteur. Des températures élevées favorisent le quenching dynamique par augmentation de la diffusion moléculaire.

- Extinction par formation d'un complexe non fluorescent ("quenching" statique). Dans ce cas, comme pour l'extinction par collision, la diminution de l'intensité correspond à la diminution de la concentration de molécules fluorescentes.

- Extinction par transfert d'énergie. Le transfert d'énergie a lieu lorsqu'il y a recouvrement des spectres d'émission du fluorophore donneur et d'absorption de l'accepteur (figure 24). Ce recouvrement est essentiel à la possibilité de transfert entre le donneur et l'accepteur. Le transfert d'énergie ne met pas en jeu une émission de lumière, mais une interaction dipôle-dipôle entre le donneur et l'accepteur provoquant une désactivation du donneur excité. L'accepteur maintenant excité, peut être un fluorophore et revenir à l'état fondamental avec ou sans luminescence.

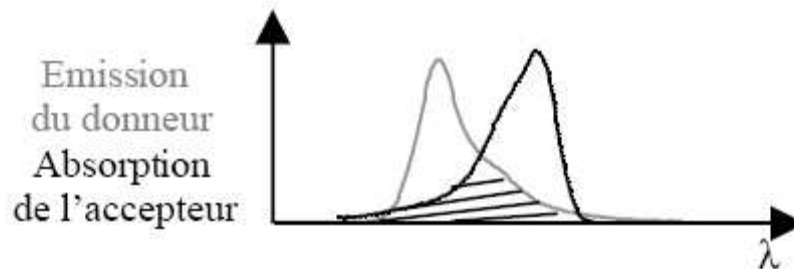


Figure 24. Recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur.

b) Quenching par effet écran : Les photons incidents sont absorbés significativement par un chromophore présent dans le milieu diminuant alors l'énergie lumineuse absorbée par le fluorophore.

c) Quenching par saturation du signal : dans le cas où le fluorophore est trop concentré, la quantité de lumière incidente est insuffisante entraînant une saturation du signal émis.

d) Réabsorption des photons de fluorescence par des molécules du milieu.

Ici, un certain recouvrement entre émission du donneur et excitation du recepneur est également nécessaire, mais ce sont les photons émis par le donneur qui sont absorbés par l'accepteur.

e) Phénomènes de diffusion (Figure 25)

- Diffusion Rayleigh est visible à la longueur d'onde d'excitation du fait d'une interaction élastique (sans perte d'énergie) entre le faisceau lumineux incident et la matrice.

- Diffusion Raman (1/1000 de la diffusion Rayleigh) correspondant à l'interaction des photons avec les molécules de solvant. Ce signal parasite est de moindre intensité par rapport à l'émission de fluorescence. De plus cette interaction est non élastique, et de l'énergie est perdu à chaque collision entraînant un déplacement du signal en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

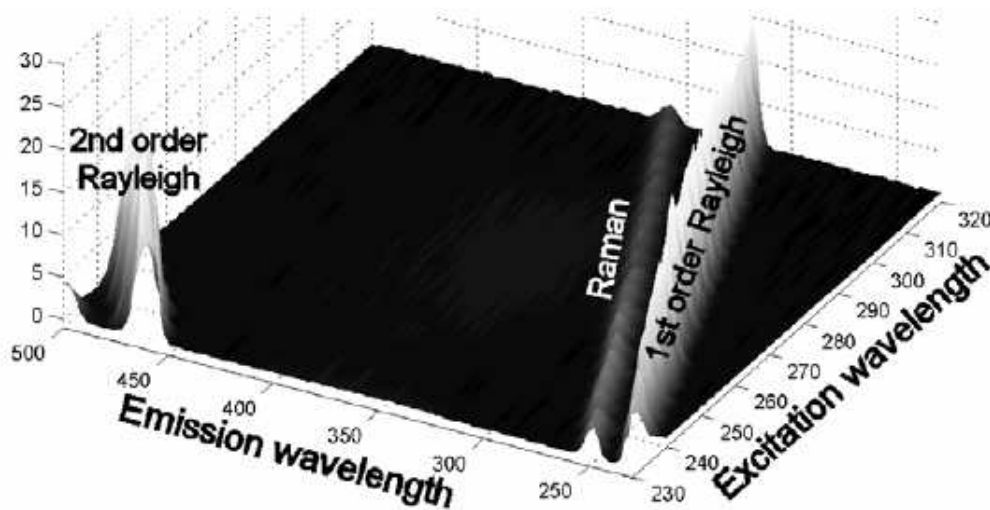


Figure 25. Matrice d'excitation et d'émission de l'eau pure, montrant les diffusions de Rayleigh et de Raman (d'après Rinnan, 2004).

III. Instrumentation, mesures, intérêts et limites

Les principaux composants d'un spectrofluorimètre sont présentés dans la figure 26.

Un spectrofluorimètre est formé de :

Une source de lumière (habituellement une lampe Xénon),

Un monochromateur ou filtre d'excitation,

Un porte-cuve,

Un monochromateur ou filtre d'émission,

Un détecteur de fluorescence de type photomultiplicateur pour convertir la lumière émise en signal électrique.

Mesure à l'aide d'un spectro-fluorimètre

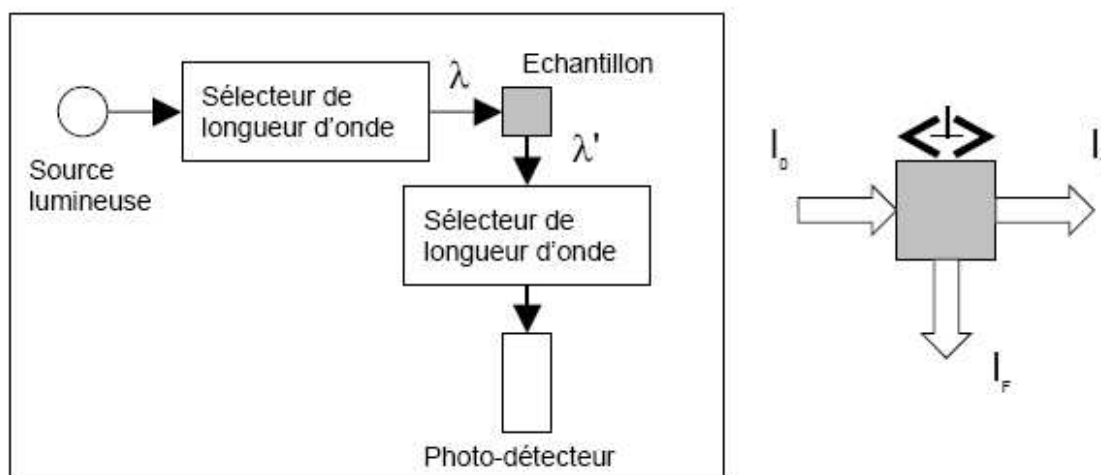


Figure 26. Schéma de principe d'un spectrofluorimètre.

Normalement, seuls les spectres d'excitation ou d'émission (c.à.d. une longueur d'onde fixe d'émission ou d'excitation) sont enregistrés à la fois. Néanmoins, il est souvent possible d'obtenir des matrices d'excitation et d'émission (ou luminescence totale), en balayant successivement une large plage de longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Ceci permet d'obtenir la totalité du signal émis par la matrice étudiée et donc de ne pas perdre d'informations. Les matrices de fluorescence sont en fait des cartes de l'ensemble des fluorophores d'un échantillon. Elles permettent de caractériser plusieurs fluorophores dans un mélange et permettent de trouver exactement les maxima d'excitation et d'émission, tout comme la structure correcte des pics (Christensen, 2005). Ainsi, les matrices de fluorescence contiennent plus d'information que de simples spectres isolés. En conséquence, une meilleure prédiction de certaines mesures d'intérêt dans l'échantillon peut être obtenue. Toutes les mesures de fluorescence décrites dans cette thèse ont été acquises sous forme de matrices d'excitation et d'émission en utilisant la spectroscopie de fluorescence en mode frontal.

La géométrie d'échantillonnage possède un effet considérable sur le signal de fluorescence émis. La méthode usuelle est la spectroscopie de fluorescence conventionnelle, dite «à angle droit». Cependant, cette méthode ne peut s'appliquer qu'à des solutions transparentes permettant le passage du faisceau lumineux sur toute la profondeur de la cuvette. Elle n'est donc pas applicable à l'analyse d'échantillons solides ou de suspensions turbides, pour lesquels seuls quelques dixièmes de mm sont pénétrés par la lumière. De fait, lorsque l'absorbance de l'échantillon

dépasse 0,1, les effets de diffusion induisent un quenching considérable de l'intensité de fluorescence et une distorsion des spectres d'excitation et d'émission. Par ailleurs, les solutions trop concentrées induisent un effet d'écran du fait que les chromophores absorbent les photons de la lumière incidente, entrant ainsi en compétition avec les fluorophores. Pour éviter ces problèmes, une méthode alternative – la spectroscopie de fluorescence frontale – a été développée afin de permettre l'application de la fluorescence à des matrices alimentaires turbides et concentrées, voire même à des produits solides ou en poudre (Dufour et al., 2003a ; Karoui et al., 2003). En mode frontal, l'angle d'incidence du faisceau d'excitation forme un angle α de 30°/60° avec la surface de l'échantillon. Ceci permet de mesurer la fluorescence émise en surface, et de minimiser l'effet de réflexion de la lumière sur la surface de la cuve de mesure et de l'échantillon. (Christensen, 2005) (Figure 27). Le trajet optique n'est alors que de quelques mm et dépend de la microstructure de l'échantillon (porosité, structure cristalline ou amorphe, taille des particules ...). Ce mode de mesure permet de s'affranchir des étapes d'extraction et/ou de dilution des échantillons. De plus la mesure rend compte ainsi de l'échantillon dans sa structure physico-chimique originelle, alors que la mesure d'un extrait renvoie une mesure parcellaire de l'échantillon.

La spectroscopie de fluorescence en mode frontal présente de très nombreux avantages : c'est une technique rapide, sensible, non invasive ou non destructive et peu coûteuse. Le temps d'enregistrement d'un spectre est de l'ordre de la seconde. De plus, la mesure est 100 à 1000 fois plus sensible que les autres techniques spectroscopiques Elle ne nécessite aucune préparation d'échantillon, si ce n'est un broyage pour rendre l'échantillon homogène lorsque la matrice est hétérogène. Elle donne des informations sur la présence de fluorophores et sur leur environnement moléculaire au sein de l'échantillon. En effet, les propriétés de fluorescence des fluorophores sont très sensibles aux modifications de leur environnement (Dufour et al., 2003a). La réponse varie alors selon la composition et les caractéristiques du milieu. Par exemple, la vitamine A incluse dans la matière grasse laitière présente des spectres de fluorescence différents lorsque les triglycérides sont sous forme cristalline ou liquide (Dufour et al., 1998). Un grand nombre de composés néoformés sont fluorescents dans une zone s'étalant de 310 à 500 nm à l'excitation et de 380 à 600 nm à l'émission. Cette technique est donc tout particulièrement adaptée à l'étude de ces composés dans les aliments soumis à un traitement thermique (Rizkallah et al., 2008).

En dépit de l'intérêt que présente la spectroscopie de fluorescence en mode frontal pour la caractérisation des produits alimentaires en l'état, peu de travaux ont été publiés dans ce domaine, contrairement à la spectroscopie infrarouge largement utilisée dans tous les domaines et en particulier dans l'agroalimentaire. Le manque d'intérêt pour cette technique peut s'expliquer par la composition complexe des produits alimentaires, la complexité des phénomènes optiques dans une matrice turbide (Rizkallah et al., 2008) ou par les faibles différences spectrales observées après un traitement technologique, rendant l'analyse et l'interprétation des données de fluorescence difficiles. Ainsi, il est généralement admis que de nombreux facteurs perturbent le signal de fluorescence. L'intensité de fluorescence enregistrée sur un échantillon varie fortement avec la température : généralement l'augmentation de la température conduit à une diminution de l'intensité de fluorescence (Wold, 2000). La couleur de l'échantillon modifie aussi de façon importante l'intensité de fluorescence mesurée. L'émission des échantillons clairs est plus importante que celle des échantillons foncés qui réabsorbent fortement les photons incidents aussi bien que émis (Wold, 2000). Par ailleurs, les zones de fluorescence de certains composés se superposent, entraînant un signal peu spécifique, difficilement identifiable et interprétable. L'analyse fait donc appel aux méthodes classiques de la chimiométrie (Christensen, 2005) telles que l'ACP (Analyse en Composantes Principales) (Dufour et al., 1997, 1998), la régression PLS (Partial Least Square) (Birlouez-Aragon et al., 2005; Allais et al., 2006) et plus récemment la déconvolution PARAFAC (PARAllel FACtor analysis) qui s'applique aux spectres de fluorescence en 3D (λ excitation; λ émission, n échantillons) (Christensen, 2005, Rizkallah, 2008).

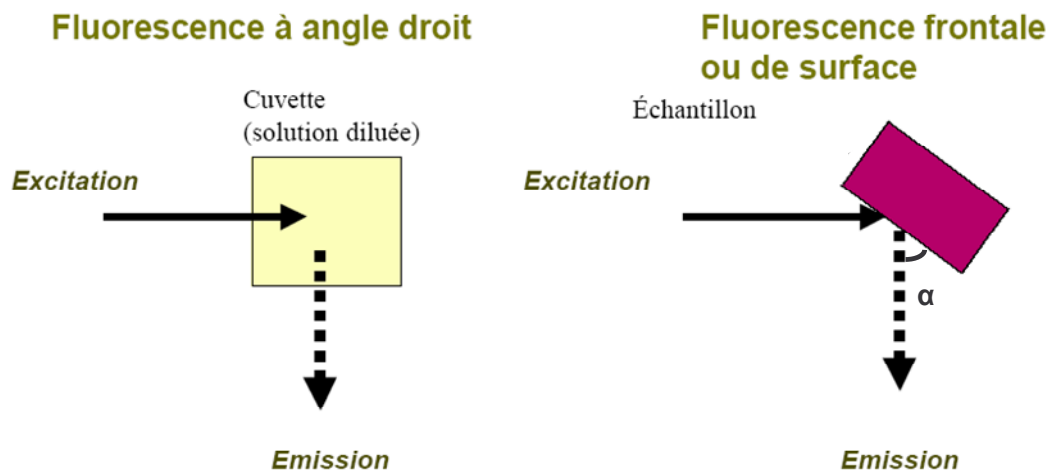


Figure 27. Schémas des principes de la fluorescence à angle droit et de la fluorescence frontale (d'après Dufour et Frenchia, 2001).

IV. La fluorescence intrinsèque des aliments

De nombreuses molécules sont capables d'absorber la lumière dans l'ultraviolet et dans le visible, mais peu sont capables d'émettre la lumière absorbée sous forme de fluorescence. En effet, les fluorophores présentent des structures moléculaires particulières du type multi-liaisons conjuguées ou noyaux aromatiques mono ou polycycliques, conférant à la molécule un squelette rigide (Christensen, 2005).

Parmi les fluorophores intrinsèques ou natifs susceptibles d'être présents dans les aliments, figurent certains acides aminés (tryptophane, tyrosine et phénylalanine), vitamines (vitamines A, E, B2 et B6), chlorophylle, polyphénols, porphyrines et al.caloïdes (Tableau 12).

Tableau 12. Caractéristiques de certains fluorophores intrinsèques dans les aliments (d'après Albani, 2001 ; Christensen, 2005 ; Lakowicz, 1999 ; Ramanujam, 2000).

Nom	Excitation max (nm)	Emission max (nm)
Tryptophane	290	350
Tyrosine	290	315
Phénylalanine	280	300
Riboflavine (vit B2)	350 & 450	550
Pyridoxine (vit B6)	310	400
Rétinol (vit A)	340	460
α -Tocophérol (vit E)	290	330
Polyphénols	280	310
NADH	340	470
ATP	300	390
Chlorophylle	470	670
Porphyrin	390	610

V. La fluorescence comme outil pour la caractérisation et le suivi de la qualité

V.1. La fluorescence comme outil d'enregistrement d'empreintes digitales du produit

Les aliments contiennent régulièrement un mélange de substances interagissant avec la lumière, parmi lesquelles un grand nombre de fluorophores à rendement quantique variable et présentant des recouvrements des spectres de fluorescence. De même, différentes molécules déforment par absorption, quenching et diffusion le signal acquis. Par conséquent, le signal de fluorescence mesuré dépend à la fois de la fluorescence et des propriétés optiques globales de chaque échantillon. Dans ce contexte, le signal de la fluorescence frontale peut être considéré comme une empreinte physico-chimique du produit (Christensen, 2005 ; Zandomeneghi, 2003). Cette empreinte spectrale hautement discriminative a été exploitée dans de nombreuses études dans des objectifs d'authentification et de classification d'une grande variété d'aliments.

La spectroscopie de fluorescence frontale constitue une technique de choix pour évaluer la qualité des aliments. Ainsi, la spectroscopie de fluorescence en mode frontal a été explorée comme un outil analytique permettant de déterminer les qualités rhéologiques, sensorielles et sanitaires des produits alimentaires. Les travaux menés sur les produits laitiers, les émulsions lipidiques, les huiles végétales, les céréales, et les viandes (Dufour et al., 2001, 2003b; Bonomi et al., 2004; Rampon et al., 2004 ; Granger et al., 2005; Karoui et al., 2005 ; Cheikhousman et al., 2004; Rizkallah et al., 2008), ont montré clairement que l'évolution de l'allure du spectre au cours d'un

procédé de transformation contient une information qui permet de caractériser et d'identifier les produits.

La fluorescence en mode frontal a été utilisée pour la discrimination entre poissons frais et poissons dégradés (Dufour et al., 2003a), entre poissons frais et poissons ayant subi un cycle de congélation/décongélation (Karoui et al., 2006a), entre œufs frais et non frais (Karoui et al., 2007), entre farines de céréales provenant de différentes variétés (Zandomenighi, 1999 ; Karoui et al., 2006b), la caractérisation de la texture des viandes, émulsions de viandes (Dufour et Francia, 2001 ; Allais et al., 2004), fromages (Dufour et al., 2001) ; Lebecque et al. (2001) et biscuits (Allais et al., 2006), ainsi que la caractérisation des fromages (Dufour et al., 1998), vins (Dufour et al., 2006), bières (Sikorska et al., 2004) et miels (Karoui et al., 2006d ; Ruoff et al., 2005).

V.2. La fluorescence comme outil de suivi et d'évaluation de la dégradation des aliments et des CNF issus de cette dégradation

Durant les traitements technologiques des aliments, en particulier durant les opérations nécessitant un traitement thermique sévère, de nombreuses réactions sont favorisées au sein de l'aliment, essentiellement les réactions d'oxydation lipidique et de Maillard. Un certain nombre de composés néoformés issus de ces réactions sont fluorescents. Dans d'autres cas, les précurseurs ou les produits de dégradation des CNF sont fluorescents. L'augmentation de la fluorescence des CNF dans la zone UV-visible peut donc renseigner sur la formation des CNF. D'autre part, et puisque les CNF s'accumulent avec le traitement thermique, la diminution de la fluorescence de certains constituants sensibles à la température, tels que la vitamine E et les polyphénols peut être également une indication de la dégradation thermique des aliments. Dans ce contexte, le contenu en CNF des aliments peut être prédit à partir du signal de la fluorescence frontale par l'approche de corrélation indirecte (Rizkallah et al., 2008). La présence d'un facteur commun (le traitement thermique) influant parallèlement le signal de fluorescence et le contenu des échantillons en CNF, rend en effet possible un étalonnage par corrélation indirecte. En adoptant cette méthodologie, nous avons réalisé dans cette thèse l'acquisition de matrices d'excitation et d'émission de différents échantillons issus de divers produits, et nous avons cherché à identifier l'information contenue dans le signal spécifiquement liée à la sévérité du traitement thermique et aux étapes du procédé de transformation industrielle. Cette information a

été par la suite utilisée pour construire des modèles d'étalonnage et de prédiction du contenu des échantillons en CNF, mesuré par les méthodes d'analyse chimique conventionnelles.

V.2.1 Fluorescence des produits de peroxydation

Certains composés, formés à partir de lipides oxydés et de groupements aminés (addition de Michael via une base de Schiff), présentent des propriétés fluorescentes (Figure 28). Cela est d'autant plus vrai que les composés lipidiques carbonylés possèdent plusieurs insaturations. Les produits fluorescents néoformés peuvent être classés en 2 groupes :

- le premier groupe comprend les fluorophores aminés de structure simple (exemple, 1- aminopentane: λ excitation max = 340 à 350 nm et λ émission max = 410 à 420 nm).

- le deuxième groupe comprend les fluorophores plus complexes, composés de protéines ou de polypeptides (λ excitation max = 350 à 360 nm et λ émission max = 420 à 430nm).

Esterbauer et al. (1986) ont montré que le HNE (hydroxynonenal), comme le MDA, réagissait avec les phospho-aminolipides et formait des produits fluorescents ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 360nm/430nm).

Gutteridge et al. (1977) et Underland et al. (1998) ont effectué des mesures de produits fluorescents formés au cours du stockage de matières grasses d'origine marine. Ces produits sont issus de la réaction entre des amines peptidiques et des produits d'oxydation d'acide gras très insaturés.

Plusieurs études ont démontré l'intérêt de la spectroscopie de fluorescence dans le suivi de l'oxydation des lipides des viandes de volailles et de porc (Olsen et al., 2005 ; Wold et al., 2000 et 2002), le jambon de parme (Moller et al., 2003), les poissons (Aubourg, 1999), les fromages (Christensen et al., 2003 ; Karoui et al., 2006c), le lait en poudre (Liang, 2000), les huiles végétales chauffées ou de friture (Sikorska et al., 2004 ; Cheikhousman et al., 2005), le soja torréfié (Birlouez-Aragon et al., 2001), les cacahuètes, les flocons d'avoine et le muesli (Jensen et al., 2004). La spectroscopie de fluorescence est également sensible à la photooxydation des produits laitiers (Becker et al., 2003 ; Christensen et al., 2005 ; Wold et al., 2002). De bonnes prédictions des indices d'anisidine, d'iode et de vitamine E ont été obtenues lors du suivi de la détérioration des huiles de friture (Engelsen et al., 1997).

du lait et prédisent l'apparition de produits de Maillard grâce à des régressions de type PLS (partial least square) (Birlouez-Aragon et al., 2005).

VI. Conclusions

Ce chapitre montre le double intérêt de la fluorescence en mode frontal du point de vue analytique : elle permet d'une part de caractériser les changements physiques complexes qui ont lieu tout au long des procédés industriels, notamment des traitements thermiques, et d'autre part d'appréhender les variations chimiques globales dans les aliments, en suivant à la fois la dégradation des fluorophores intrinsèques et l'apparition de fluorophores néoformés. La spectroscopie de fluorescence frontale apparaît donc comme une alternative séduisante et rapide pour l'évaluation de la qualité des noix et graines torréfiées.

Nous pouvons également constater d'après la synthèse bibliographique sur les études de fluorescence dans les différentes matrices alimentaires, que l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence sur les noix et graines n'a pas été proposée jusqu'ici, ce champ d'étude restant donc encore à explorer. Il nous est apparu alors intéressant de développer une méthode analytique rapide basée sur la fluorescence et couplée à des méthodes chimiométriques telles que la décomposition PARAFAC pour évaluer et suivre la qualité des noix et graines pendant leur transformation industrielle. Une telle approche nous permettra de nous affranchir des longues étapes fastidieuses associées aux méthodes analytiques conventionnelles.

CHAPITRE 4. Evaluation de l'exposition au risque alimentaire

L'évaluation de l'exposition est définie comme l'évaluation qualitative et/ou quantitative de l'ingestion d'agents biologiques, chimiques et physiques par le biais d'aliments, ainsi que par suite de l'exposition à d'autres sources, le cas échéant.

Elle constitue une étape majeure de l'évaluation du risque. Elle permet d'identifier d'une part les groupes de population à risque en termes d'exposition et d'autre part les substances les plus préoccupantes en termes de santé publique. Elle peut être aussi utilisée pour déterminer des relations entre la présence et la sévérité de certaines pathologies observées chez l'homme et l'exposition à une substance particulière. Elles sont également utiles à la prise de décisions en matière de réglementation des produits chimiques et de sécurité des produits alimentaires.

Il existe plusieurs méthodes permettant l'évaluation de l'exposition. Celles-ci reposent généralement sur deux approches (Kroes et al., 2002):

- celle fixant a priori, à partir des limites maximales résiduelles (LMR) ou taux d'utilisation maximaux autorisés (TMA) pour chacune des denrées alimentaires susceptibles de renfermer la substance considérée, et en prenant les consommations maximales des différents groupes de population. Cette évaluation par excès est généralement très conservatrice puisqu'elle postule une consommation quotidienne de la substance durant toute la vie de l'individu, aux doses les plus élevées permises. Il convient de remarquer que les LMR ou les TMA s'appliquent aux denrées non transformées, et ne tiennent pas compte des phénomènes de dilution, ou au contraire de concentration, pouvant résulter des processus technologiques appliqués aux aliments.

- celle prenant en compte séparément la contamination réelle des aliments et la consommation de ces aliments, qui intègre l'incidence des processus technologiques appliqués aux aliments, voire la variabilité des comportements alimentaires. Trois méthodes existent (tableau 13) : études de la ration totale, études sélectives de denrées alimentaires déterminées, et études des repas dupliqués (WHO, 1985 ; Parmar et al., 1997 ; Kroes et al., 2002).

L'évaluation de l'exposition peut être aussi basée sur l'évaluation de la dose interne ou de biomarqueurs. Dans cette démarche l'exposition alimentaire est reconstruite à partir des résultats d'analyses biochimiques effectués sur les prélèvements biologiques humains.

Cependant l'usage de cette méthode demeure encore marginal.

Tableau 13. Comparaison des différentes méthodes d'évaluation de l'exposition alimentaire.

Caractéristiques	Etude de la ration totale	Etude sélective des denrées alimentaires	Etude des repas dupliqués
Echantillonnage des aliments	Aliments constitutifs du panier de la ménagère	Aliments de base et aliments fortement contaminés	Alimentation dupliquée
Cible	Population – groupe de population	Population – groupe de population	Groupes de population restreints – individus
Aliments	Tels que normalement consommés (cuits)	Crus ou cuits	Tels que normalement consommés (cuits)
Données de consommation nécessaires	Oui	Oui	Non
Analyse d'aliments	Aliments déterminés ou mélanges	Denrées alimentaires sélectives	Repas dupliqué

On voit donc que, la plupart des méthodes utilisées pour l'évaluation de l'exposition à un produit chimique nécessitent:

- Une information sur la concentration du produit chimique présent dans les différents aliments.
- Une information sur la consommation de ces aliments par les différentes tranches d'âges ou groupes de la population.
- Et finalement le choix d'un modèle de croisement entre les données de contamination et celles de consommation alimentaire (à l'exception de la méthode de l'alimentation dupliquée).

I. Données de contamination

Pour évaluer l'exposition à une substance toxique, une estimation de sa concentration dans les aliments est nécessaire. Cette estimation repose sur deux approches:

- celle assumant la présence des substances étudiées dans les aliments à leur LMR ou TMA tels qu'ils sont indiqués dans les différentes directives.
- celle reposant sur une détermination analytique de la contamination réelle des aliments consommés. Dans ce cas la sélection des échantillons et des méthodes d'analyses est critique pour l'obtention d'une information précise et comparable à un niveau international.

I.1. L'échantillonnage

Pour obtenir des résultats fiables l'échantillonnage doit être: 1) représentatif, 2) complet : c.à.d. permettre de refléter autant que possible la distribution probable des niveaux de contamination du

produit chimique dans les différents échantillons prélevés; en effet plus les échantillons sont hétérogènes de point de vue concentration en produit chimique, plus le nombre d'échantillons à prélever doit être élevé et 3) être porté si possible sur le produit tel que consommé et non pas sur la matière première afin de permettre une élimination des effets de perte ou de concentration dues aux différents processus de traitement (Thompson et Byers, 1994).

Il existe deux types de plan d'échantillonnage :

- Plan d'échantillonnage aléatoire : qui consiste à prélever d'une façon aléatoire un certain nombre d'échantillons pour analyse ultérieure. Le nombre d'échantillons à prélever est stratifié en fonction des figures de production, de consommation ou finalement de partition du marché (marques).
- Plan d'échantillonnage ciblé : qui consiste à prélever des échantillons connus ou suspects de contenir des concentrations «plus élevés que les limites permises» en un produit chimique dans un but de contrôle.

D'une façon générale, c'est le plan d'échantillonnage aléatoire qui est utilisé lorsque l'objectif est une évaluation de l'exposition car l'échantillonnage ciblé a tendance à exagérer d'une façon significative les niveaux actuels ou réels de contamination par les produits chimiques et par la suite l'exposition humaine à ceux-ci (Renwick, 1999).

I.2. Choix de la méthode analytique

Une fois qu'un échantillon représentatif est obtenu, le choix de la méthode analytique à adopter joue un rôle critique pour l'obtention des résultats valides et comparables (Kroes et al., 2002). En effet, il existe différentes méthodes analytiques qui peuvent être utilisées pour la détection et le dosage d'un produit chimique déterminé. Le choix de la méthode va dépendre essentiellement de l'objectif du dosage: ainsi pour un dépistage qualitatif ou pour la quantification des produits chimiques présents à des concentrations élevées, des méthodes analytiques peu sensibles peuvent être utilisées ; alors que pour la quantification des produits chimiques présents à des faibles concentrations l'usage des méthodes analytiques très sensibles est indispensable. Cependant quelque soit la méthode adoptée, elle doit être validée et sa limite de détection (LOD) ainsi que sa limite de quantification (LOQ) doivent être déterminées et spécifiées.

II. Recueil des données de consommation alimentaire

Afin d'évaluer les problèmes de santé que risque de poser la présence des éléments toxiques dans les aliments, il convient de déterminer dans quelle mesure les quantités réellement ingérées dans une population approchent ou dépassent les doses tolérables. Pour déterminer les quantités réellement ingérées dans une population, il faut disposer de données sur les habitudes alimentaires et la consommation des différents aliments et groupes d'aliments ainsi que des données sur le niveau de contamination des différents aliments et /ou groupes d'aliments (WHO, 1985 ; Petersen et al., 1994 ; Kroes et al., 2002) :

- des méthodes soustractives appliquées à la consommation alimentaire au niveau national (bilans alimentaires)
- des méthodes soustractives de détermination de la consommation ménagère (enquêtes ménagères)
- Des enquêtes alimentaires individuelles.

L'information obtenue par les bilans alimentaires porte sur la quantité d'aliment disponible par individu de la population indépendamment de son âge et de son genre. Il s'agit d'une estimation grossière de la consommation individuelle moyenne (surestimation) car elle ne permet pas de distinguer entre consommateur et non consommateur ni d'identifier les sous groupes de la population qui sont à risque (WHO, 1999) d'une part, et d'autre part elle ne tient pas compte des phénomènes de dilutions ou de concentrations liés aux processus de traitement. Cette estimation est souvent multipliée par un facteur de 10 pour tenir compte de la fraction potentielle des consommateurs et des gros consommateurs. Les bilans alimentaires sont surtout utilisés pour évaluer la variation des tendances alimentaires au cours du temps. Ils sont également utilisés dans l'évaluation de l'exposition aux résidus de pesticides et aux contaminants naturels qui sont essentiellement évalués dans les aliments bruts. Finalement ils sont utilisés comme une première étape pour évaluer l'exposition aux substances chimiques et ils peuvent être utiles pour les comparaisons entre les pays.

L'information obtenue à partir des enquêtes au niveau des ménages porte sur les achats alimentaires de ceux ci. Ces enquêtes ne fournissent pas de l'information sur la façon avec laquelle les aliments ont été préparés, ni sur la consommation réelle de ses membres, ni finalement sur la consommation alimentaire en dehors des ménages.

Contrairement aux deux méthodes précédentes, l'information obtenue par les enquêtes de consommation alimentaire porte directement sur les consommations alimentaires moyennes et leur distribution pour un groupe d'individus bien définis (Nelson et Bingham, 1997). Elle comporte d'une façon générale une description plus en moins détaillée:

- du type d'aliment consommé (cru, cuit, transformé, mode de préparation...)
- de la quantité consommée (portion)
- de la fréquence de consommation
- du profil du consommateur (ex: âge, genre, indice de masse corporelle (IMC), culture, état de santé...).

Et/ou des informations supplémentaires :

- saison/jour de la semaine
- région/culture
- revenus/facteurs socioéconomiques

Cependant il est important de noter qu'il n'existe pas une méthode idéale pour estimer la consommation alimentaire; le choix de la méthode à adopter va généralement dépendre de plusieurs facteurs entre autres (Biro et al., 2002) (tableau 14):

- l'objectif de l'étude (nutrition ou toxicologie)
- la cible (individu ou population)
- les caractéristiques de la population (âge, sexe, éducation, motivation, niveau de compréhension)
- les moyens disponibles
- le temps disponible
- le risque de sur ou sous estimation.

En ce qui concerne l'évaluation du risque alimentaire, l'idéal est bien sûr de disposer de données de consommation individuelle précises sur une période assez longue. En effet, dès que l'on s'intéresse à des expositions chroniques, c'est la consommation individuelle de long terme qui importe. Les méthodes historiques et de fréquence (FFQ) sont généralement utilisées pour cette fin. Contrairement aux méthodes d'enregistrement et de rappel de la consommation alimentaire, le questionnaire de fréquence permet d'étudier les modes de consommation habituels sur une

période de temps relativement longue, souvent une année (WHO, 1985 ; Barrett-Connor, 1991 ; Thompson et Byers, 1994). Le questionnaire de fréquence comporte une liste structurée d'aliments ou de groupes d'aliments ; l'objectif d'un tel questionnaire est d'évaluer la fréquence de consommation de chaque item durant une période de temps spécifiée (par exemple, nombre de fois par jour, semaine, mois ou année) (Zulkifli et Yu, 1992). Le nombre d'aliments sur la liste peut varier d'une dizaine d'items à plus de 200 selon les études ; la liste est brève quand l'objectif est l'étude d'une ou deux substances bien spécifiées. La liste est élaborée en fonction des aliments et des recettes d'usage culturel courant dans certains pays ou régions (Barrett-Connor, 1991). Le développement de la liste d'aliments est crucial pour le succès de la méthode.

Les questionnaires de fréquence peuvent être qualitatifs, semi-quantitatifs ou complètement quantitatifs. Les questionnaires qualitatifs fournissent des informations sur la fréquence de consommation de chaque item durant une période spécifiée sans préciser la taille des portions habituellement consommées. Les questionnaires semi-quantitatifs permettent d'estimer la portion consommée de certains mais pas de tous les items sur la liste ou demande aux sujets d'indiquer combien de fois, en moyenne, ils consomment une certaine portion (quantité) spécifiée de chaque item (Thompson & Byers, 1994). Un questionnaire quantitatif fournit des informations sur la quantité usuellement consommée de chaque item figurant sur la liste en permettant au répondeur d'indiquer, pour chaque aliment, la quantité qu'il consomme habituellement en faisant des comparaisons avec des mesures ménagères, des mesures en trois dimensions, un cahier de photos ou des portions standards de référence (Thompson et Byers, 1994 ; Kroes et al., 2002). Le questionnaire est, selon les études, rempli seul (auto administré) ou avec un enquêteur. Cette méthode d'évaluation de la consommation n'exige pas un niveau d'instruction très élevé de la part de l'enquêté et ne lui est habituellement pas contraignante (WHO, 1985). Elle peut être utilisée pour la collecte des données rétrospectives sur la consommation de certains aliments dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. Elle peut aussi fournir des données sur la consommation de groupes particuliers d'aliments potentiellement contaminés et susceptibles de prédominer dans la ration totale (WHO, 1985).

Dans les études réalisées avec l'objectif d'évaluer l'exposition à des contaminants alimentaires, différentes approches ont été utilisées pour la collecte des données de consommation. Dans certaines études, les données de consommation fournies par les bilans alimentaires nationaux ont été utilisés pour sélectionner le groupe d'aliments d'intérêt (Varo et Koivistoinen, 1980). Les

enquêtes de consommation ménagères ont été exploitées dans d'autres études (Chen et Gao, 1993 ; Cuadrado et al., 1995).

Les données fournies par des enquêtes de consommation individuelles ont été également utilisées dans plusieurs études d'évaluation de l'exposition alimentaire (MacIntosh et al., 1996 ; Saleh et al., 1998 ; Leblanc et al., 2004).

Tableau 14. Etude de consommation alimentaire - comparaison entre les différentes méthodes.

Méthode	Durée sur laquelle porte l'étude	Niveau	Repose sur la mémoire	Contraintes à l'enquête	Contraintes/dépenses pour le personnel de terrain	Variation inter-individuelle	Variation intra-individuelle	Enquête à grande échelle	Informations sur la taille des portions	Traitement de données
Bilans alimentaires	1 année	Pas	Non	Aucune	Aucune	Non	Non	Convient	Non	Aucun
Enquêtes ménagères	2 semaines	Ménage	Non	Importantes	Importantes ; deux visites à domicile	Non	Non	Convient	Non	Travail considérable
Relevé de la consommation alimentaire	1-7 jours	Individu	Non	Importantes	Moyennes ; visites à domicile et instructions	Oui	Oui (>2 jours)	Convient	Oui	Travail considérable
Carnet alimentaire par pesée	1-7 jours	Individu	Non	Importantes	Importantes ; visites à domicile	Oui	Oui (>2 jours)	Ne convient pas	Oui	Travail considérable
Interrogatoire de rappel de 24 heures	1-2 jours	Individu	Oui	Légères	Importantes ; entretiens individuels	Oui	Oui (>2 jours)	Convient	Oui	Travail considérable
Histoire alimentaire	1-12 mois	Individu	Oui	Moyennes	Importantes ; entretiens individuels	Oui	Oui	Convient	Oui	Travail considérable
Questionnaire de fréquence	1-12 mois	Individu	Oui	Moyennes	Moyennes	Oui	Oui	Convient	Non/oui	Travail considérable
Repas dupliqués	1 jour	Individu	Non	Importante	Importantes ; deux visites à domicile	Oui	Oui	Ne convient pas	Oui	Aucun

III. Méthodes d'intégration des données de consommation alimentaire et des données de contamination : modélisation de l'exposition au danger alimentaire

A l'exception des études basées sur la méthode de l'alimentation dupliquée, les données de consommation et les données de contamination se rapportant au même individu n'existent pas. Pour cela, l'évaluation de l'exposition à un danger dans l'alimentation va nécessiter un certain degré de modélisation afin de tenter de créer une représentation réelle de l'exposition.

La modélisation consiste à croiser les données de consommation avec les données de contamination selon le principe général suivant (Thompson et Byers, 1994):

Exposition = consommation x contamination

Ce croisement peut être réalisé selon trois approches: 1) une approche déterministe, 2) une simple distribution ou 3) une approche probabiliste.

III.1. Approche déterministe

Cette approche consiste à multiplier une valeur fixe de la consommation par une valeur fixe de la contamination (limite moyenne ou maximale), puis à sommer l'exposition de toutes les sources alimentaires (Kroes et al., 2002) :

$$\text{Ex (mg/j)} = \Sigma [\text{cons de } D_i \text{ (kg/j)} \times \text{Conc dans } D_i \text{ (mg/kg)}]$$

Ex : exposition quotidienne

D_i : denrée alimentaire D_i

Cons de D_i : consommation relative à D_i

Conc dans D_i : concentration du contaminant dans D_i

La valeur fixe relative aux données de consommation peut être choisie de manière à représenter le niveau de consommation moyen (individu moyen) ou par contre le niveau de consommation extrême. La valeur fixe relative aux données de contamination peut être choisie de manière à

représenter la concentration moyenne du contaminant ou en revanche, la concentration maximale de ce même contaminant.

L'approche déterministe est généralement considérée comme la méthode la plus appropriée pour une première évaluation de l'exposition dans une population parce qu'elle est relativement simple à mener (Parmar et al., 1997 ; Kroes et al., 2002).

Cependant cette méthode ne permet pas de refléter la distribution de l'exposition au sein de la population, ni de souligner les facteurs influençant les résultats puisqu'elle suppose que tous les individus consomment la même quantité d'un aliment spécifique qui a un niveau de contamination fixe. Quand les valeurs maximales de consommation ou de concentration sont utilisées, cette méthode peut aboutir à une surestimation, parfois irréaliste, de l'exposition (Kroes et al., 2002). Pourtant, quand l'apport alimentaire d'un contaminant est très faible en comparaison avec les doses toxicologiques de référence même quand les valeurs maximales de contamination et/ou de consommation sont utilisées, ceci peut être suffisant pour décider de ne pas entamer d'autres évaluations plus élaborées de l'exposition (Kroes et al., 2002).

III.2. Simple distribution de l'exposition

Cette approche consiste à utiliser la totalité de la courbe de consommation qui est alors croisée à une valeur fixe de la contamination.

Cette approche à l'avantage d'être plus informative que l'approche déterministe puisqu'elle tient en compte la variabilité de la consommation alimentaire entre les individus de la population étudiée. Cependant elle présente l'inconvénient d'être conservative puisqu'elle suppose qu'un aliment spécifique est toujours contaminé par le même danger et que celui-ci est toujours présent à la même teneur.

Cette approche est utilisée surtout pour estimer la limite supérieure de l'exposition à un danger déterminé (Kroes et al., 2002). Elle a été appliquée par Leblanc et al. (2004) pour évaluer l'exposition de la population française aux mycotoxines, métaux lourds et éléments traces.

III.3. Approche probabiliste

Cette approche utilise la totalité de la courbe de consommation ainsi que la totalité de la courbe de contamination. Les données sont croisées entre elles par l'usage de logiciels contenant des formules mathématiques prédéfinies (Slob et Pieters, 1998).

Cette approche a l'avantage de simuler la distribution de l'exposition au sein d'une population donnée (totalité de la courbe de consommation). De plus elle permet la détermination de la probabilité pour qu'un fort consommateur soit exposé au delà de la valeur toxicologique de référence ainsi que la détermination du pourcentage des consommateurs fortement exposés. Elle permet également de quantifier l'incertitude associée à l'estimation de l'exposition.

Cependant elle nécessite la présence d'un nombre suffisant de données représentatives et l'utilisation des plans d'échantillonnage aléatoires ainsi que d'un modèle mathématique adapté à la question afin d'éviter une approche très homogène pour des problèmes différents. A rajouter à ceux ci la faible acceptabilité de cette approche par le consommateur: en effet les études sociologiques montrent que le consommateur n'accepte pas un risque probable même si sa probabilité est faible, d'où la difficulté dans la communication du risque avec le gestionnaire.

IV. Données existantes sur l'exposition aux composés néoformés

Nous savons aujourd'hui que l'exposition aux CNF n'est pas négligeable. Une étude clinique récente dans le cadre du projet ICARE (Tessier et al., 2007), portant sur des volontaires sains, non fumeurs et soumis à deux régimes alimentaires contrastés quant à leur niveau de contamination en composés néoformés montre que l'exposition journalière aux principaux CNF des denrées alimentaires varie entre quelques microgrammes pour certaines molécules (acrylamide, furane...) et plusieurs dizaines de milligrammes pour d'autres (CML, FL, ...). En effet, Elle s'élève à 6 mg, 31,6 µg, 549 µg, 54,3 µg et 1,5 g de CML, d'acrylamide, d'HMF, de furane et d'AGT par jour respectivement dans le régime standard contre 2,3 mg, 5,9 µg, 13 µg, 42,2 µg and 0,9 g dans le régime bouilli. Ces concentrations en CNF du régime standard s'avèrent similaires à celles qu'on peut trouver dans les régimes occidentaux actuels. Si l'on se réfère au principe de TTC (Threshold of Toxicological Concern) utilisé par le comité sur les additifs alimentaires de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'Organisation Mondiale de la Santé, il apparaît fondamental d'évaluer le potentiel toxique des CNF alimentaires dont les apports alimentaires sont supérieurs au TTC (1,5 µg/personne/jour) (Kroes et al., 2000). Précisons que ces organismes appliquent le principe de TTC à des molécules aussi variées que les pesticides, les métaux lourds, les solvants, les additifs alimentaires et autres molécules de faibles poids moléculaires telles que l'acrylamide.

IV.1. Données sur les acides gras *trans*

La littérature scientifique montre qu'une consommation quotidienne supérieure au seuil de 2 % de l'apport énergétique total (AET) sous forme d'AGT totaux (soit un apport de 4 g/j pour les femmes et 5 g/j pour les hommes) entraîne une augmentation significative du risque de MCV. L'AFSSA recommande de considérer cette valeur comme un niveau de consommation à ne pas dépasser. Il a été constaté que 5 % de la population française adulte présente une consommation en AGT totaux de 2 % de l'AET. Ce seuil de 2 % est dépassé par environ 10 % des garçons de la tranche d'âge 12-14 ans, qui constituent la classe de la population la plus exposée à une surconsommation d'AGT (Léger et Razanamahefa, 2005).

Pour donner au consommateur des moyens efficaces d'atteindre les recommandations précédemment énoncées, la réglementation fixe la teneur maximale des AGT dans les aliments à 1 g/100 g de produit sous sa forme consommée (Léger et Razanamahefa, 2005).

Une synthèse des données de consommation des AGT dans les principaux pays industrialisés et en Europe est donnée dans les tableaux 15 et 16.

Tableau 15. Synthèse des données de consommation des AG *trans* en g/jour de l'étude TRANSFAIR en Europe (d'après Hulshof et al., 1999).

Pays	Hommes	Femmes
Islande	6,7	4,1
Pays-bas	4,8	3,8
Norvège	4,8	3,2
Belgique	4,4	3,6
Suède	3,0	2,3
Danemark	2,9	2,3
Royaume-Uni	2,8	
France	2,7	2,1
Allemagne	2,4	1,9
Finlande	2,3	1,9
Espagne	2,1	
Italie	1,6	
Portugal	1,6	
Grèce	1,2	1,7

Tableau 16. Synthèse des données de consommation des AGT dans les principaux pays industrialisés.

Pays	Étude	Année (s)	Méthode de recueil	Consommation AG trans totaux	Références
États-Unis	Transversale	1980-1982 à 1995-1997	Rappel de 24 heures	8,3 à 6,2 g/j 3 % à 2,2 % AET	Harnack <i>et al.</i> , 2003
États-Unis	24 hommes 27 femmes	1996	Questionnaire de fréquence	5 g/j 2,24 % AET	Lemaitre <i>et al.</i> , 1998
États-Unis	Enquête représentative de la population	1989-1991	Rappel de 24 heures	2,6 % AET 7,4 % des lipides totaux 6,6 g/j d'AG-trans hommes 4,6 g/j d'AG-trans femmes	Allison <i>et al.</i> , 1999
Canada	Femmes parturientes canadiennes (60)	2000-2002	Questionnaire	3,8 g/j d'AG-trans	(Elias <i>et al.</i> , 2002)
Canada	Regroupement de données Population canadienne	1995	Composition et vente	8,4 g/j d'AG-trans 1 g/j de d'AG trans par la margarine ménagère	(Ratnayake <i>et al.</i> , 1998)
Espagne	100 personnes de la région du Leon	2001	Rappel de 24 heures	3,1 g/j d'AG-trans hommes 2,21 g/j d'AG-trans femmes	Capita and Alonso-Calleja,
Espagne	Regroupement de données	1992	Composition et données de consommation	2,4 g/j d'AG-trans	Boatella <i>et al.</i> , 1993
Pays-bas	Prospective 667 hommes Zutphen Elderly Study	1985 à 1995	Enquête alimentaire	4,3 % à 1,9 % AET	Oomen <i>et al.</i> , 2001
Allemagne	Enquête nationale	1996	Composition et données de consommation	1,9 g/j d'AG trans femmes 2,3 g/j d'AG trans hommes	Fritsche <i>et al.</i> , 1997
Danemark	Regroupement de données	1997	Composition et vente	1,1 g/j de 18:1 trans apportés par les margarines	Ovesen <i>et al.</i> , 1998
Europe (Transfair)	Transversale	1998	Données de consommation disponibles dans chaque pays	2,40 g/j d'AG-trans hommes 1,98 g/j d'AG-trans femmes	Van de Vijver <i>et al.</i> , 2000

IV.2. Données sur l'acrylamide

En se fondant sur les premiers résultats de dosage d'acrylamide dans différentes matrices alimentaires fournis par la Suède, la Suisse, le Royaume-Uni, la Norvège et les Etats-Unis figurant dans l'avis du Comité scientifique européen de l'alimentation humaine, l'exposition moyenne de la population des pays développés a été estimée entre 0,3 et 0,8 µg/kg p.c./j par les experts de la consultation FAO/WHO (2002).

L'exposition moyenne de la population française à l'acrylamide est de 0,5 µg/kg p.c./j pour les adultes (15 ans et plus) et 1,1 µg/kg p.c./j pour les forts consommateurs (percentile 95) (AFSSA, 2004).

Dans une étude récente, l'exposition à l'acrylamide par le régime alimentaire pour différents groupes d'âge de la population hollandaise a été analysée et les résultats utilisés pour estimer l'exposition à l'acrylamide des consommateurs ayant participé à l'enquête nationale de consommation alimentaire menée en 1998. L'exposition journalière à l'acrylamide a été estimée par une méthode probabiliste. Il a été conclu que le risque de neurotoxicité est négligeable, mais que le risque de cancer ne l'était peut être pas (Konings et al., 2003). Dans une autre étude récente, l'apport alimentaire d'acrylamide estimé pour la population suédoise a été de 31 mg/personne/jour en moyenne à partir d'une série d'aliments/groupes de produits ayant des concentrations d'acrylamide faibles à fortes (<30–2300 mg/kg), tels que produits transformés à base de pomme de terre, pain, céréales de petit déjeuner, biscuits, galettes, amuse-gueule et café (Svensson et al., 2003).

V. Conclusions

Il n'existe pas, comme nous avons pu le constater, de méthode unique pour évaluer le risque d'exposition d'une population : ces méthodes sont multiples et complémentaires. Par ailleurs, bien apprécier le risque toxicologique exige de prendre en considération les limites de ces méthodes et de rapprocher le plus possible les données obtenues de données épidémiologiques appropriées.

Ce rapide aperçu des connaissances relatives à l'importance des systèmes d'évaluation de risque, et en particulier l'évaluation de l'exposition au risque, en tant qu'outil d'orientation des actions précises de prévention ou de réduction des risques alimentaires d'une part et aux composés néoformés en tant que risques alimentaires d'autre part nous permet de dégager quelques questions soulevant d'importants points de recherche: Quels sont la fréquence et le niveau de présence des composés néoformés dans ces types d'aliments disponibles dans une région où les systèmes de contrôle alimentaire, des normes et des systèmes d'analyse des risques sont déficients (voire absents) telle que la région du moyen orient ? Et quels sont les niveaux d'exposition aux composés néoformés dans une population qui a un régime alimentaire

relativement riche en graines et fruits oléagineux ? En d'autres termes les composés néoformés constituent-ils un risque alimentaire pour une population d'une région type moyen orient?

L'examen de ces questions nous a amenés à ancrer nos recherches sur l'évaluation de l'exposition aux composés néoformés chez des adultes d'une population de la région du moyen orient: le Liban, où l'essor du secteur agro-alimentaire couplé à une déficience dans les systèmes de sécurité alimentaire et aux habitudes alimentaires locales est en faveur de la présence de ce type de risques alimentaires.

PARTIE II. MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE 1. Collecte des échantillons

Afin de déterminer les étapes critiques du procédé de transformation responsables de l'apparition de ces molécules et de l'amplification des réactions d'oxydation, des industries produisant des noix et graines grillées d'une part, et de la tahina (pâte de sésame) d'autre part ont été sélectionnées, et les procédés de transformation spécifique de chaque industrie ont été décrits.

Des échantillons issus des industries concernées ont été prélevés à chaque étape de la chaîne de production, de la matière première au produit fini, et analysés suivant les méthodes décrites plus bas.

Le procédé de production de la tahina est comme suit : Les graines de sésame sont nettoyées à l'eau puis décortiquées grâce à une machine après immersion dans l'eau pendant 2 heures. Les graines sont séparées des membranes par différence de densité après immersion dans une eau saline (180-200 g/L). Elles sont ensuite dessalées par lavage à l'eau douce puis séchées et rôties à une température de 115°C pendant 2 heures. Les graines grillées (de couleur brun-jaunâtre) sont ensuite broyées à la meule de pierre pour former une pâte visqueuse (température à la sortie est de 50°C) qui est stérilisée (100°C, 30 min) puis conditionnée dans des conteneurs en plastique.

Le procédé de torréfaction des noix est détaillé dans l'annexe 3.

Pour l'étude de l'exposition aux NFC, il fallait disposer d'échantillons issus du commerce. Pour cela, des échantillons de noix et de tahina appartenant à 5 marques différentes ont été collectés sur plusieurs marchés de grande surface (7 échantillons par marque). Au total 140 échantillons ont été collectés. Les échantillons de chaque produit et de chaque marque ont été poolés en mélange équipondéral de manière à former un échantillon composite par marque et par produit.

CHAPITRE 2. Méthodes analytiques

I. Analyses biochimiques

I.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau des échantillons a été déterminée selon la méthode normalisée ISO 665-2000 pour les noix et graines. Environ 10 g d'échantillon broyé (M_1) sont pesés précisément dans des coupelles inox et placés une nuit à l'étuve (Thermosi SR 3000) à 103 °C jusqu'à obtenir un poids constant. Après refroidissement dans un dessiccateur, la matière sèche obtenue est pesée (M_2) avec une balance électronique de précision (Mettler Toledo AB 104S). Les analyses sont réalisées en triple.

La teneur en eau des échantillons est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (g/100g)} = \frac{(M_1 - M_2) \times 100}{M_1}$$

La proportion de matière sèche est calculée selon la formule :

$$\text{Matière sèche (MS) (g/100g)} = \frac{M_2 \times 100}{M_1}$$

Les résultats sont calculés à partir de la moyenne des trois déterminations.

I.2. Détermination de la teneur en lipides totaux

Afin de réaliser l'extraction des lipides des échantillons de noix et graines, nous avons adopté la méthode normalisée AFNOR V 03-030, spécialement développée pour l'évaluation de l'oxydation des lipides, ou pour la caractérisation des lipides en général. Cette technique douce repose sur une extraction à froid des lipides par un mélange de solvant hexane/isopropanol (3/2 ; v/v), permettant ainsi de limiter toute peroxydation artéfactuelle pendant la manipulation. Cette méthode permet d'obtenir un extrait lipidique non altéré sur lequel peut être valablement réalisée toute détermination sur la composition et la qualité. Le mélange de solvant choisi permet d'extraire les lipides neutres (triglycérides) et les lipides polaires (glycérides partiels, acides gras libres, composés de l'insaponifiable, phospholipides et composés d'oxydation). Des essais comparatifs ont prouvé la similitude des résultats obtenus avec cette méthode et ceux obtenus avec une extraction au Soxhlet. Les solvants sont additionnés de 25 mg/L de BHT (Fluka 34750) afin de limiter l'oxydation lipidique au cours des extractions. Les extractions sont effectuées en

plaçant systématiquement les récipients contenant les échantillons dans de la glace et à l'abri de la lumière. La pesée de l'extrait lipidique après évaporation à vide du solvant permet de calculer la teneur en lipides exprimée en g de lipides pour 100 g d'échantillon. Trois extractions sont réalisées pour un même échantillon et la moyenne des valeurs obtenues calculée.

I.3. Détermination de la teneur en protéines

La teneur en protéines (azote total x 6,25) a été déterminée par le dosage de l'azote par combustion au moyen d'un analyseur élémentaire d'azote de modèle LECO FP-528. L'appareil consomme les échantillons à très haute température (850-900°C) afin de transformer l'azote protéique en azote moléculaire. Le calcul de la teneur en azote a été effectué par l'appareil selon des étalons de calibration. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la matière sèche.

I.4. Dosage des polyphénols totaux

Principe

Les polyphénols totaux ont été estimés par la méthode de Folin-Ciocalteu (Scalbert et al., 1989). Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum est 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les échantillons.

Protocole

Extraction des composés phénoliques : 2 g d'échantillon broyé sont délipidés avec de l'hexane puis les polyphénols sont extraits par un mélange de méthanol/eau (75/25 ; v/v) sous ultrasons (Branson B-2200 E4) pendant 15 min et à 4°C pour empêcher l'action de polyphénoloxydases qui dégraderaient les composés phénoliques. Après centrifugation (8000g, 15 min, 4°C) (Beckman coulter, CH-AVJE), le surnageant contenant les polyphénols est récupéré. On procède à une deuxième extraction identique sur le culot pour extraire les polyphénols résiduels et donc d'obtenir un dosage plus exhaustif.

Dosage des polyphénols totaux

On réalise une gamme étalon dans du méthanol/eau avec l'acide gallique entre 0 et 250 mg/L. Pour réaliser le dosage, 800 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma 47641, dilué 10 fois dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés à 200 μ L d'extrait méthanolique ou de point de gamme, puis le mélange est laissé pour 2 min à température ambiante. On ajoute ensuite 1 mL de carbonate de sodium (75g.L⁻¹). Le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénol est réalisé comme le point 0 μ g.ml⁻¹ de la gamme. Les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et échantillon, sont agités et incubés 15 min à 50°C. La lecture de l'absorbance à 760 nm se fait grâce à un spectrophotomètre UV 1205 (Shimadzu, Europa, GMBH). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique par 100 g de matière sèche.

I.5. Dosage des tocophérols

Les isomères de tocophérols (α , β + γ et δ tocophérols) ont été séparés et quantifiés par HPLC en phase inverse C18 (colonne Equisil ODS 5 μ m, 250 \times 4.6 mm, Cluzeau) selon la méthode développée par Birlouez-Aragon et al. (1995).

2 ml d'extrait lipidique à la dilution appropriée sont versés dans des vials HPLC pour dosage. L'injection se fait par injecteur automatique (autosampler HPLC 560, système 522). 20 μ l de chaque solution sont injectés. La phase mobile est constituée de 342 ml acétonitrile, 110 ml tétrahydrofurane, 34 ml méthanol, et 14 ml d'acétate d'ammonium à 1g/100ml. Le flux est de 1,2 ml/min. L'élution des tocophérols se fait par ordre décroissant de polarité. L'ordre d'élution va ainsi du composé le plus polaire (δ -tocophérol) à celui le moins polaire (α -tocophérol) : α -tocophérol \rightarrow (β + γ)- tocophérol \rightarrow δ tocophérol, où les formes β et γ co-éluent.

La détection se fait par fluorescence (détecteur FL 3000, Thermo Separation Products) aux longueurs d'onde maximales respectives d'excitation et d'émission de 290/330 nm. Les aires des pics sont enregistrées par le logiciel Kromatosystem version KS 2000.

Les étalons des tocophérols (Merck 9832, Darmstadt, Germany) sont dilués dans le méthanol, et la concentration est vérifiée grâce aux coefficients d'extinction molaire, cela permet d'établir les concentrations en tocophérols de l'échantillon (aire échantillon/aire étalon).

α -Toc (292 nm): ϵ % = 76

β -Toc (296 nm): ϵ % = 89

γ -Toc (292 nm): ϵ % = 91

δ -Toc (292 nm): ϵ % = 87.

II. Détermination du degré d'oxydation des lipides

II.1. Produits primaires de l'oxydation des lipides

II.1.1 Dosage des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes sont des produits intermédiaires instables qui sont rapidement dégradés pour donner des composés hydroxylés et carbonylés. Les concentrations en hydroperoxydes mesurées correspondent en fait à la différence entre formation et décomposition des peroxydes.

Choix de la méthode

Le dosage des hydroperoxydes a été réalisé par une méthode colorimétrique indirecte appelée « FOX » selon Jiang et al. (1990). Ce dosage colorimétrique a pour objectif de quantifier les hydroperoxydes (ROOH) présents au sein des échantillons. Cette méthode a l'avantage d'être facile à mettre en œuvre comparée aux méthodes de chimiluminescence ou d'indice de peroxyde. De plus, cette méthode présente de meilleures reproductibilité et sensibilité, et s'avère plus adaptée à la détection de l'oxydation pendant les étapes précoces par rapport à la méthode iodométrique. En effet cette dernière, utilisée de manière empirique, paraît non adaptée pour détecter des niveaux faibles en hydroperoxydes en raison de la difficulté trouvée pour repérer le point final de titration (Gray, 1978).

Principe

En milieu acide, les hydroperoxydes extraits des échantillons par le méthanol, oxydent le Fe^{2+} (présent dans le réactif) en Fe^{3+} . Ce dernier forme un complexe coloré (chromophore de couleur brune) avec le xylénol orange. Ce complexe coloré possède un maximum d'absorption à 560 nm. Les hydroperoxydes présents dans l'extrait sont alors quantifiés par spectrophotométrie et par référence à une courbe étalon en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Protocole

Le réactif « FOX » est réalisé par pesée de 98 mg de sel de Mohr (Fluka 09719) et 78 mg de xylénol orange (RDH 33825), 1,24 ml d'acide sulfurique 94% qsp 100 ml d'eau déminéralisée. Avant le dosage cette solution est diluée 10 fois dans le méthanol et quelques cristaux de BHT (1%) (Fluka 34750) sont ajoutés, cette solution servira de réactif.

Pour l'essai, 100 mg +/- 5 mg d'extrait lipidique sont pesés qsp 10 ml de propanol-1 (Fluka 59310), 2400 µL de cette solution est mélangée à 600 µl de réactif suivi d'une incubation à l'obscurité de 30 minutes. La solution obtenue est filtrée sur un filtre nylon (Cluzeau) et l'absorbance est mesurée à 560 nm avec un spectrophotomètre (Unicam, UV-visible).

Parallèlement une gamme de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, Fluka 31642) de 5 ou 6 points compris entre 0,1 et 5 mM est réalisée à chaque série dans les mêmes conditions. La dilution du H₂O₂ à 30 % est réalisée avec de l'eau distillée. La gamme permet d'obtenir un résultat en mmol équivalent H₂O₂ par 100 mg de lipides.

II.2. Produits secondaires de l'oxydation des lipides

La nature des aldéhydes et leurs proportions relatives dépendent beaucoup de l'acide gras oxydé. Deux méthodes colorimétriques sont employées couramment pour les doser : l'indice de p-anisidine et le test à l'acide thiobarbiturique.

II.2.1 Dosage des aldéhydes par l'indice de p-anisidine

Choix de la méthode

Ce dosage a été adapté d'une méthode de détection en ligne de Labrinea et al. (2001). Cet indice est représentatif de la formation des aldéhydes, spécifiquement les aldéhydes conjugués.

Principe

La détermination de l'indice de para-anisidine repose sur le principe qu'en milieu acétique la p-anisidine donne un complexe coloré en jaune avec des diénals conjugués.

L'indice de p-anisidine est défini comme 100 fois l'absorbance mesurée à 350nm d'une solution résultant de la réaction entre 1 g de lipides et 100 ml de solvants et réactifs.

Protocole

Une solution de p-anisidine (Fluka 10490) dans le propanol à 0,039 mol/L est préparée. 1 g d'extrait lipidique sont dilués dans 15 ml de propanol. 300 µL d'huile diluée est mélangée avec 1,9 ml de la solution de p-anisidine et 0,7 ml d'acide acétique glacial, l'absorbance de ce mélange est mesuré à 350nm.

II.2.2 Dosage des substances réactives l'acide thiobarbiturique (sr-TBA)

Le test à l'acide 2-thiobarbiturique repose sur la formation d'un complexe coloré rose résultant de la réaction entre une molécule de malonalaldéhyde et deux molécules d'acide 2-thiobarbiturique. Le complexe coloré formé absorbe à 532-535 nm. De nombreuses adaptations de cette méthode ont été proposées (Vincke, 1970 ; Guillén-Sans & Guzmán- Chozas, 1998 ; Wang et al., 2002). Des aldéhydes tels que les 4-hydroxy-alcénal, les 2,4- alcadiénal, les 2-alcénal réagissent également avec l'acide 2-thiobarbiturique pour former un complexe coloré (Sun et al., 2001). C'est la raison pour laquelle le terme de « substances réactives à l'acide thiobarbiturique » (sr-TBA) est employé. La réaction du TBA est réalisée en milieu acide (pH 1-2) et à haute température (70°C-100°C) pour accélérer la vitesse de réaction et augmenter la sensibilité. Certaines substances de nature glucidique sont susceptibles d'interférer avec le test.

Choix de la méthode

La méthode à l'acide thiobarbiturique est la méthode la plus couramment utilisée pour le dosage des composés secondaires de l'oxydation des lipides. La méthode utilisée pour notre étude est celle de Genot (1996) qui est une adaptation des méthodes de Salih et al. (1987) et Bostoglou et al. (1994). Cette méthode permet de travailler directement sur l'échantillon sans passer par une extraction des lipides lourde et susceptible de modifier la teneur initiale en produits d'oxydation.

Principe

Les produits secondaires de l'oxydation des lipides les plus couramment dosés sont les aldéhydes. L'acide thiobarbiturique (TBA) réagit avec le malonalaldéhyde (MDA) pour former un complexe de couleur rose et/ou jaune possédant un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 532 nm. Il réagit également avec d'autres aldéhydes résultant de l'oxydation des AGPI à longue chaîne. La concentration en substances réactives au TBA (sr-TBA), exprimée en équivalent MDA, est évaluée par la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre visible des sr-TBA extraites des échantillons par l'acide trichloroacétique (TCA).

Protocole

2 g d'échantillon sont pesés dans des tubes de 25 ml et les tubes sont déposés dans la glace pilée pour limiter l'oxydation. 100 µL de solution de BHT (1 mg/ml) dans l'éthanol et 16 mL d'acide

trichloroacétique à 5% (p/v) sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé 3 fois pendant 15 secondes à l'aide d'un homogénéisateur à une vitesse d'environ 20 000 rpm. Le broyat est filtré sur filtres plissés. A 2 mL de filtrat sont ajoutés 2 mL d'acide thiobarbiturique (20 mol.L⁻¹). Pour les blancs, 2 mL d'acide thiobarbiturique sont ajoutés à 2 mL d'acide trichloroacétique. Les tubes, fermés, sont mis au bain-marie (Memmert) à 70°C pendant 30 minutes. A la sortie du bain-marie les tubes sont placés dans un bain d'eau froide. L'absorbance est mesurée à 532 nm avec un spectrophotomètre (Unicam, UV-visible). La conversion de l'absorbance, mesurée à $\lambda=532$ nm, en équivalents de malonaldéhyde (mg/kg d'échantillon ou ppm) est obtenue en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du complexe MDA-TBA : $1,56.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Buedge et al., 1978).

Le mode de calcul est le suivant :

$$\text{mg équivalent MDA/Kg} = (A_{532} \times V \text{ TCA} \times 2 \times M.10^{-2}) / (1,56 \times m)$$

Avec V TCA : volume du solvant d'extraction (16 mL)

m : masse de l'échantillon analysée (g)

M : masse moléculaire du malonaldéhyde = 72 g.mol^{-1}

III. Dosage des composés néoformés

III.1. Analyse du profil d'acides gras et dosage des AGT par CPG

Choix de la méthode

La composition en acides gras des extraits lipidiques des noix et graines et la teneur en isomères *trans* d'acides gras ont été déterminées en une seule analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) des esters méthyliques d'acides gras selon la méthode normalisée AFNOR ISO 15304:2002 (F).

Principe

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Un gaz vecteur, appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne, refermant une phase stationnaire. Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase stationnaire et est entraîné par la phase mobile. Les solutés, en fonction de leur nature, sont plus ou moins retenus et sortent de la

colonne séparés au sein de la phase mobile. Un détecteur placé en sortie de colonne permet de détecter la présence d'un soluté au sein du gaz vecteur. Le temps de rétention caractérise qualitativement la substance concernée. L'amplitude ou l'aire des pics permet de déterminer la concentration des différents solutés dans le mélange initial. Dans le cas des acides gras (AG), l'injection en CPG de l'extrait lipidique est précédé d'une méthylation directe des AG, présents sous forme libre ou estérifiés au glycol dans le mélange, afin de rendre volatils ces acides gras. Les esters méthyliques d'acides gras de l'échantillon sont séparés alors par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire avec une phase stationnaire de polarité élevée, et ceci par rapport à la longueur de leur chaîne, au degré de saturation ou d'insaturation, ainsi qu'à la géométrie et à la position des doubles liaisons.

Protocole

a. Méthylation des acides gras

Les triglycérides sont attaqués par de la soude et les acides gras libérés sont estérifiés par le méthanol sous catalyse acide.

Dans un tube pouvant être bouché, 50 à 100 mg d'extrait lipidique sont pesées précisément et ajoutés de 1 mL d'heptane contenant le standard interne (acide heptadécanoïque à 1,91 mg/ml). Le mélange est agité pendant 2 secondes. 0,2 mL de NaOH méthanolique (2 mol/L) sont ensuite ajoutés et les tubes sont bouchés et agités vigoureusement pendant 10 secondes. Le mélange est porté au bain-marie à 50°C pendant 20 secondes puis agités 10 secondes. 0,4 mL d'HCl méthanolique (1 mol/L) sont ensuite ajoutés et le mélange est agité puis laissé décanter. Le surnageant est enfin récupéré et dilué 15 fois, en transvasant vers le flacon d'analyse de la chromatographie en phase gazeuse.

b. Chromatographie en phase gazeuse

L'appareillage utilisé est un chromatographe Auto system Gas Chromatography (XL), Perkin Elmer, France.

Les esters méthyliques sont injectés dans le chromatographe à l'aide d'un passeur automatique. Le système d'injection est un système d'injection fonctionnant en mode Split/Splitless (taux de split 1 :100) et le volume injecté est de 1 µL. La température de l'injecteur est de 170°C.

La colonne est une colonne capillaire à polarité élevée (BPX 90, SGE). La longueur de la colonne est de 30 mètres, elle mesure 0,25 mm de diamètre et l'épaisseur de la phase stationnaire est de 0,25 µm. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit constant de 0,7 mL/min, et une pression en tête de colonne de 150 kPa.

Le programme de température utilisé est défini comme suit : température initiale (145°C) maintenue pendant 1 min, puis on passe à 170°C à 10°C/min ; la température de 170°C est maintenue pendant 10 min, avant de passer à 230°C avec une rampe de 15°C/min ; la température finale de 230°C est maintenue pendant 4 min.

La température du détecteur à ionisation de flamme (FID) placé en sortie de colonne est de 290°C. Le détecteur est relié à un système d'acquisition et de traitement du signal (ChromQuest software).

L'identification des acides gras est réalisée par comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux d'étalons. Pour cela, des étalons externes divers (Supelco) ont été utilisés : esters méthyliques d'huile de colza, huile de tournesol certifiée et un mix d'esters méthyliques, analysés dans des conditions opératoires identiques à celle de l'essai. Pour identifier les acides gras *trans*, des standards Supelco C18:1 *9-t* (acide élaïdique, Alltech 5123309), C18:2 *9c,12t* et C18:2 *9t,12t* (acide linoélaïdique, Alltech 5128203) ont été utilisés.

La quantification des acides gras est réalisée grâce à l'utilisation d'un étalon interne (acide heptadécanoïque C17:0), méthylé en même temps que les triglycérides de l'huile. On fait l'hypothèse que tous les acides gras ont le même facteur de réponse. La comparaison des résultats obtenus sur les huiles de référence avec les valeurs théoriques permet de valider que l'erreur ainsi faite est négligeable. Les résultats sont exprimés en pourcentage en masse. On admettra que la totalité des constituants présents dans l'échantillon est représentée sur le chromatogramme, donc que la somme des pics représente 100% des constituants (élution totale).

Le pourcentage en masse du composé *i*, exprimé en esters méthyliques, est donné par la formule :

$$\frac{m_s \times A_i}{m \times A_s} \times 100$$

Où A_i est la surface du pic correspondant au constituant *i* ;
 A_s est la surface du pic correspondant à l'étalon interne ;
 m est la masse, en mg, de l'échantillon ;
 m_s est la masse, en mg, de l'étalon interne.

III.2. Dosage de la CML par CPG couplée à la spectrométrie de masse

Choix de la méthode

Le dosage de la CML est réalisé par GC-MS/MS selon la méthode décrite par Charissou et al. (2007) après dérivation des acides aminés et leurs dérivés de glycation sous forme d'esters méthyliques trifluoroacétylés.

L'association d'une méthode séparative (GC) et d'une méthode d'identification (MS) permet d'étudier des mélanges complexes de molécules à l'état de traces (quelques nanogrammes dans le mélange) comme c'est le cas de la CML dans les produits étudiés. Dans notre étude, nous avons utilisé le couplage GC-MS/MS. Ce couplage constitue une approche permettant de réduire le bruit chimique de la matrice et ainsi augmenter le degré de confiance du résultat. De plus le couplage GC-MS/MS a une meilleure sélectivité de détection que les techniques GC-MS à basse et à haute résolution.

Principe de la détection par spectrométrie de masse en tandem

Ce couplage est un outil d'identification très efficace car il allie sélectivité et sensibilité. Le MS/MS, est constitué d'une source d'ionisation, de deux analyseurs de masse, séparés par une cellule de fragmentation (cellule de collision) et d'un détecteur d'ions. On utilise le mode MS/MS pour analyser les ions fils. La molécule analysée est donc ionisée et l'ion parent formé est sélectionné par le premier analyseur de masse. Ensuite, cet ion sélectionné (ion parent) est fragmenté par collision avec les molécules du gaz (dissociation induite par collision) pour donner des ions fils qui sont à leur tour séparés dans le second analyseur de masse. Le spectre ainsi obtenu correspond au spectre de l'ion parent.

On a deux types de configurations des spectromètres MS/MS : celle dont les analyseurs sont couplés dans l'espace (*tandem in space*) (cas des analyseurs quadripolaires, magnétiques ou hybrides) et celle dont les analyseurs sont couplés dans le temps (*tandem in time*) (cas des trappes d'ions ou spectromètres de masse à résonance cyclotronique). Parmi ceux-ci, seul le fonctionnement des trappes à ions sera décrit puisque l'appareil que nous avons utilisé est doté de cette technique. C'est une technique qui permet de produire des ions dans la trappe par impact électronique (IE). La trappe est constituée de trois électrodes dont un annulaire encadré par deux autres de forme hyperbolique percées en leur milieu pour permettre le passage des ions ou électrons. Un flux d'électrons, provenant d'un filament chauffé, va produire des ions par

ionisation des molécules qui sortent de la colonne d'analyse et qui se retrouvent entre les deux électrodes. Ces ions produits sont piégés dans la trappe grâce une radiofréquence. Ensuite, ils seront expulsés de la trappe en fonction de leur rapport m/z (masse/charge).

Protocole

a. Délipidation, hydrolyse, séchage et filtration des échantillons

Les échantillons broyés et homogénéisés ($100 \pm 0,1\text{mg}$) sont délipidés par deux extractions successives aux ultrasons par un mélange d'hexane/méthanol (2:1, v/v). Le culot délipidé est récupéré par centrifugation et hydrolysé avec 5 ml de HCL 6N pendant 18h à 110°C. 500 μl d'hydrolysats sont ajoutés de 100 μl de cycloleucine (Sigma, pureté 97%) à 100 $\mu\text{g/ml}$ comme standard interne, puis séchés au Speed Vac (Savant SC 110 A) pendant une nuit. L'hydrolysats sec est ensuite repris dans 500 μl d'eau MilliQ puis filtré (filtre nylon, 0,22 μm , Cluzeau) et séché de nouveau au Speed Vac. La dérivation s'effectue sur cet extrait sec.

b. Dérivation

Les acides aminés et leurs dérivés de glycation sont des molécules polaires non volatiles. Il convient donc de les transformer en composés volatils pour réaliser leur séparation et leur dosage par GC/MS. La dérivation que nous appliquons comprend deux étapes : une estérification par le méthanol pour protéger les fonctions carboxyles et une acylation des fonctions amines par l'acide trifluoroacétique anhydride. Le protocole de dérivation est détaillé dans l'annexe 4.

Les dérivés volatils obtenus sont des esters méthyliques trifluoroacétylés qui peuvent ensuite être analysés par GC/MS.

c. Analyse par GC-MS/MS

L'appareillage utilisé est un chromatographe Focus GC (Thermo Electron Corporation) équipé d'un injecteur PTV (Programmed Temperature Vaporizer), d'un spectromètre de masse Polaris Q (Thermo Electron Corporation) avec détecteur de type « trappe d'ions » à source externe, et d'un ensemble de logiciel d'acquisition et de traitement de données chromatographiques et spectrométriques (Xcalibur, Thermo Electron Corporation). Les paramètres de la GC/MS sont donnés dans l'annexe 5.

IV. Méthodes spectrales

IV.1. Fonctionnement d'un spectrofluorimètre

Le spectrofluorimètre est l'outil de mesure classique des spectres de fluorescence d'une solution. On distingue trois types de spectre de fluorescence : les spectres d'excitation, d'émission et d'excitation-émission. Les spectres d'un fluorophore lui sont spécifiques. Par conséquent, l'analyse spectroscopique de fluorescence est basée sur le traitement de ces signaux.

La source de lumière excitatrice est formée d'une lampe et d'un monochromateur. La lampe au xénon permet une excitation relativement stable de 250 nm jusqu'à l'infrarouge. En dessous de 250 nm, l'intensité de la lampe s'écroule ce qui a tendance à dégrader le rapport signal sur bruit. Le monochromateur d'excitation permet de sélectionner une longueur d'onde d'excitation avec une certaine précision. Le faisceau exciteur est alors dirigé vers la cuve contenant la solution. Cependant, une partie est déviée vers un système de comptage de photons qui servira à la correction des spectres d'excitation. Le signal d'émission de fluorescence est collecté et amplifié par le photomultiplicateur. Les monochromateurs sont motorisés et balayent les gammes de longueurs d'onde définies par l'utilisateur. Les différents réglages des monochromateurs permettent de mesurer les trois types de spectres de fluorescence.

En utilisant successivement les deux monochromateurs du spectrofluorimètre, il est possible de mesurer les spectres d'émission pour différentes longueurs d'onde d'excitation. On obtient ainsi la matrice d'émission-excitation de fluorescence (MEE). Toutes les mesures de fluorescence décrites dans cette thèse ont été acquises sous forme de matrices d'excitation et d'émission en utilisant la spectroscopie de fluorescence en mode frontal.

IV.2. Appareillage utilisé

Le spectrofluorimètre utilisé dans cette étude est un Cary Eclipse (Varian, Les Ulis, France), équipé d'un dispositif de mesure en mode frontal et permettant de réaliser des spectres en trois dimensions (MEE). Cet appareillage permet de mesurer la fluorescence directement sur des échantillons solides, sans extraction préalable des lipides, et de balayer simultanément une gamme de longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Cet appareil est muni d'une lampe pulsée au xénon.

IV.3. Acquisition des matrices d'excitation-émission de fluorescence

L'acquisition des MEE de fluorescence en mode frontal a été réalisée directement sur les échantillons broyés ou liquides (tahina) placés dans des cuves en acryl jetables. Trois répétitions ont été faites pour chaque échantillon en mesurant les MEE sur différentes faces de la cuve afin de s'affranchir de l'hétérogénéité de l'échantillon. Au total 81 MEE ont été mesurées sur l'ensemble des échantillons.

Les paramètres d'acquisition des MEE sont les suivantes :

L'intervalle de longueurs d'ondes d'excitation est 280 à 600 nm avec un pas de 8 nm ;

L'intervalle de longueurs d'ondes d'émission est 280 nm à 700 nm avec un pas de 2 nm ;

Les fentes d'excitation et d'émission sont fixées à 5 nm ;

Le photomultiplicateur est fixé à 550 V ;

La vitesse de balayage est fixée à 1200nm/min ;

Le temps de moyennage par point est fixé à 0,1 sec ;

L'angle d'incidence du faisceau d'excitation est fixé à 30°.

Les spectres en trois dimensions sont représentés sous forme de courbes de niveaux. Pour un point donné de la représentation en courbes de niveau, les spectres d'émission et d'excitation en deux dimensions peuvent être visualisés. Ces représentations permettent de visualiser les pics de fluorescence et de déterminer les longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximales ainsi que l'intensité de fluorescence des composés correspondant à des longueurs d'onde d'émission et d'excitation déterminées.

IV.4. Prétraitement des données spectrales

IV.4.1 Correction de la diffusion

La section II du chapitre 3 de l'étude bibliographique montre clairement l'impact de ce phénomène qui masque le signal de fluorescence et la nécessité de le corriger. Notons que l'on observe également sur ces spectres les harmoniques du Rayleigh et du Raman correspondant aux longueurs d'onde d'excitation deux fois plus élevées. L'intensité du spectre Rayleigh est généralement beaucoup plus élevée que l'intensité maximale du spectre de fluorescence. En revanche, le décalage entre excitation et émission, imposé par la loi de Stokes, minimise les risques de chevauchement avec le spectre d'émission des fluorophores. Ainsi, le Rayleigh peut

masquer le signal d'intérêt mais ne perturbe principalement que le bord du spectre. Le spectre Raman pose en quelque sorte le problème inverse. Son amplitude, plus modeste, ne masque pas le signal, mais sa position peut entraîner une importante distorsion.

Les méthodes d'analyse spectrale des mélanges de fluorophores sont sensibles à ces distorsions. En effet, la majorité d'entre elles sont basées sur l'approximation linéaire de la loi de Beer-Lambert, qui ne peut rendre compte du phénomène non linéaire de diffusion. Par conséquent, la correction de la diffusion doit se faire au préalable. Les spectres de diffusion, répondent à des phénomènes connus et reproductibles. Ils sont donc facilement localisables. De nombreuses méthodes permettent de filtrer ces pics parasites.

Dans notre cas, la perturbation due au Raman est presque imperceptible dans le signal acquis, elle est donc considérée sans conséquence pour la suite de l'étude (décomposition PARAFAC et régressions) et par la suite négligée. Dans ce cas, la méthode la plus simple pour s'affranchir du Rayleigh consiste à couper sur les spectres de fluorescence la zone où $\lambda_{ex} > \lambda_{em}$ (remplacement par des zéros) et d'insérer des « missing values » (valeurs manquantes) dans la zone de recouvrement du spectre Rayleigh avec le signal de fluorescence (Thygesen et al., 2004). Des zéros sont aussi insérés dans la zone de Rayleigh 2^{ème} ordre. Au total, 4,85% de « missing values » ont été obtenues sur l'ensemble des données.

IV.4.2 Amélioration du signal

Les spectres sont affectés par les propriétés physiques de l'échantillon (taille et distribution des particules) et par des variations du chemin optique (Roggo et al., 2003). Les prétraitements permettant d'améliorer le signal peuvent ainsi être indispensables pour une meilleure analyse des données, en éliminant l'effet du bruit ou d'une déformation dans le spectre. Plusieurs prétraitements ont été réalisés sur les données spectrales de cette étude.

Ces traitements comprennent:

Normalisation – Déviation normale standardisée ("Standard Normal Variates" - SNV)

Dans beaucoup de situations, les spectres présentent des variations incontrôlées d'intensité globale dépendant principalement de la longueur du trajet optique à travers la cuve de mesure où à l'intérieur de l'échantillon. Quand ce trajet est très court, il est difficile d'avoir des conditions d'acquisition parfaitement reproductibles (Bertrand et al., 2000).

Le prétraitement SNV (Standard Normal Variates) réduit très fortement les variations d'intensité générale des spectres (Barnes et al., 1989). Il consiste à diviser la valeur de chaque variable d'un spectre par un nombre représentatif de l'intensité générale de ce spectre.

Les données spectrales sont centrées et réduites selon l'équation suivante :

$$x_{snv,i} = \frac{x_i - \bar{x}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p-1} (x_i - \bar{x})^2}{p-1}}}$$

Avec x_i l'intensité du signal à la longueur d'onde i , p le nombre de longueurs d'onde, \bar{x} est la valeur moyenne du signal et $x_{snv,i}$ la valeur corrigée à la longueur d'onde i .

Le principal avantage de la méthode SNV est qu'elle s'applique à chaque spectre pris séparément, sans référence à l'ensemble des échantillons d'étalonnage.

De nombreuses études ont montré que l'utilisation de la normalisation SNV permettait d'améliorer les résultats des analyses quantitatives (Roggo et al., 2003; Barnes et al., 1989).

Orthogonal Signal Correction (OSC)

Il s'agit d'une méthode de prétraitement du signal, le plus souvent spectroscopique, dans le but d'améliorer, ou d'éliminer, des sources de variation pouvant perturber la qualité du modèle de prédiction.

Le principe a été proposé une première fois par Wold et al. (1998), puis modifié par Sjöblom et al. (1998), Fearn (2000) et enfin par Westerhuis et al. (2001).

Il s'agit de retirer dans les données la partie orthogonale à la variable à prédire (ex: concentration). Une fois cette partie retirée, on obtient des données moins « parasitées » par du bruit ou par de l'information qui ne serait pas liée aux variables à prédire. Les modèles ainsi construits devraient être plus performants.

Le jeu de données est constitué par une matrice de variable X ($m \times p$) et un vecteur à prédire Y ($m \times 1$). Le but est de séparer la matrice X en deux parties orthogonales entre elles. On notera ces deux parties \tilde{X} et X_{orth} , avec X_{orth} est la partie de X orthogonale à Y , et $\tilde{X} = X - X_{orth}$, qui contient

de la variation plus ou moins corrélée avec Y . On peut donc écrire $X = \tilde{X} + X_{orth}$. La matrice X_{orth} étant orthogonale à Y , elle ne contient théoriquement pas d'information possible pour prédire Y .

La variable $\tilde{Y} = X.B$ correspond à une projection de Y dans l'espace X , dans le modèle décrit par la matrice des coefficients de régression B . On peut alors démontrer que les matrices \tilde{Y} sont orthogonales, ainsi que les matrices X .

L'OSC consiste à projeter les variables X dans l'espace des variables Y . On a alors

$X = Y.T + E$ avec $T = (Y'.Y)^{-1}.Y'.X$ et $\tilde{X} = Y.B$. Les matrices \tilde{X} et E sont donc orthogonales de même que E et Y . Si on construit alors un modèle PLS sur la matrice \tilde{X} au lieu de X , celui-ci devrait être plus performant puisque l'information orthogonale à Y a été retirée.

Centrage par colonne

Le prétraitement qui est presque toujours appliqué sur des données spectrales est le centrage par colonne. Dans la matrice, par convention, chaque colonne représente une longueur d'onde, et le centrage par colonne est une opération qui est effectuée pour chaque longueur d'onde. On soustrait pour chaque colonne, la valeur moyenne de cette colonne (Otto M., 1999). Dans la matrice centrée, l'origine de l'espace est centrée sur le barycentre des données d'étalonnage.

Centrage par ligne

Ce prétraitement consiste à retirer les moyennes des lignes de la matrice X de données initiale pour réduire les variations de ligne de base dans les spectres. Chaque spectre est traité séparément. Cette méthode est appliquée quand il est difficile d'avoir des conditions d'acquisition parfaitement reproductibles.

La standardisation des spectres suivant leur norme euclidienne (Bertrand et Scotter, 1992) a été aussi appliquée avant décomposition PARAFAC. Dans notre cas, les différents prétraitements sur les spectres de fluorescence n'ont pas apporté d'amélioration significative à la décomposition multivoie PARAFAC sauf dans le cas de la régression PLS (Partial Least Square) sur spectres déconcaténés.

CHAPITRE 3. Méthodes chimiométriques

La chimiométrie concerne l'utilisation de méthodes mathématiques ou statistiques pour le traitement de données chimiques, avec divers objectifs: la description des données sous une forme synthétique, la modélisation, la classification, les plans d'expériences, l'optimisation, etc. Les méthodes exploratoires correspondent à l'objectif de description des données, et comprennent à la fois des méthodes élémentaires telles que le calcul de la moyenne et de l'écart type des données, ou des méthodes plus sophistiquées, comme l'Analyse en Composantes Principales, par exemple. Les méthodes de régression ont comme objectif de décrire un modèle entre des variables indépendantes (par exemple, variables spectrales) et, par exemple, un vecteur de concentrations, afin de prédire au mieux, à partir des données, les valeurs de cette variable pour de nouveaux échantillons. Lorsqu'un tel modèle est établi, cela permet de remplacer la méthode de référence par la projection des nouvelles données sur ce modèle.

I. Analyse des mélange – Cas de la décomposition PARAFAC

Principe

La connaissance des spectres de fluorescence permet généralement d'identifier un fluorophore. Dans le cas d'un mélange de plusieurs fluorophores, ou éventuellement d'une matrice alimentaire contenant plusieurs fluorophores, nous n'avons accès qu'à la mesure des spectres du mélange. Un traitement postérieur est nécessaire afin de déterminer les spectres de chaque composant de ce mélange et éventuellement leurs concentrations relatives.

Les problèmes inverses sont généralement difficiles à résoudre et des simplifications sont souvent nécessaires. Dans cette optique, le type de mélange le plus simple mathématiquement est formé par une combinaison linéaire des contributions de chaque composant. C'est pourquoi le modèle linéaire des mélanges de fluorophores est largement employé. Le spectre (excitation, émission, 3D) d'un mélange ou MEE sera donc vu comme une combinaison linéaire des spectres de chaque composant du mélange. Notre objectif sera d'estimer les spectres individuels et leur poids respectif. En pratique, on dispose souvent de plusieurs échantillons correspondant aux mêmes composants mais dont la distribution des poids varie. L'absence d'un composant dans un mélange est modélisée par un poids nul. Dans le cas des signaux de fluorescence, le modèle linéaire

général fait intervenir jusqu'à trois variables pour chaque fluorophore : leur spectre d'émission, leur spectre d'absorption et leur concentration. Si l'on dispose du spectre 3D de plusieurs échantillons, on parle de données du second ordre et de décomposition trilinéaire.

L'algorithme PARAFAC (Parallel Factor Analysis), adopté dans cette étude pour la décomposition trilinéaire des MEE de fluorescence, constitue aujourd'hui l'outil d'analyse des mélanges fluorescents le plus abouti. C'est une méthode d'analyse de données consistant à construire un modèle multilinéaire, le plus proche possible d'un jeu de données expérimentales. Initialement développée par Harshman (1970) en psychométrie qui s'est basé sur le principe des Profils Proportionnels et Parallèles (PP) proposé par Cattell en 1944, cette approche est aujourd'hui employée dans de nombreux domaines de recherche. Ce modèle trilinéaire est aussi connu sous le nom de Décomposition Canonique (CANDECOMP) introduite par Carroll et Chang en 1970. Son application à la décomposition des MEE de fluorescence fut popularisée récemment par Bro en 1997. Bien que la terminologie employée soit proche de celle de l'analyse factorielle bilinéaire classique, il existe de nombreuses spécificités à l'approche multilinéaire. Contrairement au modèle matriciel, le modèle PARAFAC a l'avantage d'être unique sous les conditions du théorème de Kruskal (1977), d'où son importance, surtout dans l'interprétation chimique des résultats. Il existe plusieurs algorithmes pour décomposer PARAFAC, le plus répandu étant l'algorithme des moindres carrés alternés (ALS) lequel nous avons adopté dans cette étude.

Modélisation trilinéaire

Nous disposons donc d'un jeu de données, noté \underline{X} (appelé tenseur cubique), contenant les mesures d'une grandeur physique $x_{i,j,k}$ fonction de trois paramètres, i, j, k. Un modèle trilinéaire de \underline{X} (Figure 29) consiste en une combinaison linéaire de trois variables a, b, c dépendant respectivement de i, j, k et d'un paramètre commun f, telle que :

$$\forall i, j, k \quad x_{i,j,k} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf}$$

L'erreur due à la mesure et au modèle encourage cependant à introduire un terme résiduel. En pratique, si l'on note $\hat{x}_{i,j,k}$ la mesure et $e_{i,j,k}$ l'écart résiduel on aura :

$$\forall i, j, k \quad \hat{x}_{i,j,k} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{i,j,k}$$

PARAFAC n'est alors rien d'autre qu'une routine numérique permettant d'estimer les variables a_{if} , b_{jf} et c_{kf} à partir des seules mesures $\hat{x}_{i,j,k}$, en minimisant l'écart résiduel avec le modèle trilinéaire. Dans le cas de l'analyse des MEE, \underline{X} contient les MEE de I échantillons correspondant à des mélanges de F fluorophores en diverses proportions.

– $\hat{x}_{i,j,k}$ correspond alors à l'intensité de fluorescence de l'échantillon i mesurée au couple de longueurs d'onde d'excitation-émission (j, k).

– a_{if} représente le facteur de fluorescence (produit de la concentration et du rendement quantique) du fluorophore f dans l'échantillon i.

– b_{jf} représente la valeur du spectre d'émission du fluorophore f à la longueur d'onde j.

– c_{kf} représente la valeur du spectre d'absorption du fluorophore f à la longueur d'onde k.

PARAFAC nous permet d'estimer l'allure générale des spectres d'excitation et d'émission de chaque fluorophore ainsi que les rapports de concentration d'un même fluorophore pour chaque échantillon.

Les trois espaces contenant ces trois types de vecteurs sont appelés « modes » : mode des concentrations, mode des émissions, mode des excitations. Contrairement à la décomposition d'un jeu d'échantillons par ACP, leur rôle dans la décomposition est interchangeable. Mathématiquement, la distinction entre vecteurs scores et loadings n'a plus de signification. C'est pourquoi on emploie indistinctement le terme de loadings pour désigner les vecteurs des trois modes. Toutefois, pour l'analyse des MEE de fluorescence on considère généralement que les vecteurs des modes spectraux forment la base de décomposition (loadings) tandis que les vecteurs du premier mode regroupent les coordonnées (scores) des échantillons dans la base spectrale.

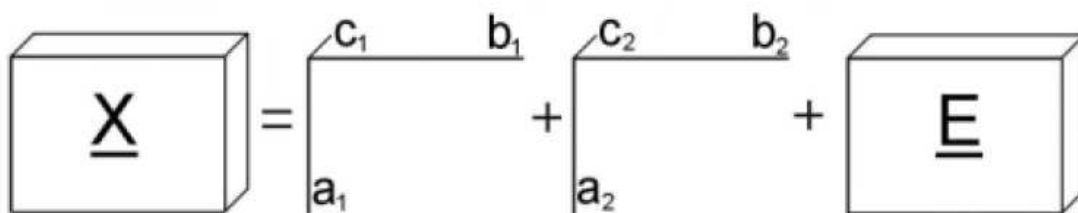


Figure 29. Schéma du principe de la décomposition trilinéaire PARAFAC utilisant 2 facteurs.

Décomposition PARAFAC

Des modèles PARAFAC ont été développés pour les noix (amandes et cacahuètes) et le sésame séparément vu les différences existantes dans la composition et le procédé de transformation entre les 2 types de produits ; la fluorescence étant mesurée sur les échantillons issus des différentes étapes de la transformation industrielle. Le jeu de données est formé à partir de 24 MEE pour les noix et 57 MEE pour le sésame corrigées de la diffusion et comportant chacune 40 longueurs d'ondes d'excitation et 205 longueurs d'onde d'émission. Pour des problèmes de computation, le nombre des longueurs d'onde d'émission a été réduit de moitié. Le jeu de données final sera donc 2 tenseurs cubiques de dimensions 24 x 40 x 103 (noix) et 57 x 40 x 103 (sésame).

Des modèles PARAFAC allant de 1 à 6 composants ont été appliqués sur chaque cube en utilisant le logiciel MATLAB (version 7) et N-way toolbox 5 (Anderson et Bro, 2002). La contrainte de non-négativité a été imposée sur les 3 modes et l'algorithme ALS utilisé pour assurer la convergence du modèle. Le critère de convergence a été fixé à $1e^{-006}$ et les valeurs manquantes estimées par « expectation maximization ».

Les matrices de loadings peuvent être initialisées aléatoirement ou par un prétraitement des données. En théorie, du fait de l'unicité de la solution, le résultat de la décomposition ne devrait pas dépendre des valeurs choisies pour l'initialisation de l'algorithme. Cependant, nous avons adopté une initialisation par valeurs singulières pour accélérer la convergence de l'algorithme. En outre, afin d'éviter les minima locaux, nous avons relancé plusieurs fois le programme à partir de matrices différentes jusqu'à obtenir la meilleure convergence.

Le choix du nombre de composants de la décomposition constitue l'étape la plus importante. Les loadings sont estimés simultanément par PARAFAC et non successivement comme dans le cas d'autres méthodes. Par conséquent, le modèle estimé de rang F peut n'avoir aucun loading commun avec les modèles de rang inférieur à F. C'est pourquoi, le problème du choix du nombre de fluorophores requis est une étape décisive du traitement. Cette étape conditionne toute la chaîne de traitement. Par construction, quel que soit f un modèle de rang f convergera mieux qu'un modèle de rang inférieur à f. C'est pourquoi, en pratique, le seul critère de convergence (convergence mesurée en terme de variance expliquée par le modèle) ne permet pas toujours de dire si un composant supplémentaire améliore la modélisation du signal de fluorescence ou celle du bruit. Pour cela, nous avons comparé les résultats de trois critères: convergence du modèle,

CORCONDIA (Core consistency diagnosis), et split half analysis. La méthode CORCONDIA permet de juger si pour un rang donné un modèle de Tucker, moins restrictif que PARAFAC sur sa formulation, modélise beaucoup mieux le jeu de données. Si c'est le cas, alors soit le rang est trop élevé soit les données ne sont pas trilineaires. La procédure de split half a été menée de la manière suivante : les MEE de chaque cube ont été divisés en deux lots égaux de manière aléatoire. Les deux lots issus de cette première séparation ne sont pas nécessairement représentatifs. Par exemple, si plusieurs échantillons du jeu de données original ont des spectres proches, ceux-ci ne doivent pas tous se trouver dans le même lot car cela biaiserait la comparaison. Afin de limiter ce risque, on comparera également deux autres lots de même nombre de MEE. Le premier lot est formé des premières moitiés de chaque lot précédent et le second, des MEE restantes. On applique alors PARAFAC à chacun des deux premiers lots et on compare les loadings spectraux obtenus pour chaque lot. On répète l'opération sur les deux autres lots. Si tous les loadings spectraux sont identiques pour l'un ou l'autre des deux couples de lots, le rang du modèle est validé.

La comparaison des différents résultats obtenus constitue une aide à la décision souvent efficace mais ce n'est pas toujours le cas. Puisque le modèle trilineaire n'est pas une simple décomposition mathématique mais repose également sur une relation physique, il est légitime d'utiliser des connaissances a priori sur la solution pour guider le choix. En effet, un modèle de rang mal estimé produit parfois des résultats physiquement aberrants faciles à écarter. Pour cette raison, une inspection visuelle des loadings et des résiduels a été aussi réalisée.

La décomposition PARAFAC a été suivie d'une caractérisation des composants afin de pouvoir identifier les différents fluorophores présents et de suivre leur évolution grâce à leur scores tout au long de la chaîne de transformation. Ceci a permis d'étudier l'impact de chaque étape de transformation, surtout le traitement thermique, sur le devenir des différents fluorophores. En outre, les scores obtenus pour chaque modèle, étant proportionnels aux concentrations des fluorophores dans la matrice, ont servi pour établir des modèles de prédiction des composés néoformés mesurés par méthodes d'analyse conventionnelles à partir des spectres de fluorescence.

II. Méthodes prédictives

Les méthodes de régression utilisées pour construire un modèle d'étalonnage à partir des données de spectroscopie de fluorescence sont nombreuses. Il existe deux familles différentes de

méthodes de régressions linéaires : les régressions linéaires simples (univariées), et les régressions linéaires multiples (multivariées).

Dans notre étude, nous avons eu recours à deux méthodes, la régression linéaire multiple classique (MLR) et la régression PLS (Partial Least Squares Régression) ou la « régression au sens des moindres carrés partiels ». Les modèles d'étalonnages ont été réalisés avec des MEE déconcaténées d'un côté et les dosages chimiques des molécules d'intérêt correspondants au moyen de la PLS (Logiciel MATLAB, PLS toolbox). D'autres modèles ont été établis avec les scores de la décomposition PARAFAC d'une part et les données chimiques par régression linéaire multiple (MLR) et régression PLS. Les différents modèles ont été validés par validation croisée « leave-one-out », puis comparés suivant le coefficient de corrélation (R) et l'erreur de prédiction exprimée en terme l'erreur quadratique moyenne de validation croisée RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation).

La régression est une technique qui permet de d'établir des équations de prédiction (ou modèles) permettant de relier la variable y (dite variable à expliquer) et des variables $x_1, x_2, x_3, \dots, x_p$ (dites variables prédictives) et cela toujours dans un domaine d'évolution linéaire. Les méthodes capables de relier par une équation deux types ou plusieurs variables entre elles sont:

- la régression linéaire simple

$$y = \beta_0 + \beta x + e \text{ (ou } \beta_0 \text{ et } \beta \text{ sont les paramètres du modèles et } e \text{ l'erreur commise).}$$

- la régression linéaire multiple

$$y = \beta_0 + \beta_i x_i + \beta_j x_j \dots + \beta_p x_p + e \text{ (} \beta_i, \beta_j, \dots, \beta_p \text{ paramètres inconnu déterminé à partir des observations et } e \text{ l'erreur).}$$

Pour ce dernier type de méthode, l'ajustement des paramètres du modèle décrit par l'équation est en général assez difficile. En effet, la quasi-colinéarité des variables prédictives rend délicate l'inversion de la matrice de variance-covariance, la matrice peut être mal conditionnée (problème de quasi-colinéarité) et engendrer des mauvaises prédictions.

Dans un problème de régression, nous considérons d'abord le cas de deux caractères x (explicatif) et y (à expliquer). "Expliquer" signifie ici exprimer une dépendance fonctionnelle de y comme fonction de x , de manière à prévoir la valeur de y connaissant celle de x . Si pour tout individu $y = f(x)$, et si on observe une valeur x_{n+1} du caractère x sur un nouvel individu, on donnera $f(x_{n+1})$

comme prédiction du caractère y sur ce même individu. La situation idéale où $y = f(x)$ n'est jamais rencontrés en pratique. On cherchera plutôt, dans une famille fixée de fonctions, quelle est celle pour laquelle les y_i sont les plus proches des $f(x_i)$. La proximité se mesure en général comme une *erreur quadratique moyenne* (EQ).

$$EQ(f) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2$$

On parle alors de régression au sens des moindres carrés. Les différences entre les valeurs observées y_i et les valeurs prédites par le modèle $f(x_i)$ s'appellent les résidus. Si le modèle est ajusté de sorte que la série des résidus soit centrée (de moyenne nulle), alors l'erreur quadratique $EQ(f)$ est la variance des résidus. La régression linéaire simple consiste à chercher f parmi les applications affines. La solution s'exprime simplement à l'aide des caractéristiques numériques de x et y .

$$EQ(\hat{a}, \hat{b}) = s_y^2 (1 - r_{xy}^2)$$

Dans le cas des régressions multiples, C'est la généralisation directe de la régression linéaire simple du paragraphe précédent. Les fonctions f sont affiniées :

$$f(x^{(1)}, \dots, x^{(k)}) = a_0 + a_1 x^{(1)} + \dots + a_k x^{(k)}$$

L'erreur quadratique à minimiser est une fonction des $k+1$ paramètres inconnus a_0, a_1, \dots, a_k

$$EQ(a_0, \dots, a_k) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - (a_0 + a_1 x_i^{(1)} + \dots + a_k x_i^{(k)}))^2$$

La méthode PLS consiste en une régression de la variable à prédire, y , sur des variables latentes qui sont des combinaisons linéaires des variables prédictives de départ. Les variables latentes sont déterminées en tenant compte non seulement des variables prédictives mais aussi de la variable à prédire. De ce fait, le modèle obtenu par PLS contient le plus souvent moins de

variables latentes, ce qui implique une interprétabilité relativement plus aisée des résultats et une meilleure stabilité du modèle (Bertrand et al., 2000).

Lorsque plusieurs constituants chimiques doivent être évalués, une régression sur chacun des constituants pris séparément (méthode PLS1) peut être effectuée, ou une régression sur toutes les concentrations en même temps (algorithme PLS2). Seule la méthode PLS1 a été utilisée dans notre étude.

La méthode PLS permet aussi d'interpréter les relations entre les variables prédictives et les concentrations à prédire. L'extraction des facteurs (variables latentes LVs) s'effectue à partir de la matrice de covariance spectre / concentration. Ces variables latentes sont des combinaisons linéaires des variables de départ, déterminées en tenant en compte des variables à prédire Y et des variables prédictives X .

La méthode PLS procède de manière itérative et détermine à chaque étape une variable latente qui est fortement reliée à Y , la force de liaison étant mesurée par l'importance de la covariance. Elle rajoute à ce niveau une subtilité qui permet d'obtenir des variables latentes orthogonales afin de faciliter leur interprétation (Bertrand et al., 2000).

Le point critique est le choix du nombre optimal de variables latentes (LVs). La raison pour laquelle le choix du nombre de variables latentes est primordial est le problème d'un "*underfitting*" (lorsque trop peu de LVs sont choisies, elles ne contiennent pas toute l'information des données de départ nécessaire pour correctement prédire y) ou d'un "*over-fitting*" (lorsque trop de LVs sont sélectionnées, ils existent parmi elles des LVs non-informatives mais contenant du bruit qui risque d'être pris en compte dans le calcul des valeurs à prédire). Par conséquent, on a recours toujours à des méthodes de validation telles que la Validation Croisée pour déterminer le nombre optimal de LVs, associé au minimum du RMSECV.

La validation croisée « leave-one-out » est basée sur une procédure où tous les individus servent alternativement à élaborer le modèle et à le valider - ce qui consiste à élaborer autant de modèles qu'il y a d'individus en écartant à tour de rôle de l'étalonnage chacun des individus qui va servir ainsi à valider le modèle (Bertrand et al., 2000).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

$$RMSEC\% = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{iC})^2}{n}} \times \frac{100}{\bar{y}}$$

$$RMSECV\% = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{iCV})^2}{n}} \times \frac{100}{\bar{y}}$$

Où : y_i = la concentration observée.

\hat{y}_i = la concentration prédite par le modèle de régression

\bar{y} = la concentration moyenne observée.

\hat{y}_{iC} = la concentration prédite par PLS pour un échantillon d'étalonnage.

\hat{y}_{iCV} = la concentration prédite par Validation Croisée pour l'échantillon retiré.

n = le nombre d'échantillons testés.

CHAPITRE 4. Enquête de consommation alimentaire

I. Objectif de l'enquête

Pour pouvoir réaliser des évaluations des expositions aux substances sélectionnées (TFA et CML), il a été indispensable d'utiliser des données de consommation alimentaire. L'objectif de cette étape a consisté donc à établir à partir d'enquête de consommation alimentaire, de préférence individuelle, des données de consommation alimentaire qui ont été par la suite associées aux données analytiques de contamination par les composés néoformés dans le but d'évaluer l'exposition alimentaire des libanais adultes à ces contaminants issus des noix et graines transformées.

II. Champ de l'enquête et unités statistiques

L'enquête alimentaire a porté sur des individus résidant à Beyrouth et sa proche banlieue à l'exclusion des camps palestiniens situés dans ce périmètre (Annexe 6). La couverture de l'étude s'est limitée aux zones urbaines de Beyrouth.

Le choix de la région de Beyrouth était motivé non seulement par des raisons de praticabilité mais également par des raisons techniques : 1) importance de la taille de cette ville (40 % de la population libanaise vit à Beyrouth (CDR, 2002) considérée comme un extraordinaire "melting-pot", milieu de brassage des différentes cultures, confessions et niveaux socio-économiques), 2) 88,4% de la population libanaise est urbaine (Allaya, 1999), 3) forte diversité ethnique et pluralité confessionnelle se manifestant par des habitudes alimentaires assez diverses et 4) présence d'une probabilité supérieure de consommation de produits issus des industries agroalimentaires à Beyrouth que dans les autres régions périphériques où une alimentation traditionnelle est toujours prépondérante.

Caractéristiques de l'échantillon

L'unité statistique retenue a été l'individu. L'enquête a été réalisée auprès de 400 individus adultes ayant un âge compris entre 25 et 64 ans. En l'absence d'une base de sondage pour le pays, la constitution d'un échantillon probabiliste présupposant l'existence d'une liste exhaustive a été exclue. Une représentativité nationale satisfaisante de l'échantillon était assurée par l'application de la méthode de quotas (âge et sexe). Quatre groupes d'âge ont été retenus pour

l'étude : 25-34 ans, 35-44 ans, 45-54 ans, 55-64 ans. L'échantillon a été composé de 209 femmes (52,2%) et 191 hommes (47,8%). La distribution de l'échantillon selon l'âge et le sexe a été choisie de manière à refléter la distribution réelle de la population de Beyrouth selon les données de l'Administration Centrale de la Statistique (1997). Les caractéristiques sociodémographiques de l'échantillon sont données par l'annexe 7. L'enquête a été distribuée sur 40 quartiers de Beyrouth choisis de manière à refléter la situation socio-économique et à inclure des individus provenant de différentes religions et confessions ayant éventuellement des habitudes alimentaires différentes. Des efforts ont été faits pour brasser large à l'intérieur des cellules de quota. Afin d'éviter de biaiser les résultats, l'objectif de cette enquête n'a pas été révélé aux enquêtés.

III. Le questionnaire

La collecte de l'information a été réalisée face-à-face par l'intermédiaire d'un questionnaire quantitatif de fréquence (Annexe 8). Chacun des sujets sélectionnés était porté à répondre à ce questionnaire adapté aux objectifs de l'étude et spécifique des produits alimentaires étudiés.

Un questionnaire de fréquence a été spécialement développé pour cette enquête pour inclure une liste de 13 aliments représentant les noix et graines les plus consommées au Liban ou les plats qui les contiennent. Le questionnaire ainsi conçu avait pour objectif de rassembler une information sur la quantité consommée et sur la fréquence de consommation des différents aliments de la liste durant une période de temps spécifique (dans ce cas durant l'année précédente).

La quantité d'aliment consommé était rapportée sous forme de portion de référence. Lors du recueil des données de consommation, les tailles des portions consommées ont été estimées en fonction des mesures ménagères (verre, assiette, cuillère...) et d'un cahier de photos des portions alimentaires, montrés à l'enquêté pendant le déroulement de l'enquête. Pour pouvoir quantifier la consommation de chaque individu en gramme, nous avons converti les portions exprimées en mesures ménagères en quantités exprimées en grammes. Pour cela, le poids réel de la portion moyenne, exprimé en gramme, a été mesuré et enregistré (Annexe 9).

Afin d'obtenir des données détaillées de la consommation alimentaire, le poids de chaque aliment composé consommé était transformé en poids de son composant recherché (tahina) en utilisant les descriptions du «Food composition table for use in the middle East» (Pellet et Shadarevian, 1983).

Le format de réponse pour la fréquence de consommation allait de «jamais ou moins que deux fois par mois» à «au moins une fois par jour». L'enquêté a été encouragé pour inclure le plus de

détail possible sur les aliments consommés tels que leur mode de préparation, leur marque commerciale...

Finalement une version préliminaire de ce questionnaire a été testée sur une trentaine de personnes pour vérifier sa clarté et la facilité de son administration.

IV. L'élaboration d'une typologie des consommateurs

L'analyse typologique repose sur des techniques de classification ou de regroupement d'individus ou d'objets en classes homogènes. Elle tente de constituer, à partir de variables construites *a priori*, des groupes d'individus caractérisés par des attributs de façon à ce que les personnes appartenant à un même groupe se ressemblent le plus possible et que les groupes soient les plus différents possibles les uns des autres. L'utilisation de variables synthétiques, comme les composantes principales issues d'une analyse en composante principale (ACP) est particulièrement intéressante.

Les méthodes «a posteriori» (analyses factorielles et cluster), permettent de détecter des «patterns alimentaires » en générant de nouveaux facteurs composés de variables corrélées et ainsi de diminuer, par agrégation, le nombre de variables. Les analyses en composantes principales sont les plus habituellement utilisées. Ces méthodes permettent de s'affranchir d'un grand nombre de limitations liées aux modèles classiques. Des méthodes dites «réductionnistes» seront utilisées, consistant à agréger des variables corrélées afin de générer de nouvelles variables, combinaisons linéaires des variables de départ et permettant de réduire l'information. Elles regroupent des méthodes d'analyses factorielles et de classification (analyse en composantes principales, classification). Différents critères (Scree plot, % de variance) ainsi que l'interprétation des axes principaux générés, permettront d'identifier le nombre optimal d'axes à conserver. Les coordonnées (ou scores) des sujets sur les axes principaux identifiés par ACP seront utilisées pour regrouper au moyen de méthodes de classification (clustering) hiérarchiques les sujets présentant un comportement alimentaire similaire. Une caractérisation sociodémographique des différents clusters d'individus sera ensuite réalisée.

IV.1. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Cette méthode permet de réduire le nombre des variables, mais cette réduction n'est possible que si celles-ci ne sont pas indépendantes entre-elles. Il s'agit d'une méthode factorielle car la réduction du nombre de variables ne se fait pas par une simple sélection entre elles, mais par la construction de nouvelles variables synthétiques obtenues en combinant les variables (ou indicateurs) initiales. Ces nouvelles variables sont appelées "composantes principales". Elles déterminent un certain nombre d'axes factoriels, qui réalisent chacun une synthèse des variables initiales. Chaque axe n'est porteur que d'une partie de l'information qui est mesurée par le pourcentage d'inertie totale du nuage de points étudié (ce nuage est l'espace à plusieurs dimensions représenté par l'ensemble des données et dont l'analyse a pour objectif de fournir une représentation synthétique). Chaque axe étant une combinaison particulière des variables d'origine, on s'intéresse en général à ceux dont le "pouvoir explicatif" est le plus important. La difficulté de l'ACP est alors de donner une signification concrète aux nouvelles variables. On s'intéresse aux indicateurs présentant les plus fortes corrélations avec un axe car ce sont eux qui participent le plus à la caractérisation de cet axe. La représentation graphique des indicateurs sur les axes permet alors de repérer rapidement les indicateurs liés entre eux ou opposés et ainsi d'interpréter les axes factoriels.

Nous avons mené une ACP pour étudier les liens et réduire le nombre de variables (ici les plats consommés). Nous avons déterminé le nombre de facteurs à sélectionner à partir de plusieurs critères. D'après la règle de Kaiser, nous avons retenu les facteurs dont la valeur propre était supérieure à 1 ; nous avons ensuite cherché un compromis entre le pourcentage total de variance expliquée et le nombre de facteurs retenus. Il est recommandé que les facteurs extraits comptent pour un seuil minimal de 60% de la variance totale dans un système d'axe le plus petit possible (3 ou 4). Finalement, et après interprétation des axes, 4 facteurs ont été retenus.

Pour interpréter les facteurs composites, il est nécessaire de déterminer l'importance des variables initiales dans leur formation. Pour cela, il faut d'une part examiner les communalités, qui mesurent la part de la variable expliquée par les facteurs retenus. D'autre part, il faut étudier les coefficients de corrélation entre les variables et les facteurs retenus. La matrice factorielle ou matrice des composantes représente le tableau des coefficients de corrélation (loadings) entre les variables centrées réduites et les facteurs ; il est possible, en regardant les coefficients de corrélation les plus élevés (en valeur absolue) pour un facteur donné, de trouver les variables

initiales qui contribuent le plus à la formation de ce facteur. La règle la plus usuelle est de retenir les valeurs supérieures à 0,5 (Evrard et al., 1993).

Bien que la matrice initiale n'ayant pas subi de rotation donne une indication sur la relation entre facteurs et variables, la rotation permet de transformer la matrice factorielle en une matrice plus simple et plus facile à interpréter. L'emploi de la méthode Varimax est la plus courante ; elle permet de maximiser les coefficients de corrélation des variables les plus corrélées. L'analyse des coefficients de corrélation entre les variables initiales et les facteurs permet donc d'interpréter les axes factoriels. Dans notre étude, nous avons opté pour l'application d'une rotation orthogonale par la méthode Varimax (hypothèse d'orthogonalité des facteurs requise pour la réalisation ultérieure d'une classification ascendante hiérarchique par mesure de la distance euclidienne).

L'ACP a été réalisée en utilisant le logiciel XLSTAT version 2009.4.02.

IV.2. Constitution et description des classes par Classification Ascendante Hiérarchique

Les méthodes de classification ont pour but de regrouper les individus en un nombre restreint de classes homogènes. Il s'agit donc de décrire les données en procédant à une réduction du nombre des individus.

Le principe de la méthode de classification hiérarchique est de regrouper les individus selon un critère de distance minimum entre eux. La suite des partitions obtenues peut alors être représentée sous forme d'un arbre de classification appelé aussi dendrogramme. Connaissant cet arbre, il est facile d'en déduire les partitions en un nombre plus ou moins grand de classes. Il suffit pour cela de "couper" l'arbre à un certain niveau et de regarder les branches qui en découlent. On peut caractériser les classes obtenues et expliquer leur composition à l'aide des différents indicateurs retenus pour chaque thème. En effet, pour chaque classe, les moyennes, écarts-type, minimum et maximum des indicateurs sont fournis. De plus, un test de comparaison de moyennes (le t de Student ou ANOVA) permet de distinguer les indicateurs les plus caractéristiques des classes.

Il y a deux étapes à l'élaboration d'une typologie valide et opérationnelle : la phase d'identification et de description des groupes à l'aide de variables actives puis la phase de caractérisation et d'explication des groupes à l'aide de variables passives. Une classification ascendante hiérarchique a été effectuée sur les scores factoriels (variables actives). Nous avons utilisé pour cela la distance euclidienne pour la mesure des proximités (qui requiert que les variables soient orthogonales, ce qui est le cas lorsqu'on a recours à une ACP avec rotation

Varimax) et l'algorithme de Ward, qui est un algorithme d'agrégation selon la variance. Ce critère recherche, lors de l'agrégation de deux classes, une partition telle que la variance inter-classes soit minimale et que la variance entre les classes soit maximale.

La seconde étape de l'analyse typologique consiste à caractériser chacune des classes identifiées au moyen de variables passives n'ayant pas servi à la constitution des classes (Vedrine, 1991). Nous avons réalisé des tests de Khi^2 pour tester la relation entre les classes et certaines variables étudiées (sexe, âge, statut matrimonial, activité professionnelle, etc.).

La CAH a été réalisée en utilisant le logiciel XLSTAT version 2009.4.02.

PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION

**CHAPITRE 1. Suivi de l'oxydation lipidique et la formation des
NFC au cours de la transformation industrielle des noix et graines
– Détermination des étapes critiques**

Article I

Formation of Lipid Oxidation and Isomerization Products during Processing of Nuts and Sesame Seeds

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008, 56, 7082–7090

Rita YAACOUB^{a,c}, Rachad SALIBA^b, Bilal NSOULI^a, Gaby KHALAF^a, and Inès BIRLOUEZ-ARAGON^{c,*}

^a National Council for Scientific Research, Lebanon

^b Department of Agro- Food science and Technology, Faculty of Agriculture Sciences, Lebanese University, Lebanon

^c **Polytechnical Institute LaSalle Beauvais, France**

*** Corresponding author: ines.birlouez@lasalle-beauvais.fr**

Polytechnical Institute LaSalle Beauvais, rue Pierre Waguët, BP 30313, 60026 Beauvais Cedex France. Phone: (33) 3.44.06.38.76; Fax: (33) 3.44.06.25.26

Abstract

The aim of the present study was to quantify some nutritional and safety quality parameter changes that take place in nuts (roasting) and sesame seeds (dehulling, roasting, milling, and sterilization) during processing. Such evaluation was based on chemical analysis of various indicators of lipid alteration in raw and processed pistachios, almonds, peanuts, and tahina. Lipid oxidation was assessed by the evolution of lipid oxidation products including hydroperoxides, *p*-anisidine, and thiobarbituric acid reactive substances, as well as carboxymethyllysine (CML) and *trans* fatty acids (tFAs). All these parameters were significantly affected by the different processing stages, especially by roasting and sterilization (tahina). Nut roasting and sesame heat treatment increased the primary (hydroperoxides) and secondary (aldehydic compounds) lipid oxidation products, with the *p*-anisidine value reaching 6-11.5 and thiobarbituric acid reactive substances 3-5 mg/kg (equiv of malondialdehyde) in the different end products. In addition, roasting led to the formation of CML (between 12.7 and 17.7 ng/mg) and tFAs (between 0.6 and 0.9 g/100 g) in nuts and tahina, which were absent in the raw material. Roasting parameters appear as the critical factor to control to limit the CML and tFA formation in the final product.

Keywords: Lipid oxidation; Carboxymethyllysine ; *trans* fatty acids; Nuts; Sesame seeds.

INTRODUCTION

Roasted nuts and seeds are very appreciated worldwide as snack foods and appetizers. In Mediterranean countries, and particularly in Lebanon, they are an intrinsic part of the diets, and their consumption is evaluated at approximately 50 (g/person)/day as indicated by a diet survey conducted on Lebanese adults living in the capital, Beirut (not published).

From a general point of view, thermal treatment improves the food microbiological safety, digestibility, sensory qualities, and shelf life of food products. Roasting is the main step of nut and sesame processing, a process specifically designed to enhance the flavor, color, and texture of nuts and sesame. Compared to raw nuts, the roasted product has a delicate, uniquely nutty, and widely appreciated taste. Roasting also allows inactivation of enzymes and destroying of undesirable microorganisms (1). Moreover, roasting promotes the production of potentially beneficial compounds, with antioxidant properties related to the formation of phenole-type structures and/or the chelating properties of melanoidins (2). However, the roasting process of nuts and sesame seeds also induces the development of undesirable reactions that may cause loss of nutritional value, as well as formation of potentially toxic compounds. The major oxidative reaction in heat-treated PUFA-rich foods such as nuts and seeds is lipid peroxidation (LPO) (3). Lipid oxidation in foods almost exclusively concerns unsaturated fatty acids and is essentially autocatalytic, explaining increasing reaction rates with time (3). Nuts and sesame seeds contain high amounts of unsaturated fatty acids, making them very sensitive to rancidity (3). Severe heat treatment of lipid-rich foods may also induce the isomerization of double bonds, leading to the formation of *trans* fatty acids (tFAs) (4). The secondary lipid oxidation products, namely, the aldehydic compounds formed during peroxidation, are prone to formation of lipoxidation end products during the Maillard reaction by nucleophilic attack of the carbonyl compound on the free amino groups of amino acids or proteins (5). Carboxymethyllysine (CML), a well-known advanced Maillard product, is a useful stable indicator of the reaction (6).

All these compounds were described as possibly exerting adverse effects in humans. Advanced peroxidation products have been described as cytotoxic and proatherogenic (7). *trans* fatty acids are considered to alter the HDL/LDL ratio, increasing the cardiovascular risk, and to affect intrauterine human growth (4). CML has been found to promote oxidative stress and microinflammation as a result of its interaction with the receptors for advanced glycation end products (8). Consequently, the roasting process, which can promote the formation of such

undesirable compounds, needs to be precisely controlled to allow limitation of their concentration while the other objectives regarding organoleptic and microbiological quality are reached.

Controlling the quality of heat-processed foods involves the selection of pertinent indicators. Many indicators are currently used to assess the extent of lipid oxidation in foods, such as hydroperoxides, thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), and *p*-anisidine value as primary and secondary oxidation products (9). Each assay gives information about different stages of oxidation and cannot be used alone. For example, the hydroperoxide level indicates the initial products of LPO, and it is only applicable to monitor peroxide formation in the early oxidation stage. During the course of oxidation, the hydroperoxide level reaches a maximum and then declines as a result of its breakdown into secondary oxidation products. Measuring these secondary LPO products can be achieved by the global *p*-anisidine value (pAV) based on a chemical reaction between α - and β -unsaturated aldehydes and *p*-anisidine under acidic conditions and subsequent measurement of the optical density of the resulting yellow adduct at 350 nm or by the TBA test, which is more selective for malondialdehyde (MDA), a short and volatile reactive aldehyde produced during advanced peroxidation of highly polyunsaturated FAs. Although both tests are valid determinants of secondary oxidation products, the pAV measures a more extensive assortment of nonvolatile compounds and compounds from more advanced secondary hydroperoxide oxidation (10). Even if aldehydes are no longer detectable with the TBA test, the anisidine value may still indicate that the fat has been oxidized because the residues detected are not volatile (10). Regarding the Maillard reaction, CML has been proposed as a useful and stable indicator of severely heat treated foods (6).

In this study we measured the levels of primary (hydroperoxides) and secondary (MDA and nonvolatile aldehydes) lipid oxidation products, CML, the product of interaction between carbonyl compounds and lysine in proteins, and fatty acid *trans* isomerization products in industrially processed nuts and sesame seeds. Moreover, the evolution of each indicator in sesame seeds was modeled as a function of the roasting time. The purpose of this study was to evidence the process critical steps regarding the quality deterioration according to such indicators and to assess the extent of the modification observed in real industrial samples.

MATERIALS AND METHODS

Samples and processing conditions

Three types of roasted nuts (pistachios, almonds, and peanuts) commonly consumed in Lebanon and sesame seed products (tahina) were sampled at different steps of processing in the industrial plant of most representative local manufacturers. The products were processed following the flow diagram presented in Figure 1. At the level of the sesame seed roasting step (F), samples were collected every 15 min at three different places of the roaster (to take into account the possible heterogeneity of the roaster) for kinetic analysis. The product temperature and the moisture content during roasting were also recorded. Pistachios (*Pistachia Vera* L.; from Iran), peanuts (*Arachis hypogaea* L.; from China), and almonds (*Amygdalus communis* L.; from the United States) were roasted at 190 °C for 10 min, 180 °C for 10 min, and 180 °C for 8 min, respectively.

Manufacture of Tahina

The sesame seeds, a white variety (*Sesamum indicum* L.) originating from Sudan, were sieved and then soaked in water for 2 h. The soaked seeds were stained off and passed through a peeler. The hulls and other foreign materials were separated by soaking in brine (180-200 g/L). The seeds were stained off and washed with water to remove the salt. The seeds were then left to dry at ambient temperature and passed through a roaster (115 °C for 2 h) (steamheated jacketed open drum with continuous stirring). The roasted sesame seeds were then sieved and ground by stone mills to a viscous paste which was sterilized (100 °C for 30 min), then filled into plastic containers, and marketed as tahina.

Moisture content determination

Moisture content was determined according to the ISO 665-2000 method (11), by drying of 10 g of ground sample in an oven at 103 °C until a constant weight was reached.

Lipid extraction

Oil was cold extracted from the samples according to the method described in Standard NF V03-030 (12) using hexane/isopropanol (3:2, v/v). After extraction, the hexane layer was removed, dried under nitrogen and the pure oil was weighed to calculate the percentage yield.

Assessment of lipid oxidation

Hydroperoxides

Hydroperoxides were analyzed by an indirect colorimetric method based on the oxidation of iron(II) to iron(III) by hydroperoxides and subsequent formation of a brown chromophore in the presence of xylenol orange, according to the method of Jiang et al. (13). 100 mg \pm 5 mg of oil extract were diluted in 10 mL propanol-1, then 2400 μ L of this solution was mixed with 600 μ L of a methanolic reaction mixture of xylenol orange and iron(II) sulfate in H₂SO₄ (94%) and BHT (1%), before reaction for 30 min at room temperature. The solution was filtered through a nylon filter (Cluzeau) before reading the absorbance at 560 nm using a Unicam UV-vis spectrophotometer. Quantification used a calibration curve with H₂O₂. Results are expressed as mmol hydroperoxides per 100 mg fat.

p-anisidine value (pAV)

pAV was measured according to the method described by Labrinea et al. (14). A quantity of 1 g of oil extract was dissolved with 15 mL of propanol. 300 μ L of this solution was mixed with 1.9 mL p-anisidine solution in propanol (0.039 mol/L) and 0.7 mL glacial acetic acid. Absorbance was measured at 350 nm using a Unicam UV-vis spectrophotometer. The pAV is defined by convention as 100 times the absorbance measured in a 1 cm cuvette of a solution resulting from the reaction of 1 g fat with 100 mL mixture of solvent and reagent.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)

TBARs values were determined using the TBA method described by Genot (15). For extraction, 2 g of the sample was homogenized together with 16 mL of a 5 % (w/v) aqueous solution of trichloroacetic acid (TCA) containing 100 μ L of freshly prepared BHT in ethanol (1 mg/mL) by using a homogenizer set at 20,000 rpm for 15 sec. After filtration, 2 mL extract was mixed with 2 mL of TBA solution (20 mol/L) in stoppered test tubes, and immersed in a 70 °C water bath for 30 min then rapidly cooled in ice. After cooling, absorbance of the reaction solutions was read at 532 nm using a Unicam UV-vis spectrophotometer against a blank containing 2 mL of TCA and 2 mL of TBA reagent. Results are expressed as mg MDA equivalents per kg (or ppm) of food sample using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for malondialdehyde.

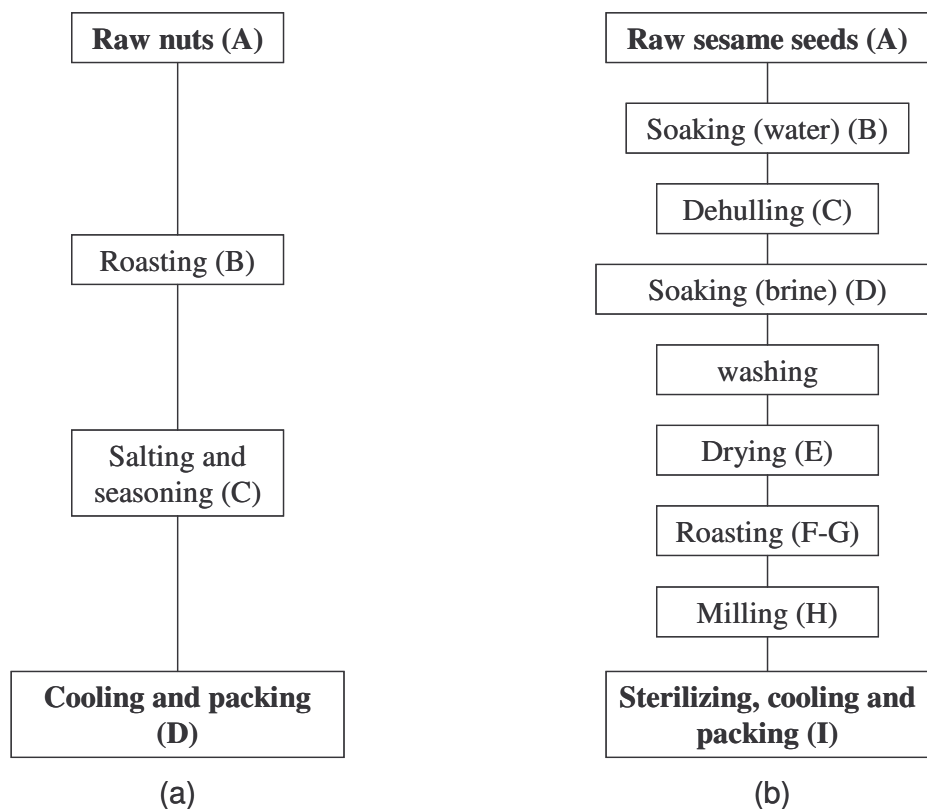


Figure 1: Flow diagram of the nuts and tahina manufacturing process showing the different stages studied. (a) nuts (A, raw material; B, roasting; C, seasoning; D, commercial end-product), and (b) tahina (A, raw material; B, soaking in water; C, dehulling; D, soaking in brine; E, drying; F and G, roasting (F: after 15 min of roasting, G: after 2 hours of roasting); H, milling; I, sterilized end product).

Analysis of *trans* fatty acids

Fatty acids and their *trans* isomers were determined in the oil extracts as their methyl esters by gas chromatography. For the preparation of fatty acid methyl esters (FAMES), 50-100 mg extracted oil were accurately weighed and treated with 0.2 mL methanolic NaOH (2 mol/L) in stoppered tubes under vigorous agitation after addition of 1 mL heptane containing the internal standard, heptadecanoic acid (1.91 mg/mL). The tubes were then heated at 50 °C in a water bath for 20 s and shaken for 10 s. A 400 µL methanolic HCL (1 mol/L) were added, shaken vigorously and left to stand until separation of the layers. The FAME-containing supernatant was diluted 15 times and transferred to glass vials for further analysis. Quantitative analysis of FAMES was performed with a gas chromatograph (Perkin Elmer, Autosystem XL) equipped with a flame

ionization detector (FID). A BPX 90 capillary column (30 m length \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m film thickness) from SGE was used. The temperature program was as follows: initial temperature 145 °C (1 min holding), raised to 170 at 10 °C/min, held for 10 min, raised further to 230 at 15°C/min, and then held for 4 min. The injector and detector temperatures were 270 and 280 °C, respectively. The carrier gas was hydrogen at a flow rate of 0.7 mL/ min. All samples were injected in duplicates. Chromatograms were recorded using a ChromQuest Software. Methyl esters were identified by comparing their retention times to those of a FAME mix purchased from Sigma. Additionally, *trans*-octadecenoic acid (elaidic acid), *cis,trans*-9,11- and *trans,trans*-9,11-octadecadienoic acid were purchased from Alltech. Fatty acid methyl esters in the samples were quantified by comparing the area under their peaks in the chromatogram to that of methyl heptadecanoate (derived from the internal standard).

CML quantification

CML was quantified by GC-MS-MS according to the method of Charissou et al. (16), after methylation of the carbonyl groups and acylation of the amine residues. The solid food samples were crushed, homogenized, and then defatted with two successive extractions by a hexane/methanol (2/1, v/v) solution. The samples were hydrolyzed in 6 N HCl at 110 °C for 18 h. The hydrolyzed samples were derivatized after addition of the internal standard cycloleucine (CL) (10 μ g/100 mg of sample) by thionyl chloride in methanol. The CML was quantified by selected ion monitoring using a FOCUS GC (Thermo Electron Corp.) gas chromatograph coupled to a PolarisQ ion trap mass detector. The injection was made in the split mode at 250 °C. A 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m DB5-MS capillary column was used. The temperature program was as follows: initial temperature 70 °C (2 min hold), raised at a rate of 5 °C/min to 260 °C and further at a rate of 15 °C/min to 290 °C, and then held for 5 min. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.5 mL/min. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode at 70 eV. m/z = 392 as a parent ion was isolated using an energy of 0.90 V. The ions generated were m/z) 374 (25%), 360 (100%), 332 (40%), and 206 (10%). Data were collected and integrated with Xcalibur software (Thermo Electron Corp.). The limits of quantification are 0.3-0.9 ng/mg of dry matter.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean values and standard errors (SEs). Analysis of variance (ANOVA) was included in the data treatment to study the variation of the results and the Tukey's means separation test to evaluate significant differences among means ($P < 0.05$). All analyses were performed in duplicate or triplicate. Statistical analyses of the data were carried out using Statistica 7 StatSoft software. Kinetic modeling was done on MATLAB 7, The MathWorks, Inc. Software.

RESULTS AND DISCUSSION

Evolution of moisture content during processing

Figure 2 shows the decrease of nuts and tahina moisture content during processing. In nuts (figure 2a), roasting led to a significant loss in moisture content (63%, 52%, and 51 % loss in pistachios, almonds, and peanuts respectively). In tahina (figure 2b), heating induced in the end-product 85 % water loss from the raw sesame seeds. During roasting of sesame seeds, water loss was around 96 % between the beginning and the end of roasting. The evolution curve in Figure 3a shows that the roasting process induces an almost complete drying off of the water still present in sesame seeds before roasting. The dehydration started within the first 5 min of the roasting process, increased linearly until 75 min and then proceeded with decreasing drying rate, which is typical for the final drying period. Exponential fitting provided a satisfactory description ($R^2 = 0.97$) of the moisture content evolution (figure 3a). Similar results were reported by Kahyaoglu and Kaya (17) during roasting of sesame seeds.

Product temperature evaluation during roasting of sesame seeds

The product temperature fluctuates only at the very beginning of the roasting process with a relative standard deviation (RSD) of 6%. At later stages, the roasting process was much more reproducible (RSD of 1 - 2.5%) at different places of the batch.

Figure 3b shows the mean temperature profile of sesame seeds during the 120 min of roasting at 115 °C. The fast temperature increase during the first 5 min was followed by a progressive stabilization. During the whole roasting time, sesame seeds temperatures did not fully reach the inlet temperature. A plateau of 100 °C was reached after 105 min, which was held till the end of the roasting process.

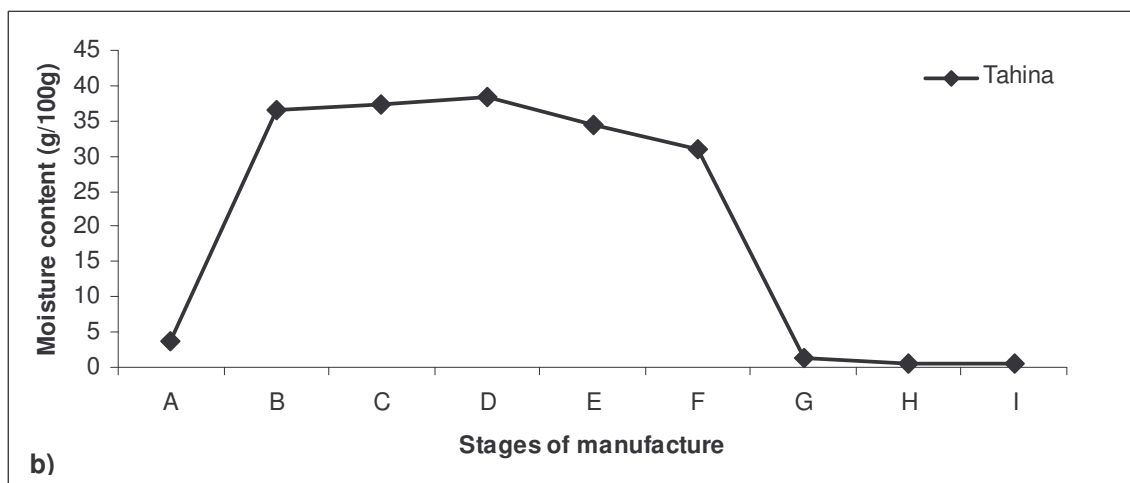
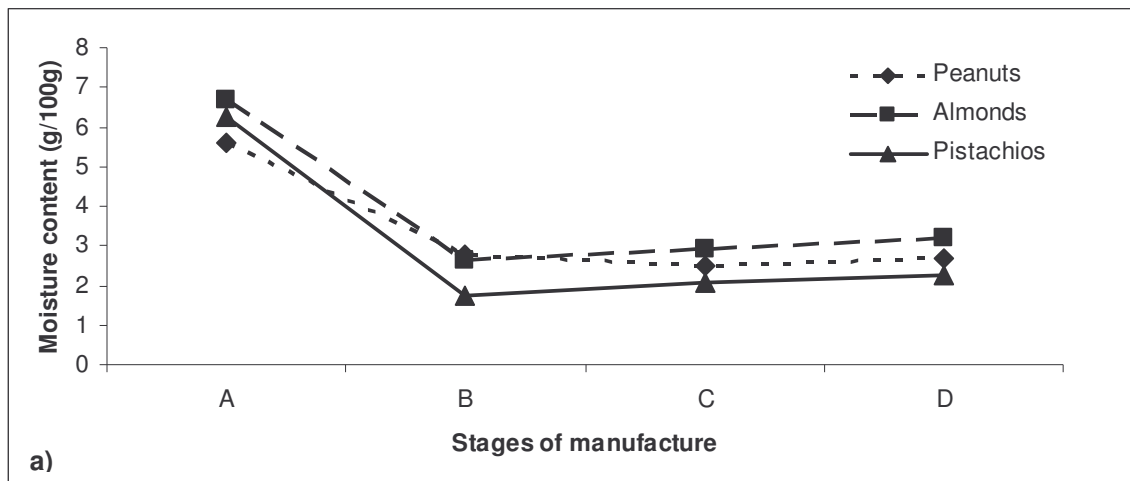


Figure 2: Change in the moisture content of nuts and tahina during processing stages of (a) nuts (A, raw material; B, roasting; C, seasoning; D, commercial end-product) and (b) tahina (A, raw material; B, soaking in water; C, dehulling; D, soaking in brine; E, drying; F and G, roasting (F: after 15 min of roasting, G: after 2 hours of roasting); H, milling; I, sterilized end product). Data are average of three measurements.

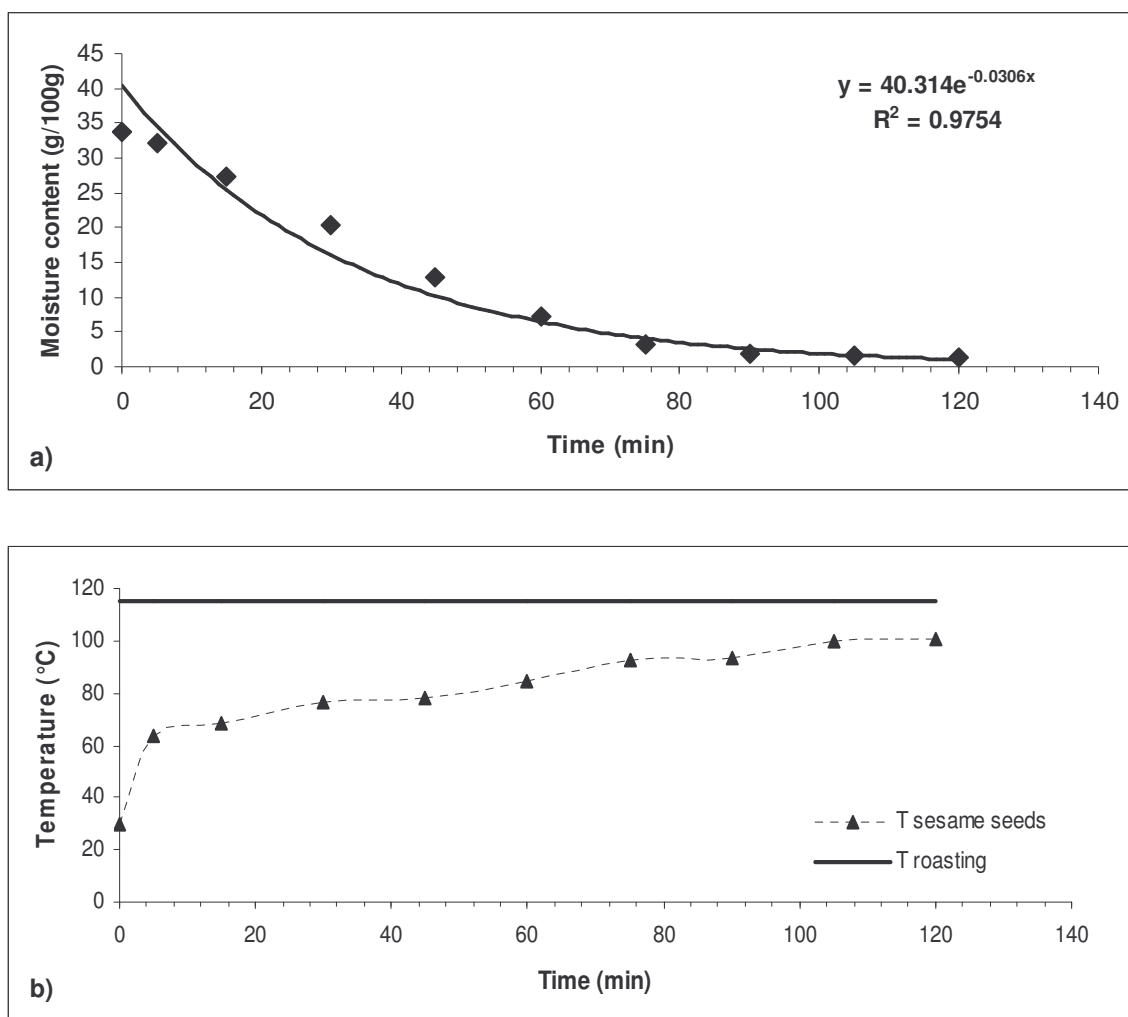


Figure 3: (a) modeling of moisture content decrease (continuous line: exponential fitting curve of moisture content evolution) and (b) temperature increase, during roasting of sesame seeds. Data are average of three measurements.

Effect of processing on lipid oxidation changes

Oxidative quality of raw material

Both raw nuts and sesame seeds used in this study had low initial hydroperoxide values (between 0.02 and 0.25 mmol/100 mg fat). However, they showed relatively high initial *p*-anisidine (between 4.3 and 5.4) and TBAR (between 0.65 and 1.8 mg MDA/kg) values comparing to other studies (0.28 and 0.41 mg TBARs/kg in raw and roasted almonds respectively (18); pAV between 2 and 4 in fried salted peanuts (19)), meaning that oxidation was taking place during the storage period before processing. This provides evidence that the hydroperoxide value does not

always reflect the past history of the food. It is only used as an indicator of the initial stages of oxidation since hydroperoxides decompose rapidly during storage. Therefore, hydroperoxide value may not necessarily be indicative of the actual extent of lipid oxidation; instead, TBARs and pAV, which are cumulative measures over a period of time, are often used.

Peanuts had significantly higher initial TBARs values as compared with almonds and pistachios, despite similar pAV, which may be due to its higher linolenate content. Linolenic acid contains two inner allylic methylene groups, thus double bonds in C18:3 are twice as likely to shift and form a conjugated diene than C18:2, yielding more malondialdehyde (20). The TBA test is more sensitive than the p-anisidine value to evidence LPO when applied to food samples rich in linolenic acid (9).

Evolution of Hydroperoxides during processing

At temperatures above 100 °C, hydroperoxides, the primary oxidation products, appear only transitorily and decompose rapidly into a multitude of volatile and non-volatile products (21). Alcohols, saturated aldehydes, α,β -unsaturated aldehydes and epoxy compounds have been reported as major secondary oxidation products (21). In the conditions of this study, hydroperoxides are only formed transitorily. This was reflected in the amount of hydroperoxides measured, which did not reach elevated values in the end-products. Figure 4 shows the changes in hydroperoxides during the manufacture processing of nuts (a1) and tahina (b1). In nuts, roasting provoked an increase in the amount of hydroperoxides, indicating that this stage induces the initiation of lipid oxidation. The level of hydroperoxides decreased in the following stages (C and D) as a result of hydroperoxide decomposition. The couple time/temperature of roasting was a critical factor in the formation of lipid hydroperoxides, as pistachios (190 °C/10 min) presented the highest level of hydroperoxides immediately after roasting, followed by peanuts (180 °C/10 min) then almonds (180 °C/8 min). In tahina, the level of hydroperoxides increased after dehulling as a result of a possible slight heating due to friction, causing the initiation of the oxidation process followed by continuous increase during the next steps. A maximum was reached at the beginning of roasting, as the severe heat treatment of this process step was associated to rapid decomposition of hydroperoxides (Fig 4b₁). It is noteworthy that this pattern could not be ascertained during roasting of nuts because sampling throughout the roasting step was not possible.

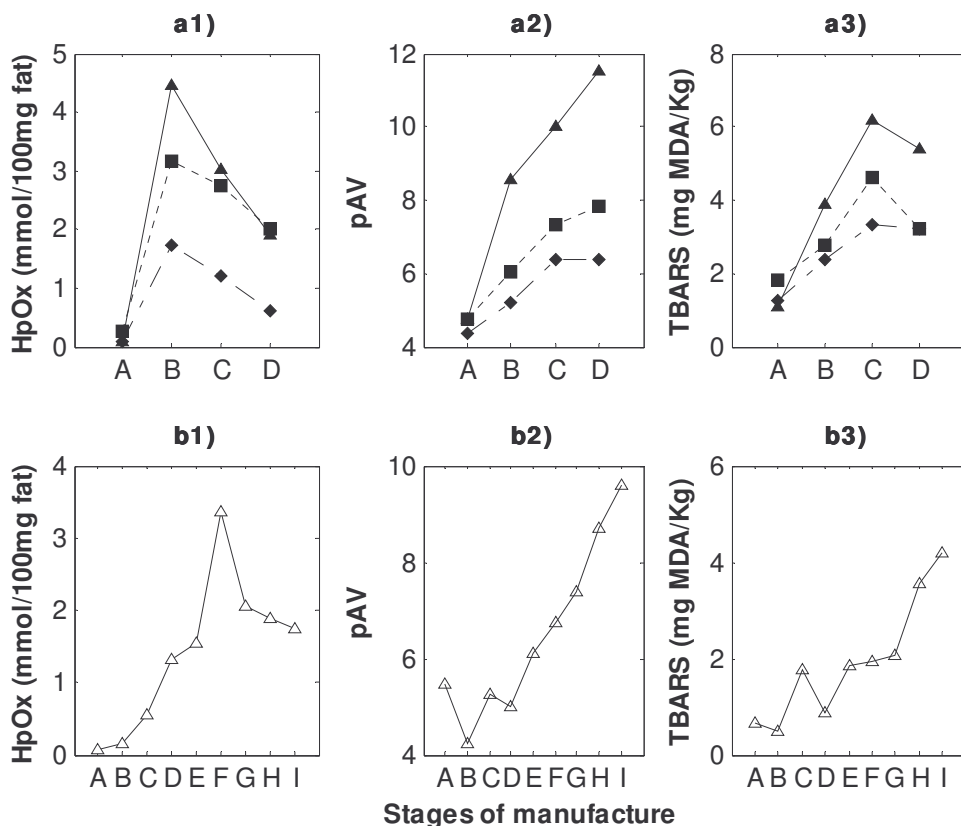


Figure 4: Lipid oxidative deterioration during the stages of processing of (a) nuts (pistachios: solid line, almonds: dash-dotted line and peanuts: dotted line), and (b) tahina: hydroperoxides (a₁ and b₁), pAV (a₂ and b₂) and TBARS (a₃ and b₃). Data are average of two measurements.

Evolution of the pAV during processing

The pAV measures high-molecular weight saturated and unsaturated carbonyl compounds in triacylglycerols. The pAV increased for all nuts during roasting (figure 4a₂). For almonds which contain less PUFA than other nuts (22% versus 28 and 31% in pistachios and peanuts respectively, data not shown), this increase was much slower than for the other nuts. This is not surprising as the response for this test not only depends on the amount of aldehydic components but also on their structure. It has been shown that the reaction is more intense with diunsaturated aldehydes than with monounsaturated and saturated aldehydes (22). Moreover, a double bond in the carbon chain conjugated with the carbonyl double bond increases the molar absorbance four to five times. This means that α,β -unsaturated aldehydes will contribute more to the pAV than saturated and other unsaturated aldehydes (22). The fact that oxidative degradation of oleic acid

forms less α,β -unsaturated aldehydes than do linoleic and linolenic acid (22), explains the lower response observed in almonds. Pistachios had significantly higher pAV as compared with almonds and peanuts, which may be due to the more drastic roasting parameters used as compared to the other nuts (higher roasting temperature than for peanuts, and higher roasting time/temperature than for almonds), together with a lower antioxidant (total polyphenols and tocopherols) profile of pistachios (data not shown). In tahina (figure 4b₂), pAV increased throughout the processing manufacture, except in two stages (B and D), where the pAV decreased.

Evolution of the TBARs during processing

Production of the TBARs in nuts and tahina is presented in Figure 4. Pistachios had again significantly higher TBARs values as compared with almonds and peanuts (figure 4a₃), for the same reasons as explained above for pAV. It was observed that TBARs in nuts reached a maximum (stage C) and then declined, perhaps due to further reaction of carbonyl compounds, especially MDA, with proteins during roasting (23). In tahina (figure 4b₃), TBARs increased throughout the processing, except in two stages (B and D), where the TBARs decreased.

The different patterns observed for pAV and TBARs in nuts reveal the cumulative nature of high molecular weight aldehydes measured by pAV, as the latter continuously increased during roasting and even after, even though heat treatment was stopped. On the contrary, TBARs values decreased after roasting of nuts because of the highly reactive nature of MDA. Since oxidation rates tend to be slower during these stages (C and D) than during roasting as heat treatment was stopped, the rate of decomposition of MDA overtakes the rate of formation resulting in such decay. This difference was not observed in sesame seeds; pAV and TBARs followed the same pattern even after roasting, as a heat treatment was still applied in the following stages (grinding and sterilization), promoting the continuous formation of MDA.

Parallel evolution of hydroperoxides, pAV and TBARs during roasting of sesame seeds

Figure 5 shows the time course of hydroperoxides, pAV and TBARs during roasting of sesame seeds. Hydroperoxide formation exhibited a bell-shaped curve as a function of time. Such evolution is typical of the transient hydroperoxide formation step, which results from both the formation and degradation rates. The level of hydroperoxides increased fast and sharply almost

immediately after the beginning of roasting, until a maximum was reached at 30 min (3.5 mmol/100 mg fat), before a continuous decrease was observed. Some studies (24) showed that hydroperoxides reached a plateau at a certain time of thermal treatment, indicating that a steady state has been obtained. Tilbury and Miller (24) found similar results when heating linoleic acid at 60 °C. In our case, the roasting temperature continuously increases during the roasting process (Fig 3b), preventing the steady state from being reached.

The pAV and TBARs began to increase significantly after 30 min, when the temperature at the seed surface reached 80 °C, whereas hydroperoxide concentration dropped. This increase was linearly proportional to the temperature increase ($R^2 = 0.98$ for both pAV and TBARs). TBARs levels and pAV in roasted sesame seeds were in good agreement ($R^2 = 0.98$, $n=30$). However, the rate of formation of pAV was steeper than the TBARs as shown in figure 5. This is again indicative of the cumulative nature of high molecular weight aldehydes measured by pAV and the reactive nature of MDA measured by TBARs as explained before.

In conclusion, changes in lipid oxidation indicators (hydroperoxides, pAV, TBARs) reveal significant LPO in nuts and sesame seeds during heat process. The above results also suggest that the indicators of secondary peroxidation step, p-anisidine and TBARs values, are a better index of nuts and sesame seeds oxidation in the end-product than the hydroperoxide value. However, hydroperoxide value provides a sensitive indication of the initial oxidation rates. Accordingly, the levels of hydroperoxides indicated that pistachios were more prone to oxidation than almonds and peanuts, and peanuts more than almonds. This was confirmed by the results of the secondary oxidation products, p-anisidine and TBARs. Finally, the particular resistance of almonds against oxidation (revealed by the lowest p-anisidine and TBAR values) compared to other nuts may be explained by the high level of MUFAs, especially oleic acid, and the high polyphenol and tocopherol (especially α -tocopherol) content (data not shown). Moreover, the highest polyphenol degradation rate was found in almonds, compared to other nuts, suggesting a more efficient antioxidant activity of the polyphenols present in almonds (data not shown). This stability was reflected by a lower PUFA degradation (data not shown).

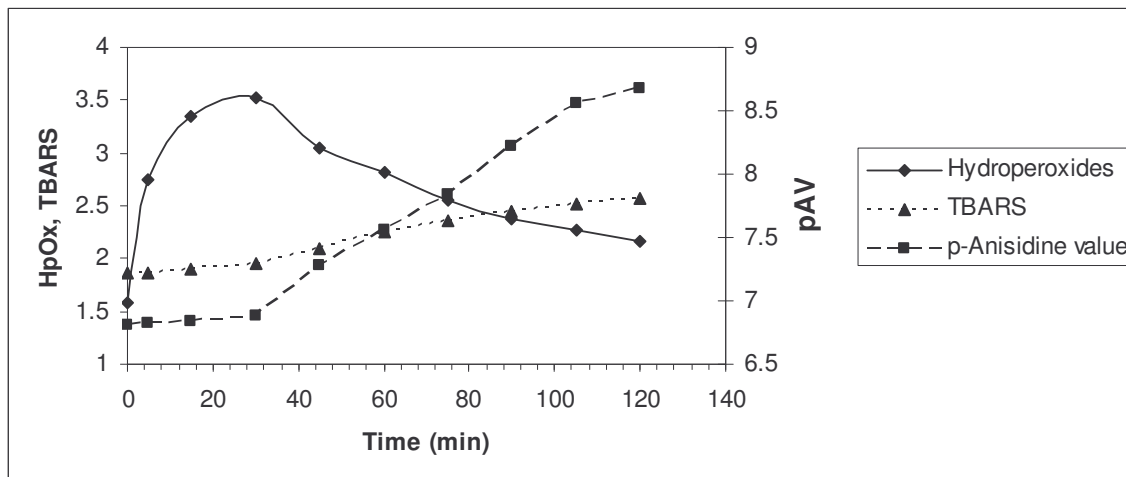


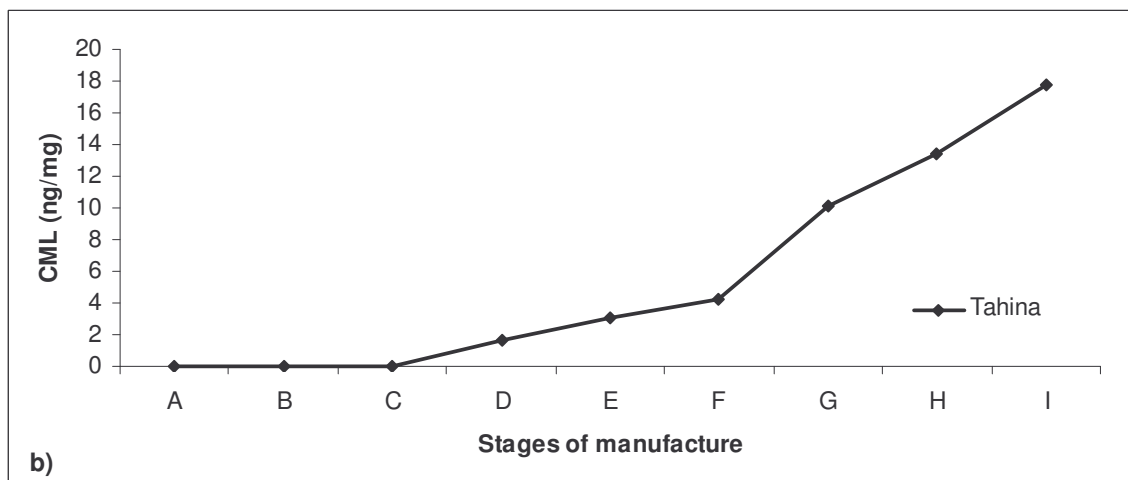
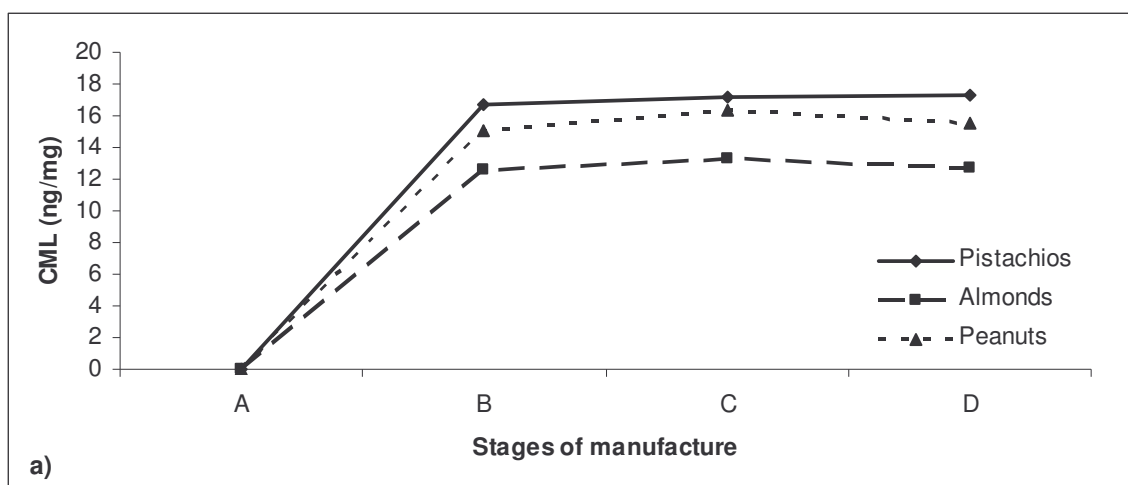
Figure 5: Time course patterns of hydroperoxide, pAV and TBAR formation during the roasting of sesame seeds. Data are average of two measurements.

Effect of processing on CML and *trans* FA formation

CML formation during processing

CML was absent in the raw samples. Figure 6 shows the formation of CML during the processing of nuts and tahina. In general, CML increased significantly with processing, providing values in the final product close to 17 ng/mg in pistachios and tahina, 15 ng/mg in peanuts and 12 ng/mg in almonds. In nuts (figure 6a), roasting was the step mostly responsible for CML formation. In tahina (figure 6b), CML was also produced during the roasting process (G), reaching a value of 10 ng/mg, but its concentration still continued to increase during milling (H) (32.4 % increase) and sterilization (I) (32.6 % increase). Figure 6c shows the evolution of CML during the roasting of sesame seeds. After a lag time (about 60 min) where no significant CML was detected, CML increased exponentially as a function of time ($R^2 = 0.99$). The formation of CML did not start until the temperature of the sesame seeds reached about 85°C, around 60 min, whereas carbonyl compounds already appeared at 30 min, indicating that perhaps the detection sensitivity for CML is lower than that of total carbonyl compounds. We found a high negative correlation ($R^2 = -0.96$) between CML accumulation and PUFA degradation in sesame seeds (data not shown), and a positive correlation between CML accumulation and lipid oxidation indices, *p*-anisidine and TBARs ($R^2 = 0.89$ and $R^2 = 0.84$, respectively). These results support the hypothesis that CML is mainly formed from PUFA oxidation products produced in heat-treated PUFA rich food (7). Glyoxal suggested to be a key substrate for CML formation (25), has been shown to be produced

during methyl linoleate autoxidation (26). These data were later corroborated by diverse studies reporting glyoxal formation during UV irradiation of polyunsaturated fatty acids, oxidation of linoleic acid in an iron-ascorbate model system (26), or arachidonic acid autoxidation (5). This dialdehyde is believed to be produced by further oxidation of α,β -unsaturated aldehydes formed during LPO (26). CML showed also satisfactory correlation when modeled exponentially over the moisture content ($y = 73.84e^{-1.688x}$, $R^2 = 0.94$). This indicates that moisture content may be a critical factor in CML formation in roasted nuts and seeds, since glycooxidation and lipoxidation are promoted by low moisture contents (27).



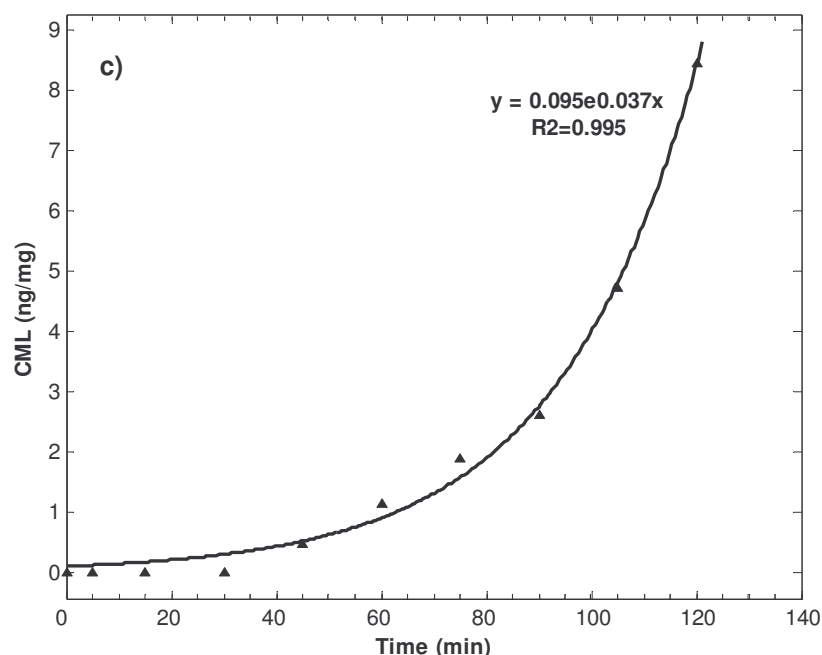
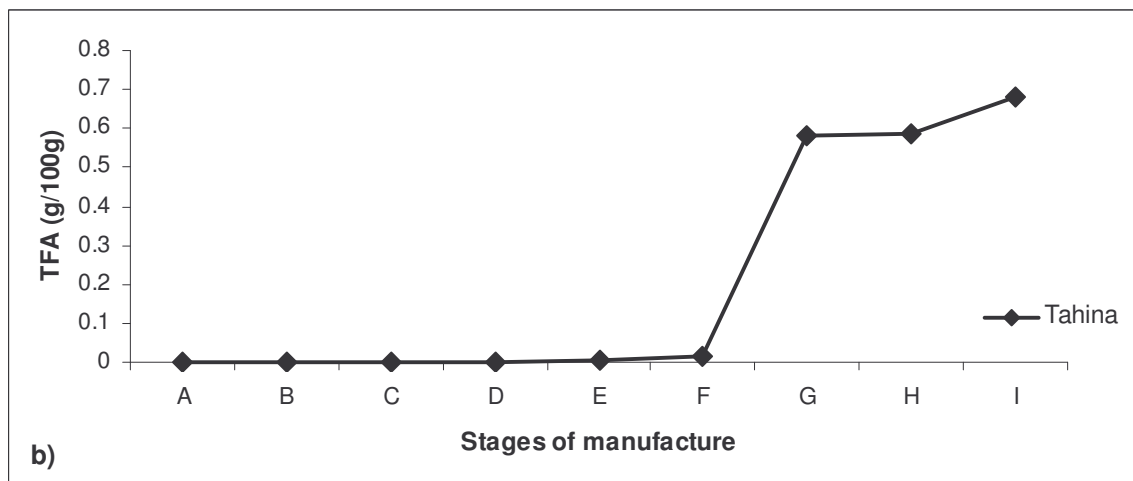
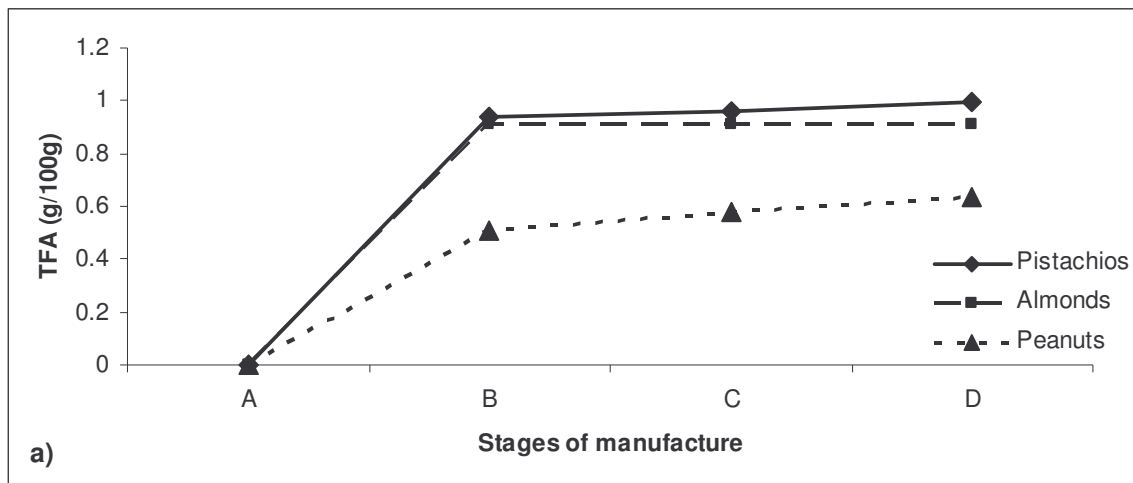


Figure 6: CML accumulation during the stages of processing of (a) nuts and (b) tahina; and (c) during the roasting of sesame seeds (continuous line, exponential fitting curve of CML accumulation in sesame seeds during roasting). Data are average of two measurements.

Trans fatty acid formation during processing

tFA were absent in the raw samples. Figure 7 shows the formation of tFA during the processing of nuts and tahina. In general, tFA increased significantly with processing, providing values in the final product around 0.95 g/100 g in pistachios, 0.5 g/100 g in peanuts, 0.9 g/100 g in almonds and 0.6 g/100 g in tahina. In nuts (figure 7a), roasting was the main step responsible for the development of tFA with no further significant increase during the following stages as no further heat treatment was applied. Levels of tFA remained stable following roasting since tFA tend to be more stable during storage compared with *cis* bonds (28). In tahina (figure 7b), tFA appeared significantly after the roasting process (G), reaching a value of 0.58 g/100g, and further increased during sterilization (I) (16.5 % increase). Figure 7c shows the evolution of tFA during the roasting of sesame seeds. After a lag time (75 min) where no significant tFA was detected, tFA increased linearly ($R^2 = 0.99$) as a function of time. The formation of tFA did not start until the temperature of the sesame seeds reached about 92.5 °C. At the end of the roasting process, the

tFA content reached a value of 0.59 g/100 g, yielding a 4-fold increase in tFA between 60 and 120 min of roasting.



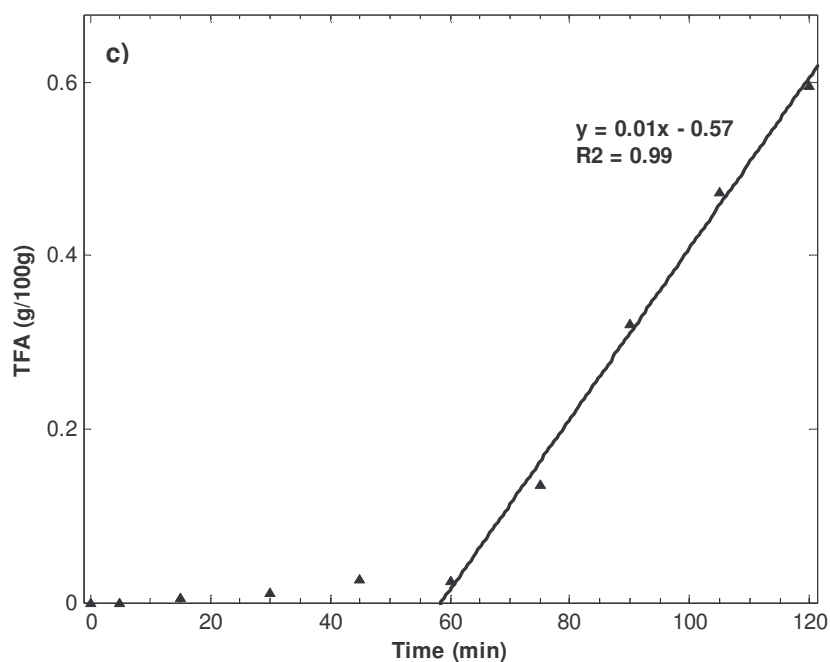


Figure 7: *Trans* fatty acid accumulation during the stages of processing of (a) nuts and (b) tahina; and (c) during the roasting of sesame seeds (continuous line, linear fitting curve of tFA accumulation in sesame seeds during roasting). Data are average of two measurements.

On the basis of these results, we conclude that nuts and sesame processing induced significant lipid peroxidation and formation of neofomed contaminants (NFCs), such as CML and tFA. The roasting step was the critical process; despite tahina sterilization further participated to the final LPO and NFC accumulation. Pistachios appeared to be the nuts mostly concerned by such reactions, due to more drastic thermal conditions applied. No recommendation is proposed for NFCs up to date, except for tFAs (4). Although the tFA content was always lower than the recommended maximal limit, fixed at 1 g/100 g (4), the maximal levels found in this study were close to this limit (maximum of 0.94 g/100 g) and analysis of commercial products (N=20) revealed that some products have reached the limit (data not shown).

Due to the potential negative health impact of LPO products, a better control of heat processing, namely, roasting, should be recommended. Nuts and seed products appear to be especially prone to those side reactions due to their high PUFA content, so that attention should be paid to the distribution of NFC levels in such products. Improvement of nuts and tahina safety implies optimization of the roasting conditions (nuts and tahina) and sterilization technology (tahina)

without compromising their microbiological safety (*Salmonella* in tahina). Therefore, establishing the optimal roasting temperature/time is critical to balance these effects while maintaining the desired organoleptic properties. In general, longer roasting residence times and moderate roasting temperatures (130-150 °C) are preferred for optimum oxidative stability, since it was found that the oxidation rate of roasted nuts increased considerably with increasing product temperatures, while process duration was only of minor influence (29). Moreover, roasting was shown to increase the size of intracellular pores, thereby increasing oxygen transfer during and after roasting, leading to oxidation over time. Thus, prevention of lipid oxidation in roasted nuts and seeds needs the integer tissue structure to be maintained (29). Recently, a two-step roasting process, using mild temperature (~130 °C) in the first step for plasticizing the product, followed by longer and higher but as low as possible temperatures for finishing roasting, was proposed to achieve this. The two-step roasting process kept the cell's pore size increase minimal, allowing a higher oxidative stability while maintaining desirable roasted flavor (29). Detailed investigations should be carried out to find optimal process conditions, together with information derived from sensory panels. Regarding roasting technology of sesame seeds, adoption of continuous, more efficient, and less time-consuming technologies, such as fluidized-bed roasting, is advisable (30). The cradle roasters with discontinuous action, as currently used for sesame roasting, have a low performance because of the characteristics of heat transfer to the seeds. The operation duration (approximately 2 hours) and the immediate contact of the product and the air in the premise favor lipid oxidation and decrease the roasted sesame quality. With the continuous processes, the roasting duration can be sharply reduced to 25-30 min (30).

ABBREVIATIONS USED

BHT, butylated hydroxy-toluene; CML, carboxymethyllysine; DM, dry matter; FID, flame ionization detector; LPO, lipid peroxidation; MDA, malondialdehyde; NFC, neoformed compounds; pAV, *p*-anisidine value; RSD, relative standard deviation; SFA, saturated fatty acids; TBA, thiobarbituric acid; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TCA, trichloroacetic acid; tFA, *trans* fatty acids.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Lebanese National Council for Scientific Research.

LITERATURE CITED

- (1) Ozdemir, M.; Seyhan, F.G.; Bakan, A.K.; Ilter, S.; Ozay, G.; Devres, O. Analysis of internal browning of roasted hazelnuts. *Food Chem.* 2001, 73, 191-196.
- (2) Machiels, D. ; Istasse, L. La réaction de Maillard: Importance et applications en chimie des aliments. *Ann. Med. Vet.* 2002, 146, 447-352.
- (3) Angelo, A. J. St. Lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* 1996, 36, 175-224.
- (4) Léger, C. L.; Razanamahefa, L. Risks and benefits of food with trans fatty acids for human health – Recommendations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 2005, 12, 61-67.
- (5) Fu, M-X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S.R. The advanced glycation end product, N^ε-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxydation and glycoxydation reactions. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 9982-9986.
- (6) Hewedi, M. M.; Kiesner, C.; Meissner, K.; Hartkopf, J.; Erbersdobler, H. J. Effects of UHT heating of milk in an experimental plant on several indicators of heat treatment. *J. Dairy Res.* 1994, 61, 305-309.
- (7) Addis, P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24, 1021-1030.
- (8) Wautier, J. L.; Zoukourian, C.; Chappey, O. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy; soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyper-permeability in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1996, 97, 238-243.
- (9) Frankel, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. and Tech.* 1993, 4, 220-225.
- (10) NP Analytical Laboratories. Measuring rancidity in fats and oils. 2005 (<http://www.ralstonanalytical.com/FileUploads/Information/Quality of Fats and Oils 02.pdf>).
- (11) ISO 665-2000. Oil seeds - Determination of moisture and volatile matter content., International Standards Organization, 2000.
- (12) AFNOR V 03-030 (F). Agricultural products and foodstuffs - Extraction of the crude fat with a view to its characterization. Association Française de Normalisation, 1991.
- (13) Jiang, Z. E.; Woollard, A. C. S.; Wolff, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method, *Lipids* 1990, 26, 853-856.

- (14) Labrinea, E. P.; Thomaidis, N. S.; Georgiou, C. A. Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Anal. Chim. Acta* 2001, *448*, 201-206.
- (15) Genot, C. Some factors influencing TBA test. Annual report of the Vth PCRD EU project: Dietary treatment and oxidative stability of muscle and meat products: nutritive value, sensory quality and safety (Diet-ox), AIR III-CT-92-1577, 1996.
- (16) Charissou, A.; Ait-Ameur, L.; Birlouez-Aragon, I. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *J. Chrom. A* 2007, *1140*, 189-194.
- (17) Kahyaoglu, T.; Kaya, S. Modeling of moisture, color and texture changes in sesame seeds during the conventional roasting. *J. Food Eng.* 2006, *75*, 167-177.
- (18) Uthman, R. S.; Toma, R. B.; Garcia, R.; Medora, N. P.; Cunningham, S. Lipid analyses of fumigated vs irradiated raw and roasted almonds. *J. Sci. Food Agric.* 1998, *78*, 261-266.
- (19) Nepote, V.; Mestrallet, M. G.; Grosso, N. R. Oxidative stability in fried salted peanuts elaborated with high oleic and regular peanuts from Argentina. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2006, *41*, 900-909.
- (20) Frankel, E. N. Chemistry of autoxydation: mechanism, products and flavor significance. In *Flavor Chemistry of Fats and Oils*; Min, D. B., Smous, T. H., Eds.; AOCS Press: Champaign, Illinois, 1985, pp 1-37.
- (21) Frankel, E. N.; Selke, E.; Neff, W. E.; Miyashita, K. Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. IV. Volatile decomposition products from triacylglycerols containing linoleate and linolenate. *Lipids* 1992, *27*, 442-446.
- (22) Muik, B.; Lendl, B.; Molina-Diaz, A.; Ayora-Cañada, M. J. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 2005, *134*, 173-182.
- (23) Wheatley, R. A. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends Anal. Chem.* 2000, *19*, 617-627.
- (24) Tilbury, R. N.; Miller, H. Chemiluminescence from the oxidation of model lipid systems, 2000 (<http://www.photobiology.com/photobiology99/contrib/tilbury/index.htm>).
- (25) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycoaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* 1995, *270*, 10017-10026.

- (26) Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, *45*, 49-59.
- (27) Goldberg, T.; Cai, W.; Peppas, M.; Dardaine, V.; Baliga, B. S.; Uribarri, J.; Vlassara, H. Advanced Glycoxidation End-products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 2004, *104*, 1287-1291.
- (28) Eckel, R. H.; Borra, S.; Lichtenstein, A. H.; Yin-Piazza, S. Y. Understanding the complexity of *Trans* fatty acid reduction in the American diet. American Heart Association *Trans* fat conference 2006. Report of the *Trans* fat conference planning group. *Circulation* 2007, *115*, 2231-2246.
- (29) Perren, R; Escher, F. Nut roasting - technology and product quality. *The Manufacturing Confectioner* 2007, *87* (6), 65-75.
- (30) Djurkov, T. Rotation-pulsed fluidized bed apparatus for Sesame roasting. 2nd Symposium of South-East European Countries (SEEC) on Fluidized Beds in Energy Production, Chemical and Process Engineering and Ecology, Arandjelovac, Yugoslavia, 1999.

CHAPITRE 2. Etude de l'impact du procédé industriel de transformation des noix et graines sur leur qualité nutritionnelle

Article II

Nutritional Degradation of Nuts and Sesame Seeds during Industrial Processing

Rita YAACOUB^{a,c}, Rachad SALIBA^b, Bilal NSOULI^a, Gaby KHALAF^a, and Inès BIRLOUEZ-ARAGON^{c,*}

^a National Council for Scientific Research, Lebanon

^b Departement of Agro- Food science and Technology, faculty of agriculture sciences, Lebanese University, Lebanon

^c AgroParisTech, France

*** Corresponding author: ines.birlouez@wanadoo.fr**

AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, F-75231, Paris Cedex 05, France. Phone: (33)

1.44.08.16.61; Fax: (33) 1.44.08.16.00

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the nutritional damage occurring in almonds, peanuts, pistachios and sesame seeds during their processing. Such evaluation was based on assessment of the heat sensitive antioxidants, vitamin E and total polyphenols, as well as the fatty acid profile. All these parameters were significantly affected by the different processing stages, especially by roasting. The combined loss of MUFA and PUFA amounted to 7.4, 13, 14.3 and 21% in almonds, tahina, peanuts and pistachios respectively. Processing also resulted in 88, 37, 8.3 and 7.7% loss of α -tocopherol, and 72, 20, 7 and 6% loss of β + γ -tocopherol in tahina, pistachios, peanuts and almonds respectively, whereas total polyphenol content was reduced by 30, 15, 11 and 7% in tahina, almonds, peanuts and pistachios respectively. Therefore roasting parameters appear as the critical factor to control in order to improve the nutritional quality of the final product.

Keywords: Nuts; Sesame seeds; Roasting; Polyphenols, Tocopherols, Unsaturated fatty acids.

INTRODUCTION

Nuts and sesame seeds are considered healthful foods worldwide. They are intrinsic part of the diets of some Mediterranean regions where both serum cholesterol levels and the incidence of heart disease are low (1). There is increasing evidence that diets that include nuts may be beneficial in decreasing the risk of chronic diseases, namely cardiovascular disease (CVD) (2), colon cancer (3) and type-II diabetes (4). Women in the Nurses Health Study who consumed nuts five or more times a week were reported to have a 35% lower risk of total coronary heart disease (CHD) as compared with women who rarely ate nuts (5). Similarly, the Physicians Health Study (6) and the Adventist Health Study (7) strongly support the link between consumption of nuts and the reduced risk of heart disease. In addition, several clinical studies have shown a cholesterol-lowering effect for diets supplemented with pistachio nuts (8), peanuts (9) and almonds (10).

The health beneficial effects of nuts despite their high fat content reveal the importance of the fat quality better than quantity as CVD determinant. Metabolic studies have long established that the type of fat, but not the total amount of fat, predicts serum cholesterol levels (11). The predominant types of fat in nuts are monounsaturated and polyunsaturated, a profile associated to lower LDL cholesterol and higher HDL cholesterol and hence decreased CVD risk. Kris-Etherton et al. (12) reported that diets high in MUFA have a favorable effect on the ratio of total cholesterol:high-density lipoprotein (HDL) cholesterol. Diets high in MUFA also reduce levels of LDLs without adversely affecting the HDL fraction. On the other hand, linoleic acid has been shown to be the most potent fatty acid lowering serum total and LDL cholesterol when substituted for dietary saturated fatty acids (SFA) (13). However, Kris-Etherton et al. (14) noted that the decreased risk of CHD associated with nut consumption is not solely related to the fatty acid profile, but may be due in part to the presence of other bioactive components. Nuts supply significant amounts of vitamin E and other tocopherols (15). Moreover, many antioxidant phytochemicals, such as flavonoids, phenolic acids and lignans, also contribute to the protective properties of nuts and seeds (16). Tocopherols are powerful antioxidants and have been shown at high doses to lower the risk of CVD (17).

Nuts and sesame seeds are mostly consumed as processed foodstuffs, mainly in the roasted form. The main goal of technological treatment, which includes roasting, is to improve the organoleptic characteristics. However, processing will also cause chemical changes that may adversely affect the nutritional value. The destruction of bioactive phenolics and tocopherols in nuts and sesame

seeds may negatively impact the potential health benefits arising from their consumption. However information on the stability of fatty acids, tocopherols and polyphenols in nuts and sesame seeds upon heat treatment is sparse. Only few studies have shown that roasting caused a decrease in vitamin E in hazelnuts (18) and maize (19), a decrease in tocopherols in sesame seeds (20), change in the fatty acids distribution causing a significant loss of oleic and linoleic acids (21) and degradation of phenolic compounds and other antioxidant substances in pistachios (22). The purpose of this study was to evidence the process critical steps regarding the nutritional quality deterioration in terms of fatty acids, tocopherol and total polyphenol loss, and to assess the extent of the modification observed in real industrial samples.

MATERIALS AND METHODS

Samples and processing conditions

Four types of roasted nuts (pistachios, almonds and peanuts) commonly consumed in Lebanon and sesame seed products (tahina) were sampled at different steps of processing in the industrial plant of most representative local manufacturers. The products were processed following the flow diagram presented in figure 1. Sesame samples were collected every 15 min at three different places of the roaster to take into account the possible heterogeneity of the roaster (F). Pistachios, peanuts and almonds were roasted at 190 °C for 10 min, 180 °C for 10 min and 180 °C for 8 min respectively.

Manufacture of Tahina

Sesame seeds were sieved, and then soaked in water for 2 hours. The soaked seeds were stained off and passed through a peeler. The hulls and other foreign materials were separated by soaking in brine (180 – 200 g.L⁻¹). The seeds were stained off and washed with water to remove the salt. The seeds were then left to dry at ambient temperature and passed through a roaster (115°C for 2 hours) (steam heated jacketed open drum with continuous stirring). The roasted sesame seeds were then sieved and ground by stone mills to a viscous paste which was sterilized (100°C for 30 min), then filled into plastic containers and marketed as Tahina.

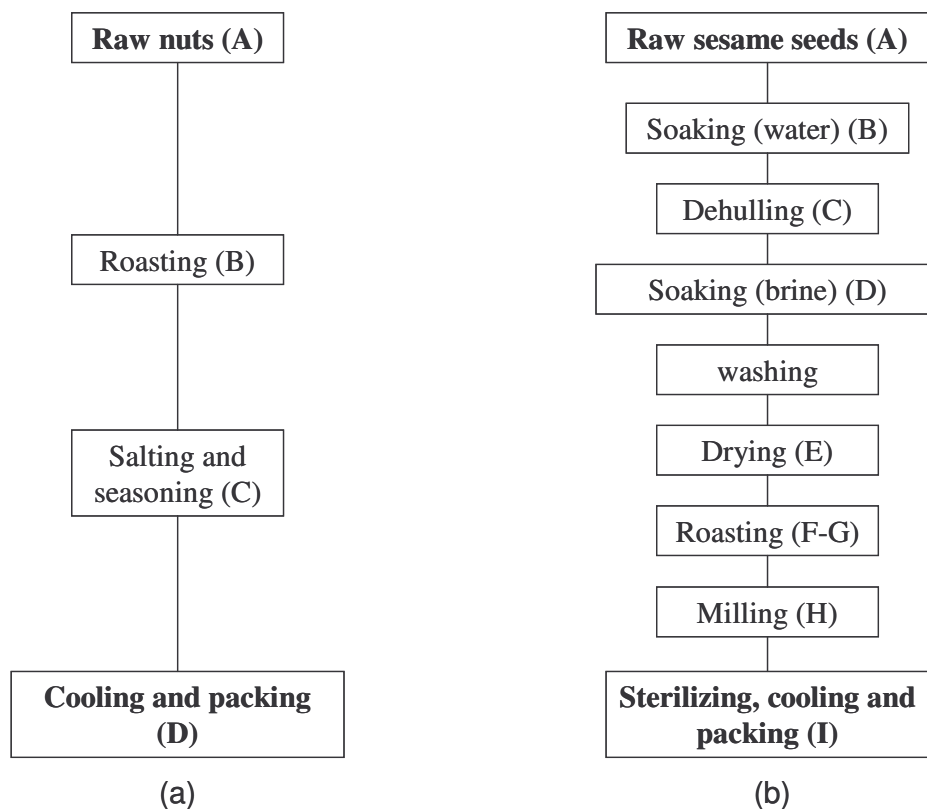


Figure 1: Flow diagram of the nuts and tahina manufacturing process showing the different stages studied. (a) nuts (A, raw material; B, roasting; C, seasoning; D, commercial end-product), and (b) tahina (A, raw material; B, soaking in water; C, dehulling; D, soaking in brine; E, drying; F and G, roasting (F: after 15 min of roasting, G: after 2 hours of roasting); H, milling; I, sterilized end product).

Lipid extraction

1 g of finely ground samples was extracted with 6 ml of hexane/isopropanol (3:2, vol/vol) under vigorous stirring to facilitate extraction of apolar (hexane) and polar (isopropanol) lipophilic compounds (AFNOR NF V03-030). After extraction, the hexane layer was removed, dried under nitrogen and the pure oil was weighed to calculate the percentage yield.

Tocopherol determination

Tocopherols were determined in the hexanic phase after a 10-fold dilution with n-hexane using reversed-phase HPLC with fluorimetric detection at $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=290/330$ nm as previously reported

(23). The HPLC system consisted of a Kontron (France) equipment, including an autosampler, a C₁₈ reversed phase (Equisil ODS 5 µm, 250 x 4.6 mm, Cluzeau, France) column and a fluorimetric detector (FL3000, Thermo Separation Products, France). The mobile phase was prepared by mixing 684 ml acetonitrile, 220 ml tetrahydrofuran, 68 ml methanol, and 28 ml ammonium acetate (1 g/L). The flow rate was 1.2 ml.min⁻¹. Chromatograms were recorded and analyzed using Kromatosystem (KS 2000) Software. Results are expressed as mg.100 g⁻¹ of food sample thanks to external calibration with tocopherol vitamers.

Polyphenol determination

Total polyphenols were determined using the Folin-Ciocalteu colorimetric method (24). Two g of finely ground samples were defatted with 4 ml hexane, then phenols were extracted with 4 ml methanol/water (75/25, v/v), vortexed and centrifuged at 8000g for 10 min at 4°C to recover the aqueous-alcoholic phase. Eight hundred µl of Folin-Ciocalteu reagent (diluted 10 fold in water) were added to 200 µl of methanolic extract, and the solution left for 2 min at ambient temperature before addition of 1 ml sodium bicarbonate (75 g.L⁻¹). After 15 min incubation at 50°C, the absorbance was read at 760 nm using a UV-1205 spectrophotometer (Shimadzu, Europa, GMBH). Results are expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per 100g dry matter, using external calibration.

Analysis of fatty acids

Fatty acids were determined in the oil extracts as their methyl esters by gas chromatography. For the preparation of fatty acid methyl esters (FAME), 50 to 100 mg extracted oil were accurately weighed and treated with 0.2 ml methanolic NaOH (2 mol.L⁻¹) in stoppered tubes under vigorous agitation after addition of 1 ml heptane containing the internal standard, heptadecanoic acid (1.91 mg.ml⁻¹). The tubes were then heated at 50°C in a water bath for 20 sec and shaken for 10 sec. 0.4 ml methanolic HCL (1 mol.L⁻¹) were added, shaken vigorously and left to stand until separation of the layers. The FAME containing supernatant was diluted 15 times and transferred to glass vials for further analysis. Quantitative analysis of FAME was performed with a gas chromatograph (Perkin Elmer, Autosystem XL) equipped with a flame ionization detector (FID). A BPX 90 capillary column (30 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness) from SGE was used. The temperature program was as follows: initial temperature, 145°C (1 min holding),

raised to 170°C at 10°C / min, and was hold for 10 min, before raising further up to 230°C at 15°C / min, then isothermal for 4 min. Injector and detector temperatures were 270 and 280°C respectively. The carrier gas was hydrogen at a flow rate of 0.7 ml.min⁻¹. All samples were injected in duplicates. Chromatograms were recorded using a ChromQuest Software. Methyl esters were identified by comparing their retention times to those of a FAME mix purchased from Sigma. Fatty acid methyl esters in the samples were quantified by comparing the area under their peaks in the chromatogram to that of methyl heptadecanoate (derived from the internal standard).

Statistical analysis

Results were expressed as the mean values and standard errors (SE). Analysis of variance (ANOVA) was included in the data treatment to study the variation of the results and the Tukey's means separation test to evaluate significant differences among means (P<0.05). All analyses were performed in duplicate or triplicate. Statistical analyses of the data were carried out using Statistica.7. StatSoft software.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the samples (biochemical composition)

Fat, moisture, protein, tocopherol and total polyphenol contents of the different nuts and tahina (sesame paste) are given in table 1.

Table 1 Total oil, moisture, protein, tocopherol and total polyphenol contents of the different roasted nuts and tahina.

<i>Sample</i>	<i>Total oil g/100g</i>	<i>Moisture g/100g</i>	<i>Protein g/100g</i>	<i>Tocopherols mg/100g</i>		<i>Total polyphenols mg/100g DM</i>
				<i>α</i>	<i>β+γ</i>	
Pistachios	52.3 ± 0.1	2.3 ± 0.003	17.7 ± 0.14	1.17 ± 0.21	12.43 ± 1.08	142 ± 1.28
Almonds	52.2 ± 0.2	3.2 ± 0.001	21.1 ± 0.06	23.05 ± 1.16	1.43 ± 0.44	209 ± 0.13
Peanuts	53.2 ± 0.2	2.7 ± 0.06	23.3 ± 0.55	9.17 ± 0.72	6.36 ± 0.51	178 ± 0.55
Tahina	58.1 ± 0.2	0.5 ± 0.001	22.3 ± 0.06	0.35 ± 0.06	10.11 ± 1.01	60 ± 2.25

Results are expressed as means ± SE of duplicate samples.

The total oil content of the selected roasted nuts and tahina ranged from 52.2 to 58.1 %, with the tahina yielding the greatest percentage of oil and almonds the least. The fatty acid profile of the roasted nuts and tahina determined by capillary-column GC is presented in table 2. The oils are highly unsaturated (80 to 87%), with total PUFA ranging from 22.3 % in almonds to 37.7 % in

tahina (table 2). MUFA were predominant over PUFA in all samples, especially for almonds which contained around 65 % MUFA. The major monounsaturated fatty acid (MUFA) present in all the samples was oleic acid (C18:1), which was particularly high in almonds (65% of the total). Linoleic acid (C18:2) was the most abundant polyunsaturated fatty acid (PUFA) with low amounts of linolenic (C18:3) (less than 1 %). Peanuts had a higher content of linolenic acid compared to the other nuts. The primary saturated fatty acids (SFA) identified in all samples were palmitic acid (C16) and stearic acid (C18), with tahina having a particularly high content of both (9.64% and 6.01 % of the total, respectively).

The tocopherol content of the roasted nuts and tahina was also measured (Table 1). The levels of total tocopherols ranged from 10.5 to 24.5 mg/100g in the following decreasing order: almonds > peanuts > pistachios > tahina. α -tocopherol was the most prevalent tocopherol in almonds and peanuts, which contained 23.1 and 9.2 mg/100g respectively. The level of α -tocopherol detected in pistachios and tahina was particularly low at 1.2 and 0.3 mg/100g respectively. B+ γ -tocopherol were the most prevalent tocopherols in pistachios and tahina, which contained 12.4 and 10.1 mg/100g respectively, whereas almonds and peanuts contained lesser amounts (1.4 and 6.4 mg/100g respectively). δ -tocopherol was present in trace amounts in all samples (data not shown).

Table 2 Fatty acid composition (% of total) of oil extracted from nuts and tahina.

Sample	Fatty acid									MUFA	PUFA	UFA/SFA
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0			
Pistachios	0.04	8.82	0.73	1.13	56.13	27.80	0.86	0.02	0.04	56.86	28.66	8.50
Almonds	0.02	6.45	0.41	1.18	64.95	22.16	0.10	0.02	0.01	65.36	22.26	11.40
Peanuts	0.01	9.93	0.02	3.49	48.45	30.53	0.99	1.56	0.01	48.47	31.52	5.33
Tahina	0.01	9.64	0.01	6.01	41.76	37.20	0.50	0.67	0.02	41.77	37.70	4.86

14:0, myristic acid; 16:0, palmitic acid; 16:1, palmitoleic acid; 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid; 18:2, linoleic acid; 18:3, linolenic acid; 20:0, arachidic acid; 22:0, behenic acid. Results correspond to mean values of duplicate samples.

A convenient rating for the contribution to vitamin E nutriture by individual foods is "E/PUFA"—the ratio of the amount of vitamin E (milligram of α -tocopherol) to the amount of polyunsaturated fat (grams of polyunsaturated fatty acid). Indeed, the requirement for vitamin E increases with higher intakes of polyunsaturated fatty acids (PUFA). The recommended ratio of E/PUFA is 0.6 mg α -tocopherol per gram of PUFA (25). We found E/PUFA ratios of 1.98, 0.53, 0.08 and 0.01 in roasted almonds, peanuts, pistachios and tahina respectively. Thus, roasted almonds and peanuts meet the requirements providing an adequate source of vitamin E.

The level of total polyphenols ranged from 60 to 209 mg GAE/100g of dry matter (DM) (table 1) and the order of decreasing total polyphenol content was almonds > peanuts > pistachios > tahina. All these results consolidate the view that nuts and sesame seeds present beneficial nutritional attributes, and are comparable with those reported by other studies on tahina (26) and on nuts (15, 27).

Nutritional impact of nuts and sesame processing

The effect of roasting on nuts and sesame fatty acids, tocopherol and total polyphenol oxidation was monitored.

Evolution of fatty acids during processing

Figure 2 shows the changes in fatty acid profile during processing of nuts and tahina. In all products, technological processing namely thermal treatment, led to significant loss in unsaturated fatty acids (UFA = sum of MUFA and PUFA). A deep modification in the content of fatty acids was evidenced between raw and processed nuts and sesame seeds. PUFA were more susceptible to oxidation during processing than MUFA (6 to 12-fold more loss in PUFA), whereas SFA remained unchanged throughout the manufacturing stages. The modification in the fatty acid distribution, especially the PUFA, is considered as a good indicator of lipid oxidation (28). The total loss of UFA was in the following increasing order: almonds < tahina < peanuts < pistachios, and amounted to 7.4, 13, 14.3 and 21 % of that present in the raw products respectively. A similar result was obtained by Luh et al. (21) in pistachios during roasting (22.3%). Roasting (B) in nuts, and roasting (F-G) and sterilization (I) in tahina were the main steps involved in the fatty acid loss. Figure 3 shows the evolution of the MUFA and PUFA during roasting of sesame seeds. A very slight decrease in MUFA, and a significant decrease in PUFA after 60 min of roasting were observed. In contrary to our results, Elleuch et al. (26) found that roasting (120°C for 1h) did not cause significant ($P>0.05$) modification in the major fatty acid composition of sesame seeds. Yoshida and Kajimoto (29) also found no significant change ($P>0.05$) in fatty acid composition during sesame roasting at 250°C for 30 min. Such disagreements could be explained by differences in roasting process but related parameters are not fully described in the literature. The relatively long time of roasting (2 hours) associated with an open drum roasting which maintains the product continuously in contact with the oxygen of the air could be a possible explanation of the important PUFA oxidation in the present study.

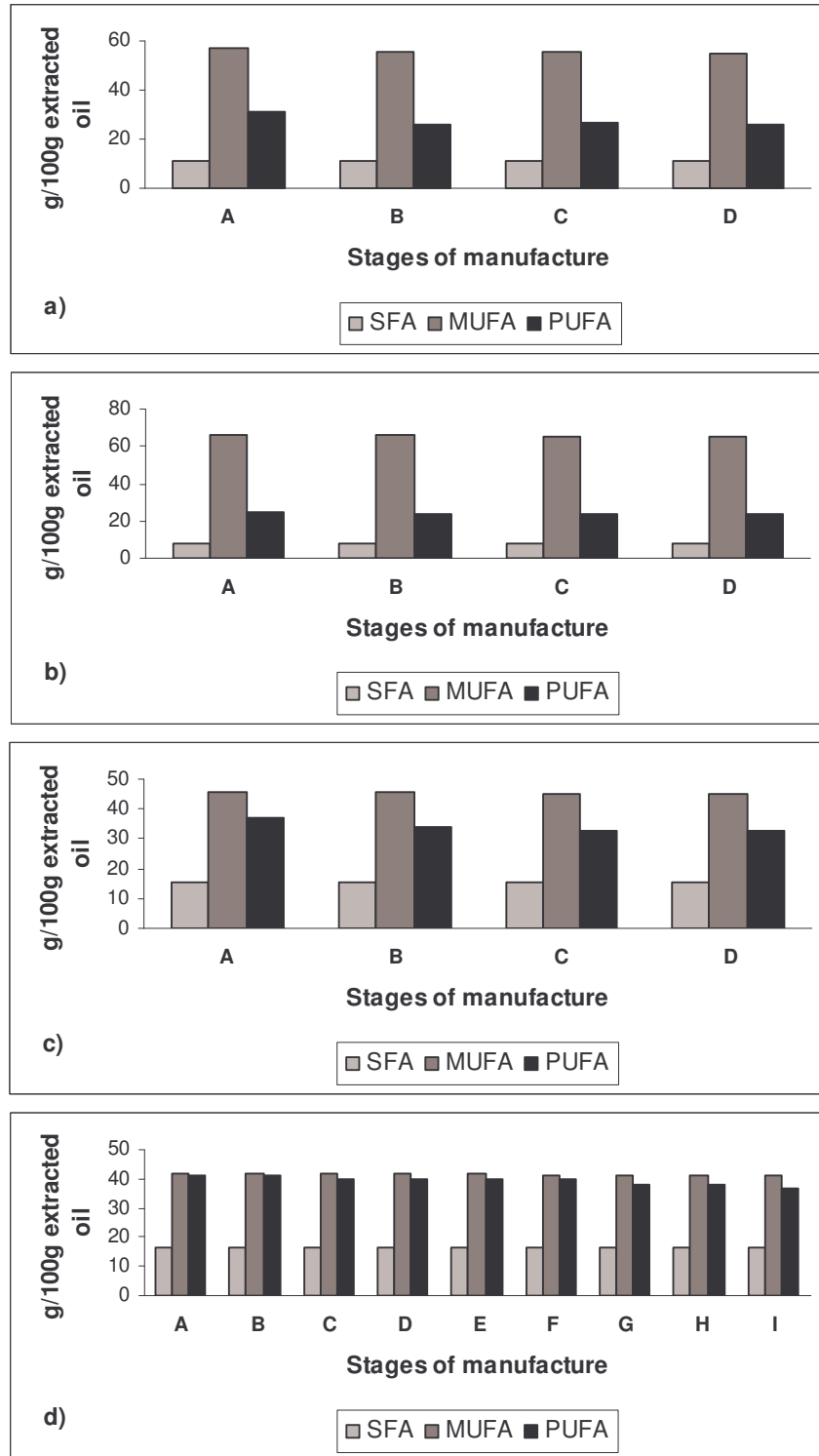


Figure 2: Monounsaturated fatty acids (MUFA), polyunsaturated fatty acids (PUFA) and saturated fatty acids (SFA) in g/100g of oil extracted from nuts: (a) pistachios, (b) almonds, (c) peanuts and (d) tahina during the stages of the manufacture processing. Data are means of two measurements.

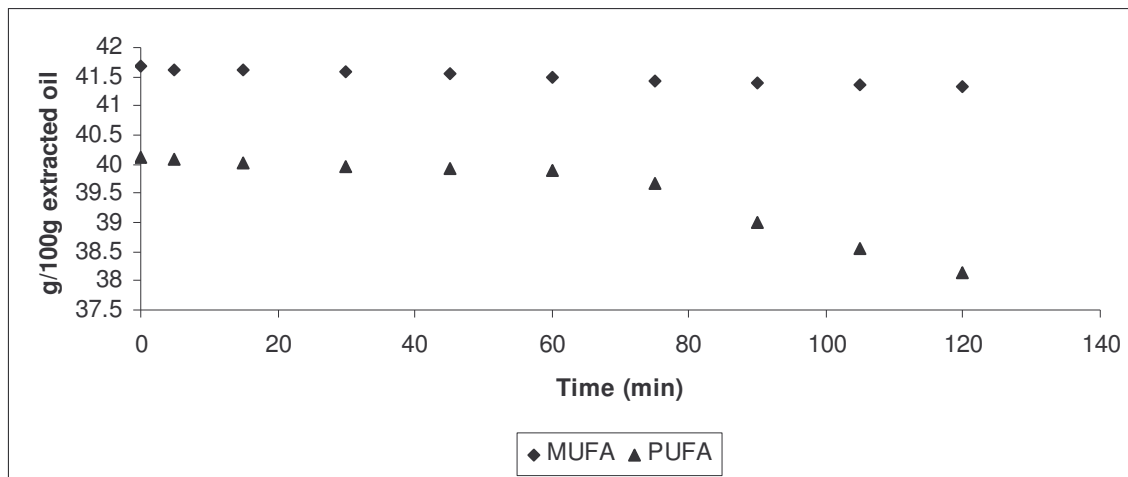


Figure 3: Monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids evolution during roasting of sesame seeds. Data are means of two measurements.

Evolution of tocopherols during processing

Figure 4 shows the change in α -tocopherol content during processing of nuts and tahina. In nuts (figure 4a), roasting (B) led to significant loss in α -tocopherol content (37%, 8.3% and 7.7% in pistachios, peanuts and almonds respectively). In tahina (figure 4b), α -tocopherol content decreased slightly during the dehulling stage (C) as a result of the removal of the skins, then more acutely during roasting (F-G), milling (H) and sterilization (I) as a result of heating, resulting in 88% total loss in the end-product. Roasting alone contributed to 70% loss in α -tocopherol. The evolution curve in Figure 4c shows that α -tocopherol decreased linearly ($R^2=0.98$) as a function of roasting time.

Figure 5 shows the changes in $\beta+\gamma$ -tocopherol content during processing in nuts and tahina. In nuts (figure 5a), roasting (B) led to 20.8%, 7.8% and 6.6% $\beta+\gamma$ -tocopherol loss in pistachios, peanuts and almonds respectively. In tahina (figure 5b), $\beta+\gamma$ -tocopherol evolution during seeds processing was similar to that observed for α -tocopherol with a total 72% loss in the end-product. Roasting of sesame seeds contributed to 66% loss in $\beta+\gamma$ -tocopherol, with a linear decrease ($R^2=0.98$) as a function of the time of roasting (Figure 5c).

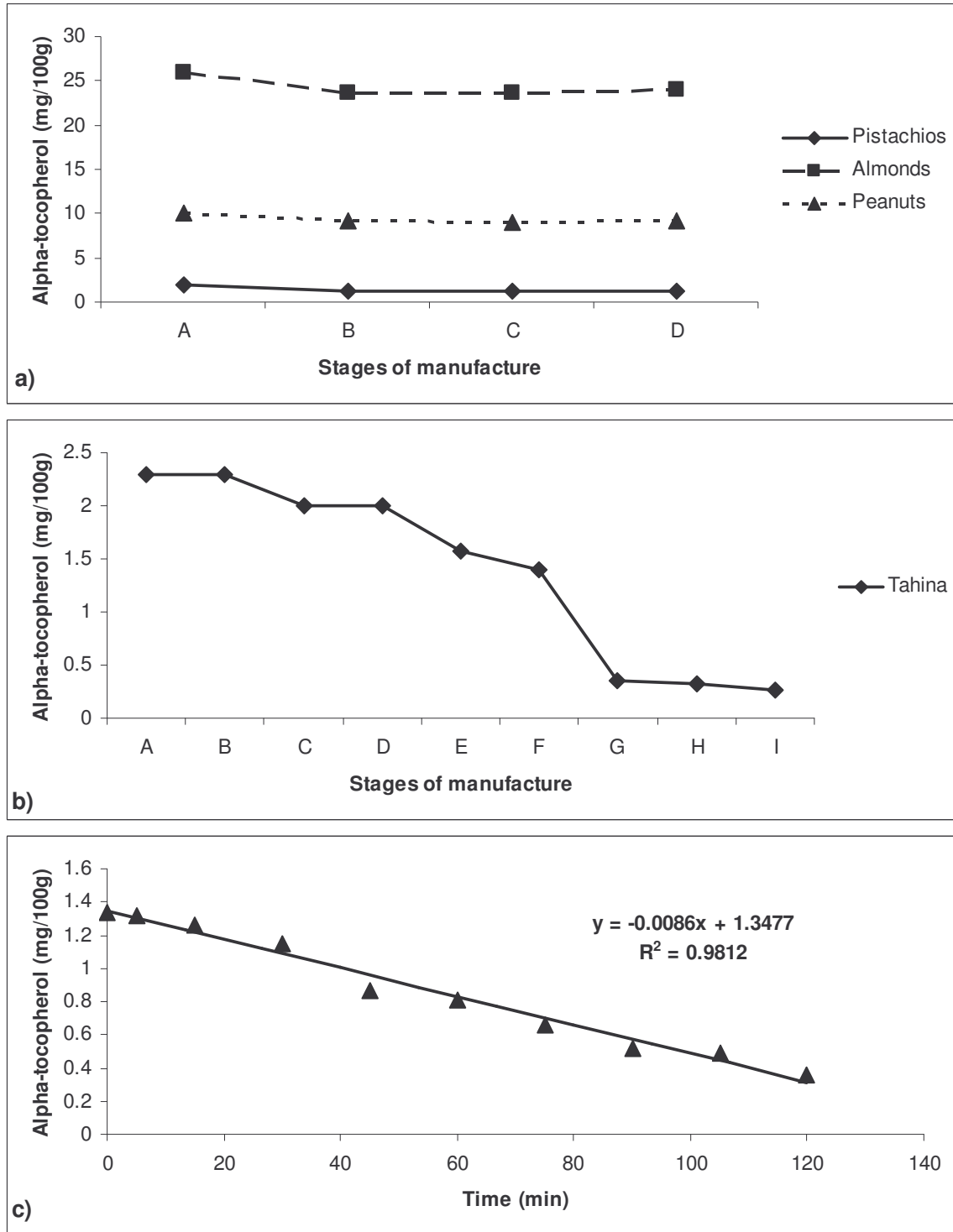


Figure 4: Change of α -tocopherol content during the stages of the manufacture processing of (a) nuts and (b) tahina; and (c) during the roasting of sesame seeds (continuous line : linear fitting curve of α -tocopherol evolution as a function of roasting time). Data are means of two measurements.

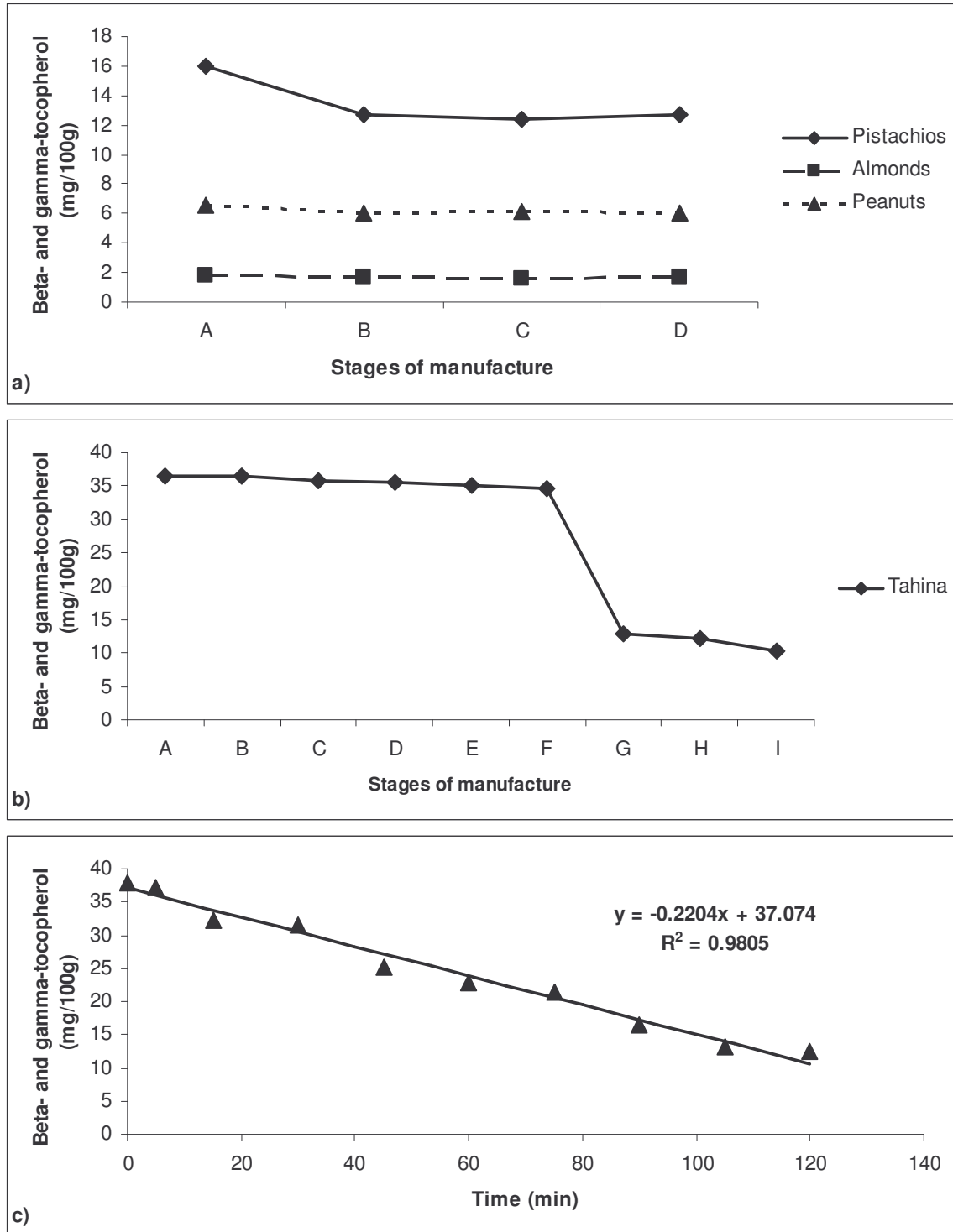


Figure 5: Change of $\beta+\gamma$ -tocopherol content during the stages of the manufacture processing of (a) nuts and (b) tahina; and (c) during the roasting of sesame seeds (continuous line : linear fitting curve of $\beta+\gamma$ -tocopherol evolution as a function of roasting time). Data are means of two measurements.

Evolution of total polyphenols during processing

In nuts (figure 6a), roasting (B) led to 15%, 11% and 7% loss in total polyphenol content in almonds, peanuts and pistachios respectively. In tahina (figure 6b), total polyphenol content decreased during the dehulling stage (C) as a result of the removal of the skins since they are concentrated in polyphenolic compounds (26). Total polyphenol content continued to decrease during roasting (F-G), milling (H) and sterilization (I) as a result of heating. Elleuch et al. (26) also emphasized the degradation of polyphenols in sesame seeds as a result of heat treatment, since the total polyphenol content decreased from 598 to 260 mg GAE.100g⁻¹ DM after drying at 80°C for 15 min and roasting at 120°C for 1 h. In the conditions of the present study, the extent of total polyphenol degradation in sesame seeds reached around 15 % between the beginning and the end of roasting. Figure 6c shows the total polyphenols evolution as a function of roasting time: after a lag time (15 min) where no significant polyphenol degradation was observed, a decrease was observed which slowed down after 60 min of roasting despite the increase in the product temperature. This could be explained by the production during roasting of other compounds exhibiting antioxidant activity such as sesamol and sesaminol from sesamol and sesaminol glycosides with no antioxidant activity respectively (30, 31, 32). Elleuch et al. (26) found that the sesamol increased considerably during roasting and was found to exert a synergetic action with γ -tocopherol (30, 31).

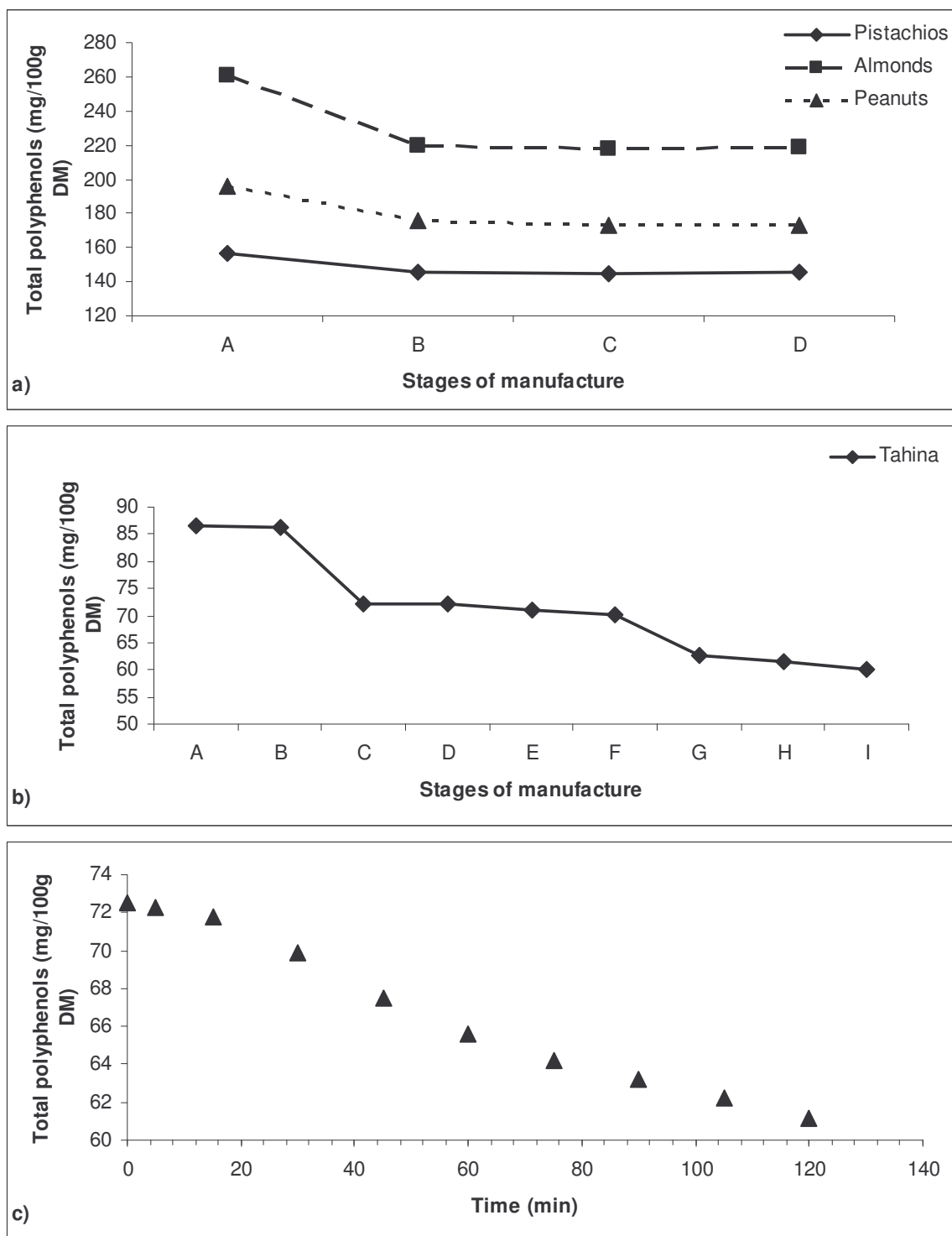


Figure 6: Change of total polyphenol content during the stages of the manufacture processing of (a) nuts and (b) tahina; and (c) during the roasting of sesame seeds. Data are means of three measurements.

Concluding remarks

We conclude that the processing of nuts and sesame seeds analyzed in the present study, significantly affected the fatty acid profile as well as tocopherol and total polyphenol contents. Roasting was the main technological stage involved in nutritional degradation, despite, other stages of the tahina manufacture such as dehulling, milling and sterilization also contributed to a lesser extent to the nutritional loss. As expected PUFA were the fatty acids most sensitive to oxidation, and α -tocopherols were more rapidly degraded than β + γ -tocopherols in all samples. Total polyphenol content also decreased as a result of processing. However the fate of each phenolic compound in the nuts and sesame is unknown. While certain phenolic compounds are decomposed, others may be formed. Further research is required to better understand the effect of processing on individual phenolic compounds in nuts and sesame seeds, especially those providing the highest health benefits. For example, the principal flavonoids in almonds - catechin, epicatechin, isorhamnetin, quercetin and kaempferol - were found to provide the highest degree of protection against oxidant-induced cell death than any other flavonoids (27). Moreover, recent in vitro studies have revealed that polyphenols in almonds work synergistically with vitamin E to decrease the susceptibility of LDL to oxidation (33). In fact, this research found that together vitamin E and almond flavonoids were more than twice as effective as when they were administered separately. These findings further demonstrate the importance to consider the whole micronutrients when optimizing the processing conditions in order to be able to produce food products with maximum health benefits. Almonds were evidenced in this study as one of the nuts richest in vitamin E and total polyphenols with interesting flavonoid profile (27). But because their polyphenols tended to degrade more rapidly than in other nuts in the conditions of this study, special attention should be paid regarding roasting of almonds in order to avoid such losses in biologically active compounds. PUFA degradation in nuts was the highest in pistachios, followed by peanuts then almonds, and was inversely related to the initial antioxidant (total tocopherols and polyphenols) content. Moreover, polyphenol degradation was inversely related to PUFA degradation whereas tocopherol degradation was positively related to PUFA degradation. This suggests that polyphenols present in nuts were able to preserve PUFA from oxidation better than tocopherols, and act as stabilizers of vitamin E during heating as shown by several studies on olive oil (34, 35). In their raw form, almonds appear as the most nutritional interesting nut in terms of vitE:PUFA ratio and total polyphenol content, as well as a high UFA/SFA ratio (11.4),

followed by peanuts, then pistachios and finally sesame. Although processing significantly decreased their nutritional value, this order was still valid for the processed products.

Finally, the present investigation reveals that the loss in various components with nutritional interest in the roasted nuts and sesame seeds deserves more attention, and point out the need for preserving this nutritional quality. This implies the optimization of the roasting technology and parameters while reaching the desired organoleptic properties.

Abbreviations used

CVD: cardiovascular disease; CHD: coronary heart disease; DM: dry matter; FID: flame ionization detector; GAE: gallic acid equivalent, HDL: high-density lipoproteins; LDL: low-density lipoprotein; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; RSD: relative standard deviation; SFA: saturated fatty acids; UFA: unsaturated fatty acids.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Lebanese National Council for Scientific Research.

LITERATURE CITED

- (1) Spiller, G. A. (Ed.), *The Mediterranean Diets in Health and Disease*, Van Nostrand, New York, NY, 1991.
- (2) Fraser, G. E. Nut consumption, lipids and risk of a coronary event. *Clin. Cardiol.* **1999**, *22*, 11-5.
- (3) Jenab, M.; Ferrari, P.; Slimani, N.; Norat, T.; Casagrande, C.; Overad, K.; Olsen, A.; Stripp, C.; Tjønneland, A.; Boutron-Ruault, M. C.; Clavel-Chapelon, F.; Kesse, E.; Nieters, A.; Bergmann, M.; Boeing, H.; Naska, A.; Trichopoulou, A.; Palli, D.; Krogh, V.; Celentano, E.; Tumino, R.; Sacerdote, C.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Ocké, M. C.; Peeters, P. H. M.; Engeset, D.; Quirós J. R.; González, C. A.; Martínez, C.; Chirlaque, M. D.; Ardanaz, E.; Dorronsoro, M.; Wallström, P.; Palmqvist, R.; Van Guelpen, B.; Bingham, S.; San Joaquin, M. A.; Saracci, R.; Kaaks, R.; Riboli, E. Association of nut and seed intake with colorectal cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2004**, *13*(10),1595-1603.
- (4) García-Lorda, P.; Rangil, I. M.; Salas-Salvadó, J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2003**, *57*, 8-11.

- (5) Hu, F. B.; Stampfer, M. J.; Manson, J. E.; Rimm, E. B.; Colditz, G. A.; Rosner, B. A.; Speizer, F. E.; Hennekens, C. H.; Willett, W. C. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *Br. Med. J.* **1998**, *317*, 1341-1345.
- (6) Albert, C. M. ; Gaziano, J. M. ; Willett, W. C. ; Manson, J. E. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' Health Study. *Arch. Intern. Med.* **2002**, *162*, 1382-1387.
- (7) Fraser, G. E.; Sabate, J.; Beeson, W. L.; Strahan, T. M. A possible protective effect of nut consumption and risk of coronary heart disease. The Adventist Health Study. *Arch. Intern. Med.* **1992**, *152*, 1416-1424.
- (8) Edwards, K.; Kwaw, I.; Matud, J.; Kurtz, I. Effect of pistachio nuts on serum lipid levels in patients with moderate hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Nutr.* **1999**, *18*, 229-232.
- (9) O'Byrne, D. J.; Knauft, D. A.; Shireman, R. B. Low fat-monounsaturated rich diets containing high-oleic peanuts improve serum lipoprotein profiles. *Lipids* **1997**, *32*, 687-695.
- (10) Spiller, G. A.; Jenkins, D.; Cragen, L. N.; Gates, J. E.; Bosello, O.; Berra, K.; Rudd, C.; Stevenson, M.; Superko, R. Effect of a diet high in monounsaturated fat from almonds on plasma cholesterol and lipoprotein. *J. Am. Coll. Nutr.* **1992**, *11*, 126-130.
- (11) Hu, F. B.; Manson, J. E.; Willett, W. C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *J. Am. Coll. Nutr.* **2001**, *20*, 5-19.
- (12) Kris-Etherton, P. M.; Pearson, T. A.; Wan, Y.; Hargrove, R. L.; Moriarty, K.; Fishell, V.; Etherton, T. D. High monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *70*, 1009-1015.
- (13) Mensink, R. P.; Katan, M. B. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb.* **1992**, *12*(8), 911-919.
- (14) Kris-Etherton, P. M.; Zhao, G.; Binkoski, A. E.; Coval, S. M.; Etherton, T. D. The effect of nuts on coronary heart disease risk. *Nutr. Rev.* **2001**, *59*, 103-111.
- (15) Maguire, L. S.; O'Sullivan, S. M.; Galvin, K.; O'Connor, T. P.; O'Brien, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2004**, *55*, 171-178.
- (16) Spiller, G. A.; Bruce, B. Nuts and healthy diets. *Vegetarian Nutrition: An International Journal* **1997**, *1* (1), 12-16.

- (17) Rimm, E. M.; Stampfer, M. J. The role of antioxidants in preventive cardiology. *Curr. Opin. Cardiol.* **1997**, *12*, 188-194.
- (18) Amaral, J. S.; Casal, S.; Seabra, R. M.; Oliveira, B. P. Effects of roasting on hazelnut lipids. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (4), 1315-1321.
- (19) Ayatse, J. O.; Eka, O. U.; Ifon, E. T. Chemical evaluation of the effect of roasting on the nutritive value of maize (*Zea mays* L.). *Food Chem.* **1983**, *12*, 135-147.
- (20) Koizumi, Y.; Fukuda, Y.; Namiki, M. Marked antioxidative activity of seed oils developed by roasting of oil sesame seeds. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* **1996**, *43*, 1272-1277.
- (21) Luh, B. S.; Wong, W. S.; El Shimi, N. E. Effect of processing on some chemical constituents of pistachio nuts. *J. Food Qual.* **1982**, *5* (1), 33-41.
- (22) Seeram, N. P.; Zhang, Y.; Henning, S. M.; Lee, R.; Niu, Y.; Lin, G.; Heber, D. Pistachio skin phenolics are destroyed by bleaching resulting in reduced antioxidative capacities. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *5*, 7036-7040.
- (23) Birlouez-Aragon, I.; Girard, F.; Ravelontseheno, L.; Bourgeois, C.; Belliot, J. P.; Abitbol, G. Comparison of two levels of vitamin C supplementation on antioxidant vitamin status in elderly institutionalized subjects. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **1995**, *65*, 261-266.
- (24) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144-158.
- (25) Harris, P. L.; Embree, N. D. Quantitative consideration of the effect of polyunsaturated fatty acid content of the diet upon the requirements for vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* **1963**, *13*, 385-392.
- (26) Elleuch, M.; Besbes, S.; Roiseux, O.; Blecker, C.; Attia, H. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chem.* **2007**, *103*, 641-650.
- (27) Milbury, P. E.; Chen, C. Y.; Dolnikowski, G. G.; Blumberg, J. B. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5027-5033.
- (28) Gray, J. I.; Monahan, F. J. Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends Food Sci. Tech.* **1992**, *3*, 315-318.
- (29) Yoshida, H.; Kajimoto, G. Microwave heating affects composition and oxidative stability of sesame (*Sesamum indicum*) oil. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 613-616.

- (30) Yoshida, H.; Takagi, S. Effect of roasting temperature and time on the quality characteristics of sesame (*Sesame indicum* L.) oil. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, *75*, 19-26.
- (31) Fukuda, Y.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Namiki, M. Oxidative stability of foods fried with sesame oil. *Nippon Shokuhin kagaku kogaku Naishi* **1988**, *35*, 25-32.
- (32) Kumazawa, S.; Koike, M.; Usui, Y.; Nakayama, T.; Fukuda, Y. Isolation of sesaminols as antioxidative components from roasted sesame seed oil. *J. Oleo Sci.* **2003**, *52*, 303-307.
- (33) Chen, C. Y.; Milbury, P. E.; Lapsley, K.; Blumberg, J. B. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J. Nutr.* **2005**; *135* (6), 1366-73.
- (34) Cheikhousman, R.; Zude, M.; Jouan-Rimbaud Bouveresse, D.; Léger, C.; Rutledge, D.; Birlouez-Aragon, I. Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1438-1443.
- (35) Pellegrini, N.; Visioli, F.; Buratti, S.; Brighenti, F. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2532-2538.

**CHAPITRE 3. Evaluation de l'intérêt de la fluorescence frontale
comme outil rapide de suivi de la qualité des noix et graines –
prédiction des composés néoformés**

Article III

**Rapid Assessment of Neofomed Compounds in Nuts and Sesame Seeds by
Front-Face Fluorescence.**

Food Chemistry, 115 (2009) 304–312

**Rita YAACOUB^{a,c,*}, Rachad SALIBA^b, Bilal NSOULI^a, Gaby KHALAF^a, Jad
RIZKALLAH^c and Inès BIRLOUEZ-ARAGON^c**

^a National Council for Scientific Research, Riad El Solh 1107 2260 Beirut, Lebanon

^b Departement of Agro- Food science and Technology, Faculty of Agriculture Sciences, Lebanese
University, Lebanon

^c AgroParisTech, F-75231, Paris Cedex 05, France

* Corresponding author: ritayaacoub@hotmail.com

Lebanese Atomic Energy Comission, Airport Highway, Riad El Solh 1107 2260 Beirut,
Lebanon.

Abstract

The potential of a rapid spectral method, based on front-face fluorescence, to monitor lipid neoformed compounds (NFC) during processing of nuts and sesame seeds was investigated. Fluorescence fingerprints were obtained from front-face fluorescence acquisition directly on crushed nuts and sesame seed samples obtained at different stages of processing. Fluorescence was very sensitive to physicochemical changes induced by the heat process, namely roasting. Parallel factor (PARAFAC) analysis of the fluorescence landscapes revealed four main fluorescence profiles in the nuts, and five in the sesame seeds. These were associated with peptidic tryptophan, tocopherols and process derived products. Various regression models between fluorescence spectra and NFC appearing during the process, carboxymethyllysine (CML) and *trans* fatty acids (tFA) showed good correlations ($R > 0.89$) and satisfactory prediction errors (RMSECV < 1.67). When applied to indicators of lipid peroxidation, good regression models were also obtained allowing prediction of the pAV (p-anisidine value) and TBARS (thiobarbituric acid reactive substances): $R = 0.73$ and 0.96 in nuts and sesame seeds, respectively, with prediction errors lower than 0.78 . This study demonstrates the interest of front-face fluorescence as a promising tool for quality control of nuts and seeds roasting.

Keywords: Fluorescence, PARAFAC, Nuts, Sesame seeds, Lipid oxidation, Carboxymethyllysine, *Trans* fatty acids.

Abbreviations: CML: carboxymethyllysine; EEM: excitation emission matrix; FA: fatty acids; MLR: multiple linear regression; NFC: neoformed compounds; PARAFAC: parallel factor; pAV: *p*-anisidine value; PLS: partial least squares; RMSEC: root mean square error of calibration; RMSECV: root mean square error of cross validation; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; tFA: *trans* fatty acids.

INTRODUCTION

Foods are complex mixtures of chemical constituents which interact during processing leading to oxidation and glycation reactions upon heating. Nuts and sesame seeds are particularly rich in both lipids and proteins; making them very susceptible to oxidation and Maillard reactions during thermal treatment. Consequently, loss of nutritional value, changes in the organoleptic quality and accumulation of NFC (oxidized lipids, *trans* fatty acids and carboxymethyllysine) with possible hazardous biological effects are commonly observed. The growing need for rigorously controlling the nutritional quality and safety of food products, together with the constraints associated with time consuming and expensive conventional methods, have led to a major need for reliable, rapid and non-invasive methods to evaluate Maillard reaction and lipid oxidation progress. In this context, fluorescence spectroscopy seems a promising technique due to its high sensitivity to food physicochemical changes resulting from industrial processing, and particularly suitable to monitor such changes (Rizkallah, Lakhali, & Birlouez-Aragon, 2008). Actually heat treatment applied to food samples induces many changes which strongly impact the global fluorescence fingerprint of the food matrix: on the one hand a decrease in the native fluorescence, due to degradation of some fluorescent constituents (tocopherols and phenols) (Cheikhousman et al., 2005) or modification of their physical environment (tryptophan) (Dufour & Riaublanc, 1997); and on the other hand, a development of neoformed fluorophores, essentially derived from the Maillard reaction (Birlouez-Aragon, Locquet, De St Louvent, Jouan-Rimbaud Bouveresse, & Stahl, 2005) or from lipid oxidation (Liang, 2000).

Several authors have demonstrated that fluorescence is a good indicator of lipid oxidation in food systems. Numerous fluorophores have been obtained following reactions between primary and secondary lipid peroxidation products and primary amines, and a majority of the unsaturated aldehydes formed by lipid peroxidation have been found to be precursors of fluorescent compounds (Esterbauer, Koller, Snee, & Koster, 1986; Melton, 1983). Through investigations on formation of fluorescent oxidation products, a variety of excitation and emission peaks have been reported (Hasegawa, Endo, & Fujimoto, 1992; Kikugawa & Beppu, 1987; Wold & Mielnik, 2000). Fluorescence has been shown as a high sensitive technique for detection of lipid oxidation in pork fat and poultry meat (Olsen, Vogt, Veberg, Ekeberg, & Nilsson, 2005; Wold, Mielnik, Pettersen, Aaby, & Baardseth, 2002), fish (Aubourg, 1999), processed cheese (Christensen, Povlsen, & Sorensen, 2003), milk powders (Liang, 2000), peanuts, oatmeal and muesli (Jensen,

Christensen, & Engelsen, 2004), parma ham (Moller, Parolari, Gabba, Christensen, & Skibsted, 2003) and extra virgin olive oil (Cheikhousman et al., 2005). Fluorescence spectroscopy has also found applicability in monitoring frying oil deterioration by prediction of anisidine values, iodine values and vitamin E (Engelsen, 1997).

Fluorescence has been also used to evaluate the progress of Maillard reaction resulting from thermal treatment of milk (Birlouez- Aragon, Leclère, Ouedraogo, Birlouez & Grongnet, 2001; Kulmyrzaev & Dufour, 2002) and infant formulas (Birlouez-Aragon et al., 2005).

Front-face fluorescence, which does not require any sample preparation, was applied to many food products, including cereal products, poultry meat, milk samples and vegetable oils, to directly monitor the heat process applied or to predict some indicators of the heat treatment (Birlouez-Aragon et al., 2004).

The approach of monitoring oxidation and Maillard products by using front-face spectroscopy is rather novel, and to the best of our knowledge, no such investigations were carried out on sesame seeds, or few on nuts. This paper explores the potential of fluorescence data analysis for predicting quality parameters related to deterioration of lipid rich foods, such as nuts and sesame. In the present study, nuts and sesame seed samples obtained from different stages of manufacture processing were analyzed by front-face fluorescence spectroscopy directly applied on the samples. The underlying fluorescence structure of the fluorescence landscapes was investigated using PARAFAC model. Based on these data, we investigated (1) the potential of front-face fluorescence as a global approach to monitor the physicochemical changes induced by processing; (2) the potential of front-face fluorescence to predict CML and tFA content quantified by chromatographic methods; (3) the suitability of front-face fluorescence for predicting the lipid oxidation process assessed by hydroperoxides, TBARS and pAV.

MATERIALS AND METHODS

Samples and processing conditions

Three types of roasted nuts (almonds and peanuts) commonly consumed in Lebanon and sesame seed products (Tahina) were sampled at different steps of processing in the industrial plant of most representative local manufacturers. The products were processed according to the following manufacturing stages: (1) in nuts: stages A–D (A, raw material; B, roasting; C, seasoning; D, commercial end-product), and (2) in Tahina: stages A–I (A, raw material; B, soaking in water; C,

dehulling; D, soaking in brine; E, drying; F and G, roasting (F: after 15 min of roasting, G: after 2 h of roasting); H, milling; I, sterilized end-product). At the level of the sesame seed roasting step (F), samples were collected every 15 min at three different places of the roaster to take into account the possible heterogeneity of the roaster. Peanuts and almonds were roasted at 180 °C for 10 min and 180 °C for 8 min, respectively.

Manufacture of Tahina

The sesame seeds were sieved then soaked in water for 2 hours. The soaked seeds were stained off and passed through a peeler. The hulls and other foreign materials were separated by soaking in brine (180 – 200 g/l). The seeds were stained off and washed with water to remove the salt. The seeds were then left to dry at ambient temperature and passed through a roaster (115°C for 2 hours) (steam heated jacketed open drum with continuous stirring). The roasted sesame seeds were then sieved and ground by stone mills to a viscous paste which was sterilized (100°C for 30 min), then filled into plastic containers and marketed as Tahina.

Analysis of chemical indicators by conventional methods

Hydroperoxides

Hydroperoxides were analyzed by an indirect colorimetric method (Jiang, Woollard & Wolff, 1990) based on the oxidation of iron(II) to iron(III) by hydroperoxides and subsequent formation of a brown chromophore in the presence of xylenol orange. 100 mg \pm 5 mg of oil extract were diluted in 10 ml propanol-1, then 2400 μ l of this solution was mixed with 600 μ l of a methanolic reaction mixture of xylenol orange and iron(II) sulfate in H₂SO₄ (94%) and BHT (1%), before reaction for 30 min at room temperature. The solution was filtered through a nylon filter (Cluzeau) before reading the absorbance at 560 nm using a Unicam UV-vis spectrophotometer. Quantification used a calibration curve using H₂O₂. Results are expressed as mmol hydroperoxides per 100 mg fat.

p-anisidine value (pAV)

300 μ l of oil extract diluted in propanol (10/90, v/v) was mixed with 1.9 ml p-anisidine solution in propanol (0.039 mol/L) and 0.7 ml glacial acetic acid. Absorbance was measured at 350 nm

using a Unicam UV-vis spectrophotometer. pAV is defined as 100 times the absorbance measured at 350 nm.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS values were determined using the TBA method described by Genot (1996). For extraction, 2 g of the sample was homogenized together with 16 ml of a 5 % (w/v) aqueous solution of trichloroacetic acid (TCA) containing 100 μ L of freshly prepared BHT in ethanol (1 mg/ml) by using a homogenizer set at 20,000 rpm for 15 sec. After filtration, 2 ml extract was mixed with 2 ml of TBA (20 mol/L) in stoppered test tubes, and immersed in a 70°C water bath for 30 min. After cooling, absorbance of the reaction solutions was read at 532 nm using a Unicam UV-vis spectrophotometer against a blank containing 2 ml of TCA and 2 ml of TBA reagent. Results are expressed as mg MDA per kg (or ppm) of food sample using a molar extinction coefficient of $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for malondialdehyde (Buedge and Aust, 1978).

Chemical determination of CML

CML was quantified in the acid hydrolysed samples, after their derivatization using the method validated by Charissou, Ait-Ameur & Birlouez-Aragon (2007). The CML was quantified by selected ion monitoring using a FOCUS GC (Thermo Electron Corporation) gas chromatograph coupled to a PolarisQ ion trap mass detector. The injection was made in the split mode at 250°C. A 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m DB5-MS capillary column was used. The temperature program was as follows: initial temperature, 70°C (2 min holding), raised to 260°C at 5°C / min and further to 290°C at 15°C / min, then isothermal for 5 min. The carrier gas was helium at a flow-rate of 1.5 ml/min. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode at 70 eV. The $m/z= 392$ as a parent ion was isolated using an energy=0.90V. The ions generated were: 374 (25%), 360 (100%), 332 (40%) and 206 (10%). Data were collected and integrated with Xcalibur software (Thermo Electron Corporation).

Chemical determination of trans fatty acids

The *trans* isomers of fatty acids were determined in the oil extracts as their methyl esters by gas chromatography. The preparation of fatty acid methyl esters (FAME) was accomplished using methanolic NaOH (2 mol/L) and methanolic HCL (1 mol/L). Quantitative analysis of FAME was

performed with a gas chromatograph (Perkin Elmer, Autosystem XL) equipped with a flame ionization detector (FID). A BPX 90 capillary column (30 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness) from SGE was used. The temperature program was as follows: initial temperature, 145°C (1 min holding), raised to 170°C at 10°C / min, and was hold for 10 min, before raising further up to 230°C at 15°C / min, then isothermal for 4 min. Injector and detector temperatures were 270 and 280°C respectively. The carrier gas was hydrogen at a flow rate of 0.7 ml/min.

Front-face fluorescence measurements

Fluorescence landscapes were measured directly on the samples without any prior treatment except grinding for nuts. EEMs were measured with a Varian Eclipse Fluorescence Spectrometer equipped with a Xenon lamp source, excitation and emission monochromators and a front-face sample cell holder. The settings for the instrument were: slit widths 5 nm (for both excitation and emission), emission wavelengths 280-700 nm (recorded every 2 nm), excitation wavelengths 280-600 nm (recorded every 8 nm), and scan rate 1200 nm/min. A PMT detector voltage of 550V was used. All samples were analyzed in triplicate on different sides of the cuvette.

Data processing

PARAFAC

PARAFAC models were developed for nuts (data array with 24 samples, 40 excitation wavelengths and 205 emission wavelengths) and sesame seeds (data array with 57 samples, 40 excitation wavelengths and 205 emission wavelengths) separately. Because of computational problems the emission dimension was reduced to the half giving a final data matrix of 24*40*103 and 57*40*103 for nuts and sesame seeds respectively. PARAFAC models with 1-6 components were calculated, using the N-way toolbox5. Non negativity constraint was applied in all 3 modes. All the data in the EEM where the emission is lower than the excitation wavelength was set to zero. Zero values were also inserted in the area covered by the 2nd order Rayleigh scatter line. Missing values were inserted in the area covered by the 1st order Rayleigh scatter line giving a total of 4.85 % of missing values, according to the method of Thygesen, Rinnan, Barsberg & Møller, (2004). The algorithms for the insertion of zeros and missing values were written in-house. The core consistency diagnostic was used as a measure of percentage of agreement of the

PARAFAC models with ideal trilinearity. The number of PARAFAC factors to retain and the validity of the models were assessed through the residual analysis, the appropriateness of the spectral decomposition parameters and the core consistency value. Split-half analysis of PARAFAC models was also performed for validation. The idea of this strategy is to divide the data set into two halves and make a PARAFAC model on both halves. Due to the uniqueness of the PARAFAC model, one will obtain the same result - same loadings in the non-split mode, e.g. excitation and emission mode - on both data sets, if the correct number of components is chosen. The split-half test, based on replicated samples, i.e. not splitting of the repetitions, was performed by calculating PARAFAC models for each half of the data set at a time, subsequently comparing the results and ensuring that more or less identical excitation and emission loadings were obtained.

CML and trans fatty acids calibration

Regression models (MLR and PLS) for nuts and sesame seeds were performed between conventionally determined CML and tFA content and the scores of the PARAFAC factors. Leave-one-out cross-validation was applied throughout this study and only validated results are presented. Correlation coefficient (R) and prediction error expressed as Root Mean Square Error of Cross-Validation (RMSECV) were used to evaluate the regression models quality. Also, PLS regression over chemical indicators values was performed on unfolded fluorescence emission spectra.

Oxidation prediction

To investigate whether fluorescence is able to predict the oxidative status of the samples, MLR models were constructed between PARAFAC scores and content of hydroperoxides and aldehydes (pAV and TBARS) in both nuts and sesame seeds.

Software

Data analyses were performed in MatLab Software (version 7) with the N-way Toolbox and the PLS Toolbox 3.5. In the N-way Toolbox, missing values in the PARAFAC modeling are handled by expectation maximization. No pre-processing of the data was used in PARAFAC. Scaling was performed on the unfolded spectra prior to PLS modeling.

RESULTS AND DISCUSSION

Modifications in the fluorescence fingerprint after processing

The fluorescence landscapes of two almond samples (a: before roasting and b: after roasting) are given in Fig. 1. The two landscapes express very marked differences in fluorescence shape and intensity. The highest fluorescent peak for the raw sample is at excitation 290 nm and emission around 330 nm. These fluorescence characteristics correspond to tryptophan and tocopherols, which are both expected to be present in almonds. This fluorescence emission considerably decreased in the roasted sample. Furthermore, a broad fluorescence band probably corresponding to various fluorophores with excitation maximum around 370 nm and emission maximum around 450 nm appear during roasting. These fluorescent molecules could be associated to NFC arising consecutively to the thermal process.

In Fig. 1, the fluorescence landscapes of sesame seed samples during roasting (a: before roasting, and after b: 30 min, c: 75 min, d: 120 min of roasting) clearly show the progressive development of a fluorescence zone with excitation/emission maxima around 360/450 nm as a function of roasting time. Again, this neoformed fluorescence could be attributed to the heat generated neoformed compounds.

This fluorescence zone corresponds fairly well to heat oxidation products described in the literature (Christensen, 2005). It resembles the fluorophores present in refined oils and the oxidation production derived upon thermal treatment (Sikorska et al., 2004). The same fluorescence was also evidenced to appear in roasted soya proportionally to the heating time, when lipids were present (Birlouez-Aragon et al., 2001). Previous delipidation of the soya before roasting dramatically impeded the formation of this fluorescence (Birlouez-Aragon et al., 2001). We therefore assign this fluorescence in processed nuts and sesame seeds to Maillard products formed between proteins and lipidic secondary aldehydes.

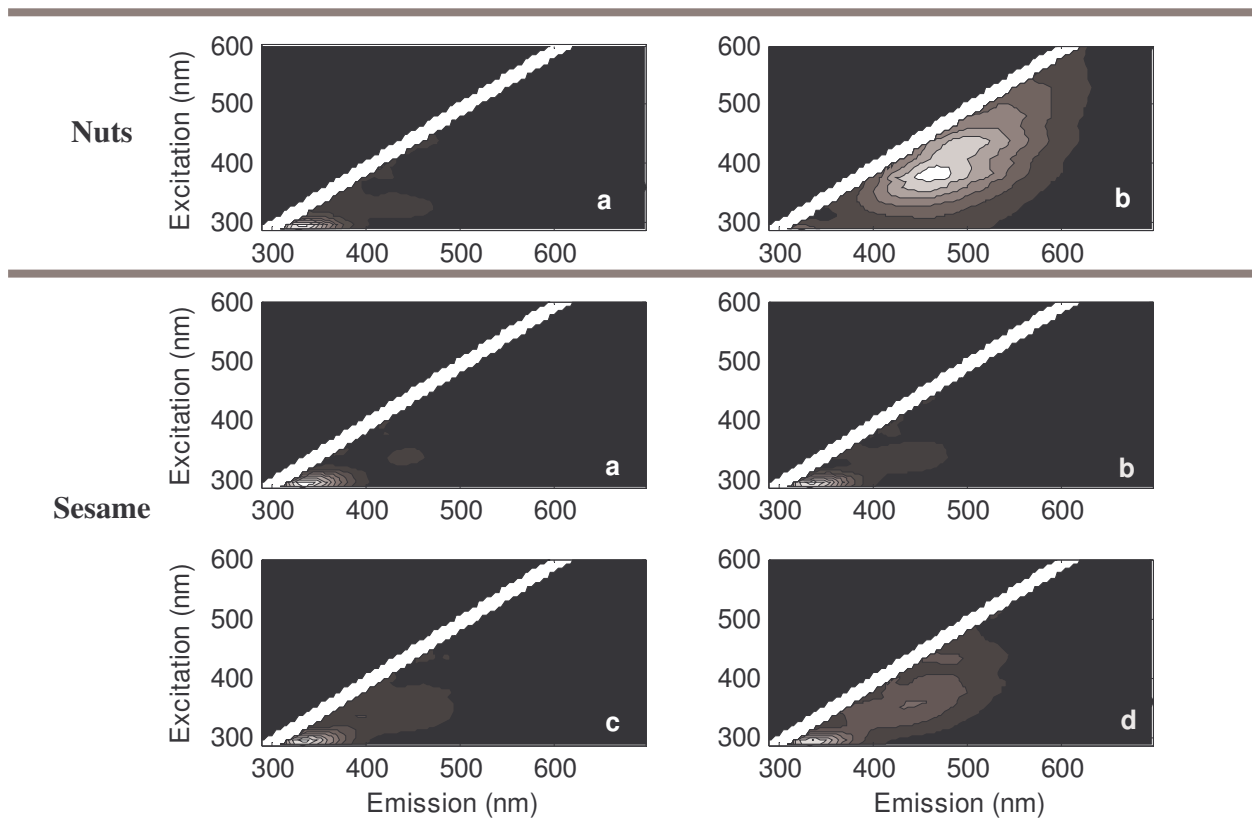


Fig. 1: Contour plot of a fluorescence landscape of almond samples (a) Raw almond sample and (b) roasted almond sample, and sesame seed samples (a) Raw sample, (b) 30 min roasted sample, (c) 75 min roasted sample, and (d) 120 min roasted sample. White indicates the maximum fluorescence intensity. The diagonal white band holds 1st order Rayleigh scatter signal treated as missing values.

PARAFAC results

The aforementioned patterns in the fluorescence landscapes were investigated further by the use of PARAFAC analysis with the objective to resolve the fluorescence signal into individual contributions of fluorescence profiles varying linearly in intensity amongst the samples. The modes 2 and 3 obtained by the PARAFAC decomposition allow describing the emission and excitation profiles of each factor corresponding to homogenous fluorescence profiles composing the three-dimensional fluorescence landscapes.

PARAFAC modelling in nuts

PARAFAC models on fluorescence landscapes of nuts were estimated with one to six factors and compared. Based on core consistency, split-half validation and visual inspection of both the residuals and the loadings, the PARAFAC model with four components, i.e., four different fluorescence profiles, was considered optimal (explained variance 96.6%, core consistency value 84.5) in nuts. The scores (mode 1) and emission/excitation plots (mode 2 and 3) are shown in Fig. 2. The components are displayed in the same order as they are modelled, depending on their contribution to the sample profiles. The excitation and emission maxima of the four PARAFAC components are illustrated in Fig. 2a and b. The 332 nm emission maximum is easily identified in the raw data (Fig. 2), and was attributed to tryptophan and tocopherols, whilst the 444, 488 and 544 nm emission maxima are a part of the broad emission evidenced in the raw data as neofluorescence (Fig. 1). The intensity of these four PARAFAC components can be followed in the score plots (Fig. 2c and d), displaying the distribution of the samples. The score values are plotted in order to easily describe the fluorophores development throughout the processing stages. Thus, tryptophan and tocopherol fluorescence (factor 3) in almonds (c) and peanuts (d) decreased after roasting, whereas the development in NFC fluorescence globally increased immediately after roasting.

PARAFAC modeling in sesame seeds

PARAFAC decomposition of sesame seeds and Tahina fluorescence landscapes was calculated using one to six factors. Based on the same evaluation tools as described before, the PARAFAC model with five components was considered optimal (explained variance 98.3%, core consistency value 52). The scores and loading plots are shown in Fig. 3. The components are displayed in the same order as they are modelled, depending on their contribution to the sample profiles. The intensity of the five PARAFAC components can be followed in the score plots (Fig. 3c and d), displaying the distribution of the samples. In Tahina, similarly as in nuts (Fig. 3c), tryptophan and tocopherol fluorescence decreased throughout the processing steps, whereas NFC fluorescence continuously increased during roasting, except component three with excitation/emission maxima (336/380 nm) which firstly increased till the beginning of roasting and decreased in the late stages of roasting. The same observations were done for sesame seeds roasting (Fig. 3d): NFC fluorescence increased, mainly after 60 min for components 2–4, and 75

min for component 5, with a decrease for component three after 90 min of roasting. This suggests that component 3 is associated with early oxidation and/or Maillard products that decrease as a result of their degradation into more advanced products or due to their reaction with other food constituents, particularly proteins.

The excitation/emission maxima found for the PARAFAC loadings for the models of nuts and sesame seeds are quite similar with small shifts probably due to differences in the physicochemical structure of the various food matrices. We hypothesize that the one extra component at exc/em (336/380 nm) found as transitory fluorescence in sesame seeds but not in nuts could be detected thanks to the small interval sampling performed during the roasting of sesame seeds.

Thus, the results from PARAFAC decomposition applied on both nuts and sesame seeds allowed monitoring the changes in fluorophores that occurred during processing. The decrease in tocopherol fluorescence during roasting is probably due to quenching by absorbing substances formed during lipid peroxidation (aldehydes absorbing at 260–280 nm) (Rovellini, Cortesi, & Fedeli, 1997). Another hypothesis has been suggested to explain such decrease in tryptophan fluorescence. Heat treatment causes partial denaturation of proteins and formation of fluorescent Maillard reaction products. As a consequence of the denaturation, part of the tryptophan environment in the proteins is modified resulting in a decreased tryptophan quantum yield (Dufour & Riaublanc, 1997). The decrease in tryptophan fluorescence could be also due to reabsorption by NFC appearing in the roasted samples and absorbing in the tryptophan emission range (330–360). The observed increase at excitation/emission around 360–370/450 nm is very probably due to reported reactions of malondialdehyde or other lipid derived aldehydes with amino compounds which develop during the heat treatment under aerobic conditions (Kikugawa & Beppu, 1987; Wold & Mielnik, 2000), indicating increased level of lipid oxidation (Hasegawa et al., 1992). Finally, an increase in the fluorescence emission 530–540 nm was also observed in cookies as appearing during baking (Ait Ameer, 2006). No hypothesis on the molecular structure of such fluorophores was proposed, but we suppose from the late appearance of this last fluorescence during the heat treatment that it should be associated to late stage lipid– protein adducts.

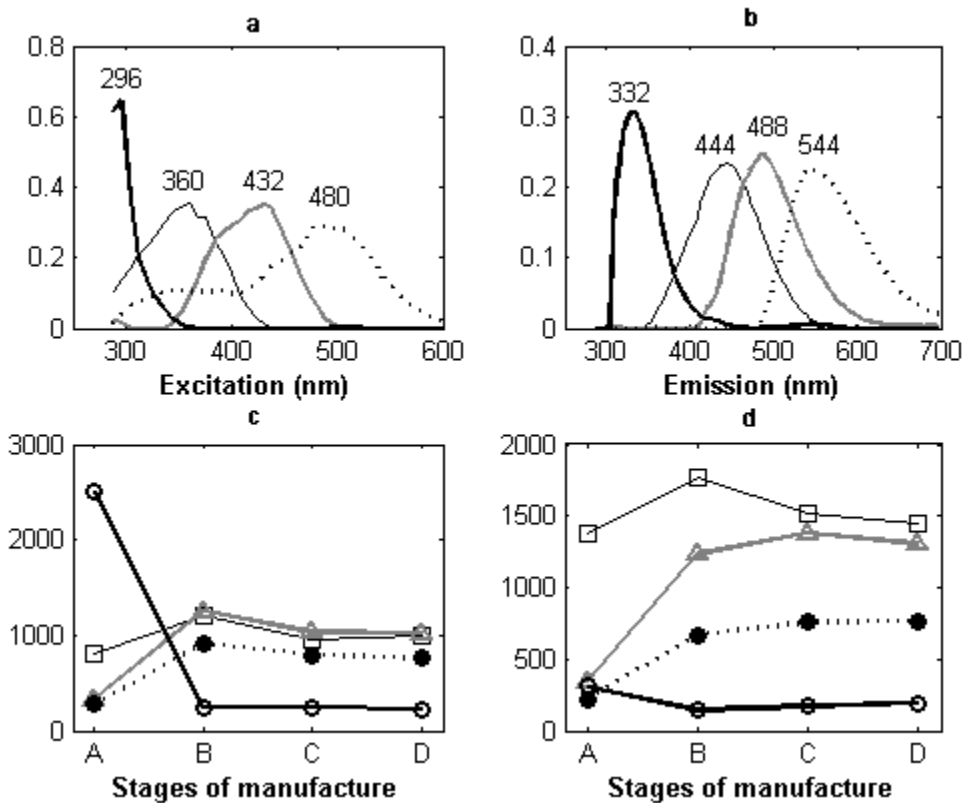


Fig. 2: (a) excitation loadings, (b) emission loadings, (c) scores of almond samples, and (d) scores of peanut samples, of a four component PARAFAC model, based on the fluorescence landscapes of 24 roasted nut samples. Excitation and emission maxima (nm) of each component are displayed. Factor 1 (thin black line), factor 2 (grey line), factor 3 (thick black line), factor 4 (dotted line).

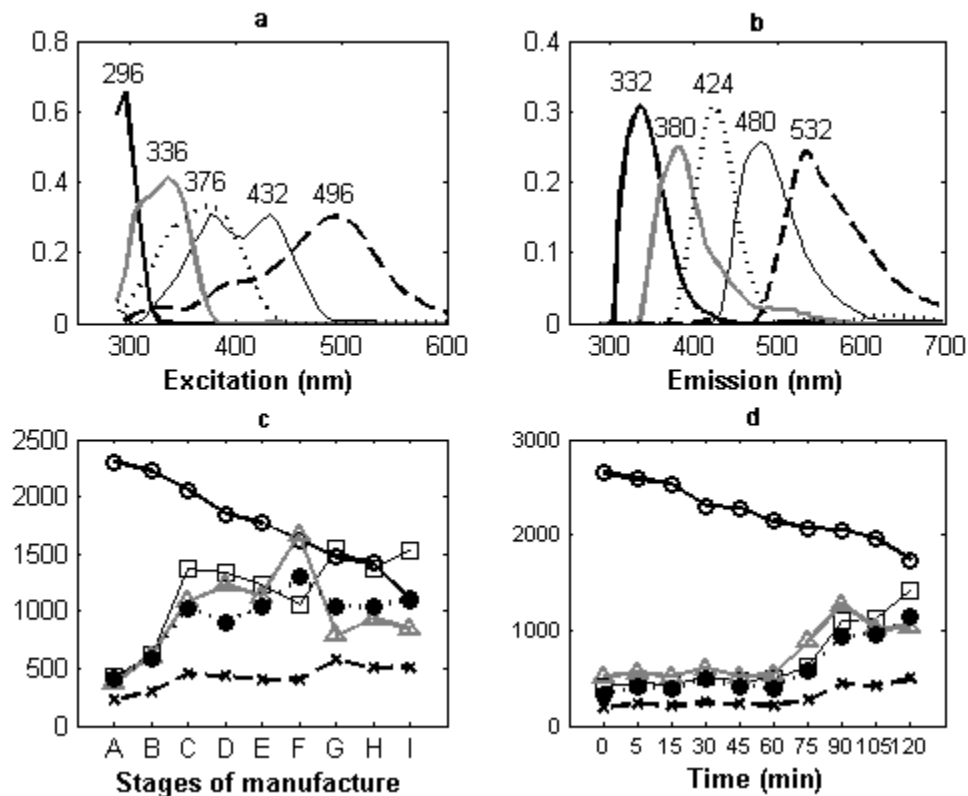


Fig. 3: (a) excitation loadings, (b) emission loadings, (c), scores of tahina samples, and (d) scores of roasted sesame seed samples, of a five component PARAFAC model, based on the fluorescence landscapes of 57 sesame seed samples. Excitation and emission maxima (nm) of each component are displayed. Factor 1 (thick black line), factor 2 (thin black line), factor 3 (grey line), factor 4 (dotted line), factor 5 (dashed line).

CML and tFA calibration

To verify the correlation between CML and fluorescence signal, various regression models were developed. At first, the score values of the PARAFAC components were compared with the conventional determined CML content. MLR was applied to the obtained PARAFAC score vectors (mode 1) in order to predict CML concentrations in nuts and sesame seeds. Regression models employing one of the components at a time show that PARAFAC component 1 in nuts and 4 in sesame seeds, i.e. the fluorescence at (360–375)/(424–440) contributes most to the prediction ability of CML for the nuts ($R = 0.85$) and sesame seeds ($R = 0.93$), confirming the assignment of this PARAFAC component to fluorescent Maillard products formed with similar kinetics as CML. A negative correlation also exists between CML and the fluorescence at

296/332 in both nuts ($R = 0.73$) and sesame seeds ($R = 0.72$). However, the results indicate that the regression model for predicting the CML content from the fluorescence landscapes is optimised by including the other PARAFAC scores in the regression model. Results are shown in Table 1 and Fig. 4. The 4-component PARAFAC model generated from nut samples provided a good correlation ($R = 0.92$) with a prediction error (RMSECV) of 0.56 ng/mg, corresponding to 3.8% of the mean CML content in the nut samples. The 5-component PARAFAC model generated from sesame seed samples provided also a good correlation ($R = 0.95$) with a prediction error (RMSECV) of 0.51 ng/mg, corresponding to 8.2% of the mean CML content in the sesame seed samples. The lower predictive performance of the sesame seeds model compared to the nuts model could be explained by a sample set covering a larger CML concentration area, from 0.5 to 18.6 ng/mg. Thus, by comparing the relative prediction errors in percent calculated as $\text{RMSECV}/\text{range}$, we obtain similar performances for the 2 models estimating the CML (13 and 14% in nuts and sesame seeds, respectively). Similarly, MLR was applied to the obtained PARAFAC score vectors (mode 1) in order to predict tFA concentrations in nuts and sesame seeds. Regression models employing one of the components at a time show that PARAFAC component 4 in nuts and 5 in sesame seeds, i.e., the fluorescence at (480–496)/(532–544), contribute most to the prediction ability of tFA ($R = 0.82$) for both nuts and sesame seeds, which means that tFA, generally associated with severe heat treatment, correlate well with the more advanced oxidation products that fluoresce in this zone. The 4-component PARAFAC model generated from nut samples provided a good correlation ($R = 0.89$) with a prediction error (RMSECV) of 0.2% of total fatty acids (FA), corresponding to 10% of the mean tFA content in the nuts samples (Table 1, Fig. 4a). The 5-component PARAFAC model generated from sesame seed samples provided also a good correlation ($R = 0.94$) with a prediction error (RMSECV) of 0.16% of total FA, corresponding to 12% of the mean tFA content in the sesame seed samples (Table 1, Fig. 4b). In Table 1, the results of different regression models for both CML and tFA are compared based on the correlation coefficients (R), calibration (RMSEC) and prediction (RMSECV) errors. Comparing MLR on PARAFAC scores with PLS regression on PARAFAC scores as well as on unfolded fluorescence spectra in both nuts and sesame seeds, allowed evidencing that PLS regression models performed significantly weaker (higher RMSECV values), compared with the best performing regression MLR model on PARAFAC scores. At the

calibration stage also, the MLR model shows the lowest values for RMSEC. This indicates that the MLR model also fits the data optimally.

Table 1 Results from different regression models on CML and tFA content of nuts and sesame seed samples.

<i>Data set</i>	<i>Method</i>	<i># comp^a</i>	<i>R^b</i>	<i>RMSEC^c</i>	<i>RMSECV^d</i>	<i>Y-mean^e</i>	<i>Y-range^f</i>
Nuts (CML) N=18	MLR on PARAFAC scores 1-4	4	0.92	0.40	0.56	14.6	12.7-16.9
	PLSR on PARAFAC scores 1-4	2	0.91	0.59	0.67		
	PLSR on unfolded emission spectra	3	0.87	0.72	0.92		
Nuts (tFA) N=18	MLR on PARAFAC scores 1-4	4	0.89	0.18	0.20	2	1.3-2.7
	PLSR on PARAFAC scores 1-4	2	0.86	0.22	0.26		
	PLSR on unfolded emission spectra	2	0.78	0.28	0.31		
Sesame seeds (CML) N=36	MLR on PARAFAC scores 1-5	5	0.95	1.23	0.51	6.2	0.5-18.6
	PLSR on PARAFAC scores 1-5	3	0.95	1.31	1.48		
	PLSR on unfolded emission spectra	3	0.94	1.39	1.67		
Sesame seeds (tFA) N=21	MLR on PARAFAC scores 1-5	5	0.94	0.12	0.16	1.3	0.3-1.8
	PLSR on PARAFAC scores 1-5	2	0.90	0.20	0.22		
	PLSR on unfolded emission spectra	2	0.91	0.20	0.24		

^a Optimal number of components in the model

^b Correlation coefficient

^c Root Mean Square Error of Calibration, expressed in ng/mg for CML and % of total FA for tFA

^d Root Mean Square Error of Cross Validation, in ng/mg for CML and % of total FA for tFA

^e Mean concentration in the sample set, expressed in ng/mg for CML and % of total FA for tFA

^f Range of the concentration in the sample set, expressed in ng/mg for CML and % of total FA for tFA

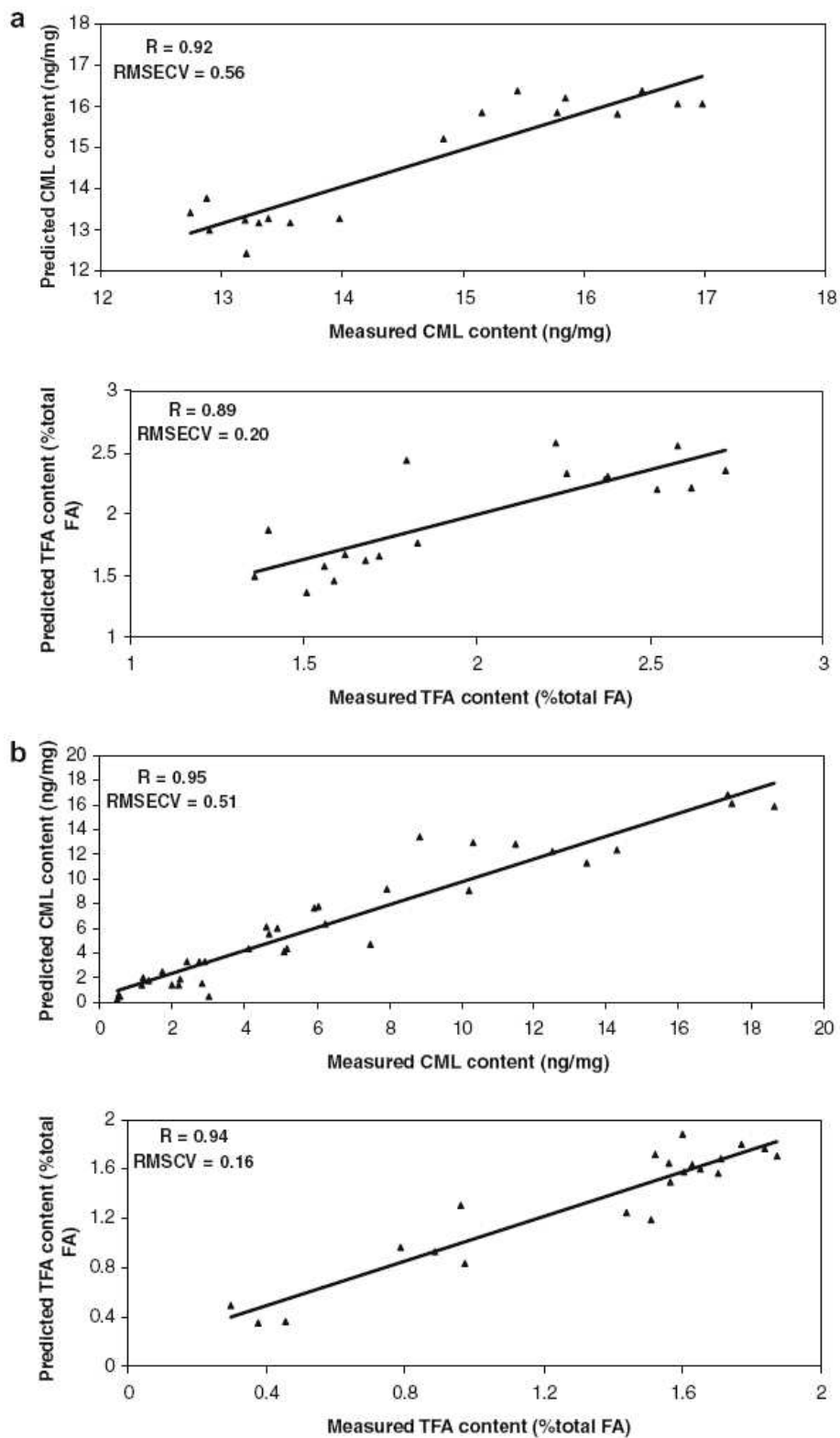


Fig. 4: Predicted versus measured CML and tFA content of a) nuts and b) sesame seeds, based on MLR model on PARAFAC scores. The correlation coefficient (R) and prediction error (RMSECV) are reported.

Front-face fluorescence in the monitoring of oxidation

Univariate correlations between PARAFAC components and reference measurements of lipid oxidation showed that TBARS and pAV are mainly correlated with the PARAFAC component associated with the fluorescence at 360/440 in both nuts and sesame seeds, confirming assignment of this PARAFAC component to products from reactions of secondary aldehydic oxidation products with peptide amino groups.

The results of the calculated MLR models on PARAFAC scores are listed in table 2. They clearly show that prediction of oxidation by fluorescence results in the highest correlations for sesame seeds when using this specific fluorescence ($R = 0.96$; $RMECV = 10$ and 8% respectively). For nuts, models performed poorer, with prediction errors of 22 and 19% for pAV and TBARS respectively. In the conditions used in this study, hydroperoxides were only formed transiently (data not shown). Consequently, there was no good correlation found between hydroperoxide concentrations and fluorescence spectra. The correlations obtained between TBARS and fluorescence were similar to those reported by others on meat products (Wold et al., 2002; Gatellier, Gomez, Gigaud, Berri, Le Bihan-Duval & Santé-Lhoutellier, 2007). A satisfactory correlation ($R^2=0.73$) was also found between free radicals, an indicator of early oxidation, and fluorescence landscapes in peanuts (Jensen et al., 2004). These results show that fluorescence spectra associated with PARAFAC decomposition could be used to monitor the oxidative degradation of nuts and sesame seeds during their processing.

Table 2 Results from MLR models between PARAFAC scores and oxidation determinants of nuts and sesame seed samples.

<i>Data set</i>		<i># comp^a</i>	<i>R^b</i>	<i>RMSEC^c</i>	<i>RMSECV^d</i>	<i>Y-mean</i>	<i>Y-range</i>
Nuts N=24	pAV	4	0.73	0.64	0.78	6.03	4.3-7.8
	Hydroperoxydes	4	0.52	0.34	0.8	1.47	0.07-3.15
	TBARS	4	0.73	0.54	0.66	2.82	1.2-4.6
Sesame seeds N=30	pAV	5	0.96	0.15	0.18	7.5	6.8-8.6
	Hydroperoxydes	5	0.70	0.31	0.39	2.6	1.6-3.5
	TBARS	5	0.96	0.05	0.06	2.17	1.8-2.5

^a Optimal number of components in the model

^b Correlation coefficient in prediction

^c Root Mean Square Error of Calibration

^d Root Mean Square Error of Cross Validation

CONCLUSION

This exploratory study was dedicated at demonstrating the potential of fluorescence spectroscopy in combination with chemometrics for monitoring of lipid oxidation and NFC during nuts and sesame seeds processing. The technique appears highly satisfactory with prediction errors lower than 10% in most cases. Moreover, this innovative method is fast and nondestructive and could be applied online to control the roasting process. The fluorometric analysis reveals information about the molecular changes occurring in these food products when exposed to heat treatment. PARAFAC analysis provides a unique mathematical decomposition of four fluorescent compounds present in nuts and five in sesame seed samples, all showing a change in the fluorescence signal throughout the processing stages. Front-face fluorescence spectroscopy appears a very sensitive technique for determining lipid oxidation products, as well as CML and tFA in nuts and sesame seeds. Whereas the determination of CML content from the fluorescence spectra can be explained by indirect correlation with the fluorescence of advanced Maillard products emitting in the 420–440 nm region, the correlation between the fluorescence spectra at 520 nm and the tFA content is more difficult to explain.

We can hypothesise that tFA and fluorophores emitting at 520 nm are formed with parallel kinetic rates during nut and seed roasting.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Lebanese National Council for Scientific Research.

REFERENCES

- Ait Aneur, L. (2006). Evolution de la qualité nutritionnelle des protéines de biscuits modèles au cours de la cuisson au travers d'indicateurs de la réaction de Maillard: intérêt de la fluorescence frontale. *PhD thesis*, Institut National Agronomique Paris Grignon, France (<http://pastel.paristech.org/2269>).
- Aubourg, S. P. (1999). Recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (4), 409-419.
- Birlouez-Aragon, I., Leclère, J., Ouedraogo, C. L., Birlouez, E., & Grongnet, J. F. (2001). The FAST method, a rapid approach of the nutritional quality of heat-treated foods. *Nahrung/Food*, 45 (3), 201-205.

- Birlouez-Aragon, I., Locquet N., De St Louvent, E., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D. & Stahl P. (2005). Evaluation of the Maillard reaction in infant formulas by means of front face fluorescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 308-318.
- Birlouez-Aragon, I., Mas, P. A., Ait Ameer, L., Locquet, N., De St Louvent, E. & Zude, M. (2004). Fluorescence Fingerprints as a Rapid Predictor of the Nutritional Quality of Processed and Stored Foods. *Czech Journal of Food Science*, 22, 68-71.
- Buedge, J.A. & Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In Fleisher S.F. & Packer L., *Biomembranes (Part C: Biological Oxidation)*, *Methods in Enzymology*, vol. 52 (pp. 302-309). London: Academic Press.
- Charissou, A., Ait-Ameer L., Birlouez-Aragon, I., Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1140 (1-2), 189-194.
- Cheikhousman, R., Zude, M., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Léger, C., Rutledge, D. & Birlouez-Aragon, I. (2005). Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1438-1443.
- Christensen, J. (2005). Autofluorescence of intact food – An exploratory multiway study. *PhD thesis*, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.
- Christensen, J., Povlsen, V. T. & Sorensen, J. (2003). Application of fluorescence spectroscopy and chemometrics in the evaluation of processed cheese during storage. *Journal of Dairy Science*, 86, 1101–1107.
- Dufour, E. & Riaublanc, A. (1997). Potentiality of spectroscopic methods for the characterization of dairy products. II-Mid infrared study of the melting temperature of cream triacylglycerols and of the solid fat content in cream. *Lait*, 77 (6), 671-681.
- Engelsen, S. B. (1997). Explorative spectrometric evaluations of frying oil deterioration. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 74 (12), 1495-1508.
- Esterbauer, H., Koller, E., Snee, R. G. & Koster, J. F. (1986). Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Biochemical Journal*, 239, 405-409.

- Gatellier, P., Gomez, S., Gigaud, V., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., & Santé-Lhoutellier, V. (2007). Use of a fluorescence front face technique for measurement of lipid oxidation during refrigerated storage of chicken meat. *Meat Science*, 76, 543-547.
- Genot, C. (1996). Some factors influencing TBA test. In *Report of diet-ox project (AIRIII-CT-92-1577)*.
- Hasegawa, K., Endo, Y. & Fujimoto, K. (1992). Oxidative deterioration in dried fish model systems assessed by solid sample fluorescence spectrophotometry. *Journal of Food Science*, 57, 1123-1126.
- Jensen, J. N., Christensen, J. & Engelsen, S. B. (2004). Oxidative changes in in pork scratchings, peanuts, oatmeal, and muesli viewed by fluorescence, near-infrared and infrared spectroscopy. *European Food Research Technology*, 219, 294-304.
- Jiang Z.E., Woollard A.C.S. & Wolff S.P. (1990). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method, *Lipids*, 26 (10), 853-856.
- Kikugawa K. & Beppu M. (1987). Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross linked proteins. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 277-296.
- Kulmyrzaev, A. & Dufour, E. (2002). Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy. *Lait*, 82, 725-735.
- Liang, J. H. (2000). Kinetics of fluorescence formation in whole milk powders during oxidation. *Food Chemistry*, 71, 459-463.
- Melton S. L. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle food. *Food Technology*, 37, 105-111.
- Moller, J. K. S., Parolari, G., Gabba, L., Christensen, J. & Skibsted, L. H. (2003). Monitoring chemical changes of dry-cured parma ham during processing by surface autofluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5 (5), 1224-1230.
- Olsen, E., Vogt, G., Veberg, A., Ekeberg, D. & Nilsson, A. (2005). Analysis of early lipid oxidation in smoked, comminuted pork or poultry sausages with spices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 7448-7457.
- Rizkallah, J., Lakhal, L. & Birlouez-Aragon, I. (In press). Chapter four: *Fluorescence in Optical Monitoring of Fresh and Processed Agricultural Crops (Basics and Applications for a*

better Understanding of Non-Destructive Sensing). Editor Zude, M. Publisher CRC Press, USA.

- Rovellini, P., Cortesi, N. & Fedeli, E. (1997). Ossidazioni dei lipidi. Nota 1. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 74 (5), 181-189.
- Sikorska, E., Romaniuk, A., Khmelinskii, I. V., Herance, R., Bourdelande, J. L., Sikorski, M. & Koziol, J. (2004). Characterization of edible oils using total luminescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 14 (1), 25-35.
- Thygesen, L. G., Rinnan, A., Barsberg, S. & Møller, J. K. S. (2004). Stabilizing the PARAFAC decomposition of fluorescence spectra by inserting zeros outside the data area. *Chemometrics and Intelligent Laboratory systems*, 71, 97-106.
- Wold, J. P. & Mielnik, M. (2000). Nondestructive assessment of lipid oxidation in minced poultry meat by autofluorescence spectroscopy. *Journal of Food Science*, 65, 87-95.
- Wold, J. P., Mielnik, M., Pettersen, M. K., Aaby, K. & Baardseth, P. (2002). Rapid assessment of rancidity in complex meat products by front face fluorescence spectroscopy. *Journal of Food Science*, 67, 2397-2404.

**CHAPITRE 4. Evaluation de l'exposition aux composés néoformés
via la consommation des noix et graines transformés – Niveaux de
contamination des produits de commerce – Modalités des
consommations**

Article IV

Dietary Exposure to Neofomed Compounds of an Adult Urban Population in Lebanon through Consumption of Processed Nuts and Sesame Seeds

Rita YAACOUB^{a,d}, Rachad SALIBA^b, Bilal NSOULI^a, Gaby KHALAF^a, Lara NASREDDINE^c, and Inès BIRLOUEZ-ARAGON^d

^a National Council for Scientific Research, Lebanon

^b Departement of Agro- Food science and Technology, faculty of agriculture sciences, Lebanese University, Lebanon

^c American University of Beirut, Lebanon

^d AgroParisTech, France

Abstract

The present study aims at evaluating the dietary exposure of an adult urban population to neoformed compounds (CML and tFA) through the consumption of processed nuts and sesame seed products. Exposure assessment was performed by means of the selective diet study approach on a representative population of Lebanon, which is well known to include a large part of nuts in their diet. First, the current levels of CML and tFA were determined in commercial nuts and sesame seed products samples. CML content of commercial products ranged between 14 and 18 ng/mg of nuts and tFA between 0.56 and 0.82 g/100 g as average. These tFA levels were, in general, lower than maximum levels proposed by the Danish and Canadian legislation (2g/100 mg of fat), except for pistachio samples for which tFA values reached this limit. Lipid oxidation products measured as p-anisidine and TBARS values were detected in commercial products and increased after 3 months of storage at ambient temperature, whereas CML and tFA contents were stable over this period. Analysis of the consumer typology highlighted the importance of factors such as sex, age, marital status and professional activity in explaining eating patterns regarding nuts and sesame consumption. Four meaningful consumer groups were identified on the basis of consumption levels of various food products: roasted nut eaters, roasted seeds eaters, plain tahina based dishes eaters and sweet tahina based dishes eaters. The estimated average daily exposure to CML and tFA through overall nut and sesame seed products consumption was found to be about 0.77 mg/person/day and 0.33 g/person/day respectively. When compared with levels of concern selected for this study (6 mg/day for CML and 5 g/day for tFA), the average dietary intakes of CML and tFA represented 13 and 7% respectively of the appropriate levels of concern. At the 95th percentile, CML and tFA exposure estimates were 6.15 mg/day and 2.94 g/day respectively. The results indicate a potential risk for the high consumers of roasted nuts and sesame seeds and suggest the necessity for a more detailed investigation of exposure to NFC and potential cardiovascular risk.

Keywords: Neoformed compounds; Carboxymethyllysine; trans fatty acids; exposure assessment; consumption patterns; nuts; sesame seeds.

INTRODUCTION

Lebanon is a highly urbanized Mediterranean country with an estimated population of about 4 million and with 40% of its population living in the capital Beirut, considered to be the melting pot of the country. The Lebanese traditional diet constitutes an intangible cultural heritage and has been described as a healthy dietary pattern. It is a collection of minimally processed vegetarian recipes, in addition to an abundance of fruits, vegetables, cereals, legumes, nuts and seeds (Hwalla & El Khoury, 2007). For most Lebanese, nuts and sesame seed products are not only perceived as an occasional or snack food but a food consumed consistently as part of meals. Since ancient times, nuts and oil seeds have been considered healthful foods worldwide. Since recent years, there is increasing evidence that diets that include nuts may be beneficial in decreasing the risk of chronic diseases, namely cardiovascular disease (Fraser, 1999), colon cancer (Jenab et al., 2004) and type-II diabetes (García-Lorda et al., 2003). However, nuts and sesame seeds are mostly consumed as processed foodstuffs, mainly in the roasted form. Because nuts and sesame seeds contain high amounts of unsaturated fatty acids, making them very sensitive to oxidation, processing as a result of thermal treatment will cause chemical changes that may adversely affect the nutritional value and lead to the formation of potentially toxic compounds, namely lipid oxidation products, carboxymethyllysine (CML) and trans fatty acids (tFA) (Yaacoub et al., 2008). All these compounds were described as possibly exerting adverse effects in humans. Advanced peroxidation products have been described as cytotoxic and proatherogenic (Addis, 1986). *Trans* fatty acids are considered to alter the HDL/LDL ratio, increasing the cardiovascular risk, and to affect intrauterine human growth (Léger & Razanamahefa, 2005). CML, an advanced glycoxidation endproduct (AGE) considered to be the most pertinent indicator of dietary as well as endogenous exposure to NFC because of its stability, has been found to promote oxidative stress and microinflammation as a result of its interaction with the receptors for advanced glycation end products (Wautier et al., 1996). Human studies confirmed that about 10% of diet-derived AGEs are absorbed and correlate with circulating and tissue AGE levels (Koschinsky et al., 1997). In a recent clinical study, the bioavailability of dietary CML was clearly demonstrated and correlations between biological Maillard product levels, including CML, and metabolic variables suggested a rapid and significant negative bioactivity of such compounds (Saavedra et al., 2008; Lecerf et al., 2008).

In a previous study (Yaacoub et al., 2008), we have shown that nuts and sesame seed processing induced significant lipid peroxidation and formation of neoformed compounds (NFCs), such as CML and tFAs. Indeed, these compounds were present in significant amounts in the end-product implying that attention should be paid for their occurrence in these products. Consequently, we found it relevant to determine the concentrations of NFC in commercial products in order to evaluate the possible risk of processed nuts and sesame seed consumption. Moreover, we studied the fate of these NFC in the commercial products after 3 months of storage at ambient temperature. An individual dietary intake survey specific of the studied food products was also conducted to investigate, measure and assess the nut and sesame seed product consumption patterns of the adult population living in Beirut. We applied PCA and cluster analysis in order to identify dietary patterns and segregate subjects on the basis of similarities in their usual nut and sesame seed product consumption. The influence of selected variables, such as sex, age, marital status and professional activity on such consumption were evaluated.

Exposure assessment is a key part of the risk assessment process. Only intake of toxicologically significant amounts can lead to adverse health effects even for a relatively toxic substance. The Codex Alimentarius Commission Procedural Manual (Codex Alimentarius Commission, 2006) defines exposure assessment as “the qualitative and/or quantitative evaluation of the likely intake of biological, chemical, and physical agents via food as well as exposures from other sources if relevant”. Dietary exposure assessment studies combine food consumption data with data on the concentration of chemicals in food. The resulting dietary exposure estimate is then compared with the relevant toxicological or nutritional reference value for the food chemical of concern. The aim of this paper was to assess the actual intake of CML and tFA for an urban adult population living in Beirut, Lebanon, through the consumption of processed nuts and sesame seed products (mainly tahina). Dietary exposure was obtained by combining food consumption data with CML and tFA levels determined by chemical analysis, and then compared to the levels of concern for each molecule (6 mg CML/day and 5 mg tFA/day).

MATERIALS AND METHODS

Collection and purchase of food samples

Major product brands were taken into account in planning the food samples to be purchased. Representative samples were randomly collected from the major large supermarkets in the city of

Beirut, and analyzed for lipid oxidation products, CML and tFA. Multiple samples of the same food purchased across the market are composited so as to get as representative a sample as possible. Thus, for each food type, five different brands were collected. For each brand, seven samples from different supermarkets were collected and pooled together. The samples were pooled by weighing equally sized samples from each subsample.

Survey design

Study population characteristics

A cross sectional dietary survey was conducted in Beirut and its nearest suburbs, between January 2006 and April 2006. Four hundred adults between the age of 25 and 64 years were surveyed. The sample was composed of 209 women (52.2%) and 191 men (47.8%). Four age groups were selected for the study: 25-35, 35-44, 45-54 and 55-64 years. The subjects were chosen to reflect the distribution of the baseline population of Beirut according to the household budget survey (HBS) (Lebanese Central Administration for Statistics, 1998). Thus, quota sampling procedure with sex and age as the main quota control variables was applied. In the absence of a sampling frame for the country, the area surveyed was stratified into 40 units based on the administrative classification of the city and its suburbs. Respondents were recruited at home during a door-by-door walking route procedure with random selection, until the envisaged gender-age quotas were met. The sample covered a wide range of subjects in terms of socio-demographic characteristics such as marital status, employment status and occupation. The sample socio-demographic characteristics are given in table 1.

Food consumption and dietary assessment method

Food consumption was assessed by means of a quantitative food frequency questionnaire (QFFQ), which was designed to estimate food intake of the selected foods over the past year. It consisted of a list of 13 food items as normally consumed and included a number of composite dishes that contain tahina (sesame paste) as ingredient. These included *Hommos tahina* (T1), *Baba ghannouj* (T2), *taratour sauce* (T3), *dibs tahina* (T4), *moufatta* (T5), *Halawa* (H), roasted almonds (GO1), roasted pistachios (GO2), roasted peanuts (GO3), roasted pumkin seeds (GO4), roasted sunflower seeds (GO5), roasted melon seeds (GO6) and mixed nuts (GO7). A reference portion, expressed in household measures, was specified for each item in the QFFQ.

The individual was asked to estimate the frequency he/she consumes this particular food product (at least once per day, 2-3 times per week, 4 times per month, less than 2 times per month, or never) and the amount usually eaten per food item by making comparisons with the specified reference portion. Common household measures, measuring caps, spoons or even photographs were shown to assist the individual in the estimation process. The household measures were converted into grams in order to assess the daily intake in grams. To take account of the recipes composition, conversion factors were used to transform the weight of mixed dishes prepared from tahina as ingredient into the weight of this single ingredient for which contamination data was obtained. Participants were also asked to provide some socio-demographic information. Finally, the objective of the survey was not revealed to respondents in order to avoid biased responses.

Table 1 Sample characteristics (% , n = 400)

Demographic characterization	Respondents	
	Men	Women
Age (years)/sex		
25-34	17.0	17.5
35-44	11.8	14.8
45-54	10.3	11.5
55-64	8.8	8.5
Marital status	All	
Single	35.5	
Married	64.5	
Employment status/occupation	All	
Worker / employee	17.3	
Artisan / shopkeeper / farmer	19.8	
Senior technician / teacher / company owner	14.8	
Professor / senior official / liberal profession	9.8	
Seeking employment	5.0	
Housewife	23.3	
Retired	3.0	
Student	7.0	

Contamination data

Oxidation assessment

p-Anisidine Value

The pAV was measured according to the method described by Labrinea et al. (2001). A quantity of 1 g of oil extract was dissolved with 15 mL of propanol. A 300 μ L sample of this solution was

mixed with 1.9 mL of *p*-anisidine solution in propanol (0.039 mol/ L) and 0.7 mL of glacial acetic acid. The absorbance was measured at 350 nm using a Unicam UV-vis spectrophotometer. The pAV is defined by convention as 100 times the absorbance measured in a 1 cm cuvette of a solution resulting from the reaction of 1 g of fat with a 100 mL mixture of solvent and reagent.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances

TBAR values were determined using the TBA method described by Genot (1996). For extraction, 2 g of the sample was homogenized together with 16 mL of a 5% (w/v) aqueous solution of trichloroacetic acid (TCA) containing 100 μ L of freshly prepared BHT in ethanol (1 mg/mL) by using a homogenizer set at 20 000 rpm for 15 s. After filtration, 2 mL of extract was mixed with 2 mL of TBA solution (20 mol/L) in stoppered test tubes, and the test tubes were immersed in a 70 °C water bath for 30 min and then rapidly cooled in ice. After cooling, the absorbance of the reaction solutions was read at 532 nm using a Unicam UV-vis spectrophotometer against a blank containing 2 mL of TCA and 2 mL of TBA reagent. The results are expressed as milligrams of MDA equivalents per kilogram (or parts per million) of food sample using a molar extinction coefficient of 1.56×10^5 M⁻¹cm⁻¹ for malondialdehyde. The sensitivity of the method is 0.37 mg of MDA equiv/kg of food sample.

Analysis of trans fatty acids

Fatty acids and their *trans* isomers were determined in the oil extracts as their methyl esters by gas chromatography. For the preparation of fatty acid methyl esters (FAMES), 50-100 mg of extracted oil were accurately weighed and treated with 0.2 mL of methanolic NaOH (2 mol/L) in stoppered tubes under vigorous agitation after addition of 1 mL of heptane containing the internal standard heptadecanoic acid (1.91 mg/mL). The tubes were then heated at 50 °C in a water bath for 20 s and shaken for 10 s. A 400 μ L portion of methanolic HCl (1 mol/L) was added, and the tubes were shaken vigorously and left to stand until separation of the layers. The FAME-containing supernatant was diluted 15 times and transferred to glass vials for further analysis. Quantitative analysis of FAMES was performed with a gas chromatograph (Perkin-Elmer, Autosystem XL) equipped with a flame ionization detector (FID). A BPX 90 capillary column (30 m length \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m film thickness) from SGE was used. The temperature program was as follows: initial temperature 145 °C (1 min holding), raised to 170 at 10 °C/min,

held for 10 min, raised further to 230 at 15 °C/min, and then held for 4 min. The injector and detector temperatures were 270 and 280 °C, respectively. The carrier gas was hydrogen at a flow rate of 0.7 mL/min. All samples were injected in duplicate. Chromatograms were recorded using ChromQuest software. Methyl esters were identified by comparing their retention times to those of a FAME mix purchased from Sigma. Additionally, *trans*-octadecenoic acid (elaidic acid) and *cis,trans*-9,12- and *trans,trans*-9,12-octadecadienoic acid were purchased from Alltech. Fatty acid methyl esters in the samples were quantified by comparing the area under their peaks in the chromatogram to that of methyl heptadecanoate (derived from the internal standard).

CML quantification

CML was quantified by GC-MS-MS according to the method of Charissou et al. (2007), after methylation of the carbonyl groups and acylation of the amine residues. The solid food samples were crushed, homogenized, and then defatted with two successive extractions by a hexane/methanol (2/1, v/v) solution. The samples were hydrolyzed in 6N HCl at 110 °C for 18 h. The hydrolyzed samples were derivatized after addition of the internal standard cycloleucine (CL) (10 µg/100 mg of sample) by thionyl chloride in methanol. The CML was quantified by selected ion monitoring using a FOCUS GC (Thermo Electron Corp.) gas chromatograph coupled to a PolarisQ ion trap mass detector. The injection was made in the split mode at 250 °C. A 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm DB5-MS capillary column was used. The temperature program was as follows: initial temperature 70 °C (2 min hold), raised at a rate of 5 °C/min to 260 °C and further at a rate of 15 °C/min to 290 °C, and then held for 5 min.

The carrier gas was helium at a flow rate of 1.5 mL/min. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode at 70 eV. $m/z = 392$ as a parent ion was isolated using an energy of 0.90 V. The ions generated were $m/z = 374$ (25%), 360 (100%), 332 (40%), and 206 (10%). Data were collected and integrated with Xcalibur software (Thermo Electron Corp.). The limits of quantification are 0.3-0.9 ng/mg of dry matter.

Dietary CML and tFA exposure estimates

CML and tFA exposure distributions were estimated by multiplying the respective average measured concentrations by the reported consumption level for each surveyed individual. Risk

assessment was conducted for the population by comparing CML and tFA exposure distributions to levels of concern. The exposure results were reported as mg CML/day and g tFA/day.

Data analysis

Analysis of variance (ANOVA) was conducted on contamination data for calculating mean differences and standard deviation, with P-values of less than 0.05 considered significant. All contamination analyses were performed in triplicate.

In order to describe the patterns of consumption, a typology of consumers was conducted. This involved a principal component analysis (PCA) with Varimax rotation applied on food consumption data in order to aggregate specific food groups based on the degree to which food items in the data set are correlated with one another, followed by a hierarchical ascending classification (HAC) on factor scores obtained from PCA in order to identify homogeneous groups (clusters) of consumers showing similarities in their consumption patterns. HAC was based on Ward's method and Euclidean distance. The chi-square statistic was used for testing the significance of differences between subgroups of population, and ANOVA test to identify the food consumption values that characterized each cluster. Mann-Witney and kruskal-Wallis tests were used to test the significance of differences between the exposure of the different subgroups of the population to CML and tFA according to sex and age. Statistical analysis was carried out using XLSTAT version 2009.4.02.

RESULTS AND DISCUSSION

Consumer typology (dietary profiles)

The basis of the typology was the results of the principal component analysis. PCA was first applied to identify a smaller number of groups of interrelated food categories. The scree plot suggested a three factor solution when retaining factors of eigenvalues larger than 1. However, following the criterion that the total variance explained should be more than 60%, we have retained 4 factors. The four factors that were extracted explained 62% of the variation in the 13 dietary variables. Table 2 shows the correlation of the variables with the 4 selected factors after Varimax rotation. The first factor was most strongly related to the intake of roasted nuts (GO1, GO2, GO3, and GO4), the second to roasted seeds (GO4, GO5, and GO6), the third factor was related to sweet tahina based foods (T4, T5, and H), and the fourth to plain tahina based dishes

(T1, T2, and T3). These results indicate that consumption patterns within each food type (nuts, seeds, sweet tahina dishes and plain tahina dishes) are similar. Subsequently, the factor scores were used in the cluster analysis. The dendrogram based on hierarchical cluster analysis revealed 4 distinct groups of consumers (Figure 1). The consumption of different food types in the final four clusters is presented in Figure 2. Individuals belonging to cluster 1 had a high consumption of roasted seeds. Cluster 2 had a relatively high consumption of roasted nuts. The consumption of plain tahina based dishes peaked among those of cluster 3. Finally, a high consumption of sweet tahina based food preparations was the striking feature of those belonging to cluster 4. These results were confirmed by the examination of the centroids defining each cluster. Now, we would like to know what socio-demographic features typify each of the four consumer clusters. Cluster 1 (roasted seeds) was characterized by a significant majority of married women, which are mainly housewives, belonging to the age groups 1 and 2 (25-34 and 35-44 years old). The age group 4 (55-64) was not represented in this cluster. Cluster 2 (roasted nuts) was characterized by a majority of women, belonging to the age group 25-34 years old and exerting a professional activity of senior technician, teacher or company owner. There was no significant difference of the women's marital status in this cluster, and age group 4 (55-64 years old) was not represented. Cluster 3 (plain tahina based dishes) was characterized by young adult men (25-34 years old). Differences in marital status and professional activity were not significant for this cluster. A majority of married older adults (55-64 years old), both of men and women, characterized cluster 4 (sweet tahina based dishes), where the frequency of consumers increased with age. Housewives and retired individuals prevailed in this cluster. In sum, the features of the consumer clusters are supportive to what it is expected: the prevalence of roasted nut consumption is high among consumers that have high socio-economic status since roasted nuts are considered as relatively expensive products. On the other hand, the prevalence of sweet tahina based dishes is high among old adults since these products are considered typically traditional food. Finally, consumption of roasted nuts and seeds is low among old adults (55-64 years old) since chewing ability of these consumers may be impaired by their dental status.

Table 2. Correlations between variables and factors after Varimax rotation

Variable	Factor			
	1	2	3	4
T1	0.086	-0.165	0.123	0.833
T2	0.048	-0.198	0.278	0.664
T3	0.150	-0.014	0.027	0.831
T4	-0.156	-0.124	0.839	0.054
T5	0.145	0.106	0.531	0.401
H	0.173	0.175	0.649	0.253
GO1	0.739	0.159	0.051	0.110
GO2	0.786	-0.060	0.003	0.053
GO3	0.739	0.196	-0.024	0.104
GO4	0.128	0.797	-0.015	-0.018
GO5	0.148	0.734	0.051	-0.108
GO6	0.089	0.801	-0.052	-0.193
GO7	0.687	0.258	-0.106	0.178

Hommos tahina, T1 ; *Baba ghannouj*, T2 ; *Taratour sauce*, T3 ; *Dibs tahina*, T4 ; *Moufattaka*, T5 ; *Halawa*, H ; Roasted almonds, GO1 ; Roasted pistachios, GO2 ; Roasted peanuts, GO3 ; Roasted pumpkin seeds, GO4 ; roasted sunflower seeds, GO5 ; Roasted melon seeds, GO6 ; and Mixed nuts, GO7.

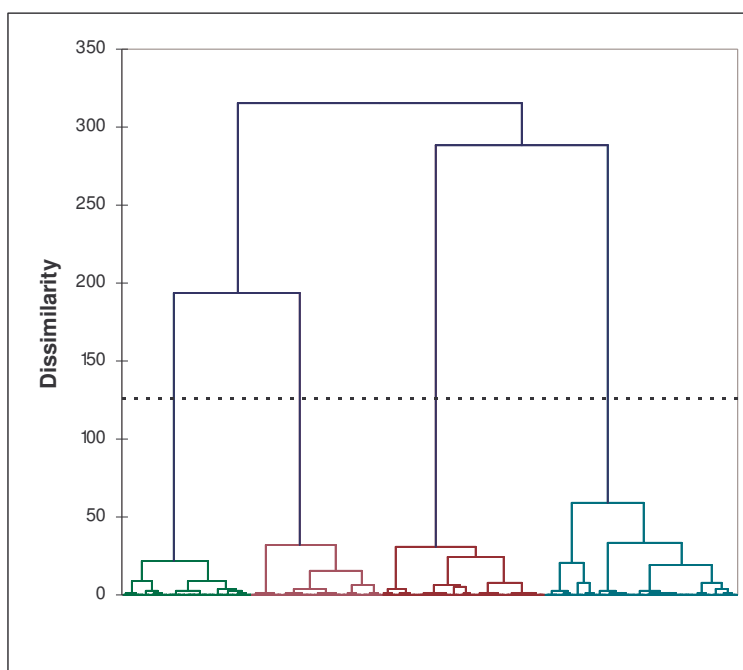


Figure 1. Dendrogram of the hierarchical ascendant cluster analysis

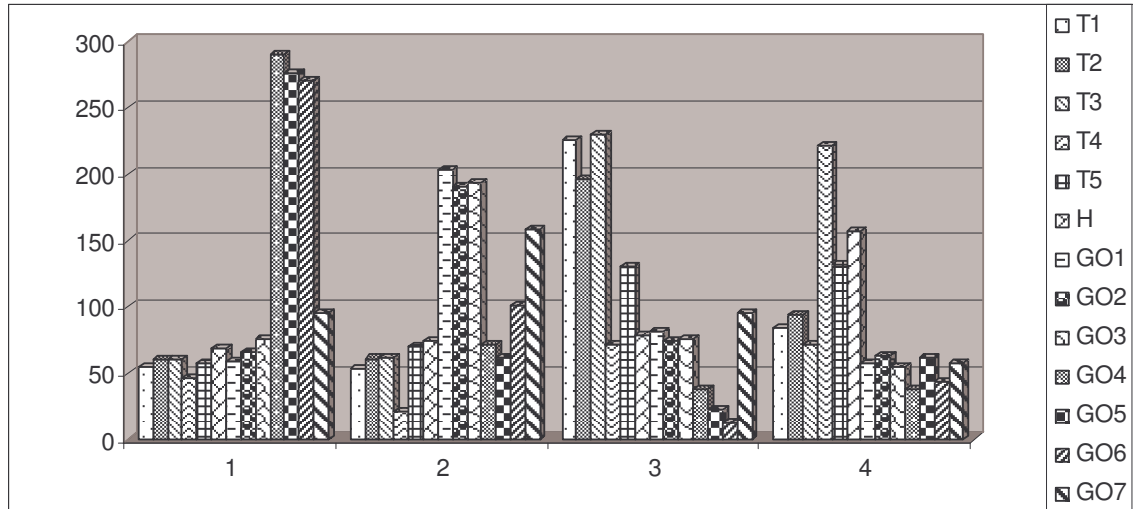


Figure 2. The intake from different food items in the clusters in % of the mean intake of the total sample (Hommos tahina, T1 ; Baba ghannouj, T2 ; Taratour sauce, T3 ; Dibs tahina, T4 ; Moufattaka, T5 ; Halawa, H ; Roasted almonds, GO1 ; Roasted pistachios, GO2 ; Roasted peanuts, GO3 ; Roasted pumkin seeds, GO4 ; roasted sunflower seeds, GO5 ; Roasted melon seeds, GO6 ; and Mixed nuts, GO7).

Consumption of the selected nut and sesame seed products

Only four food types (tahina, roasted almonds, roasted pistachios and roasted peanuts) were retained for the exposure assessment study. Consumption of tahina was calculated from the consumption of mixed dishes prepared from tahina as ingredient by using the conversion factors as discussed in the section materials and methods.

Table 3 shows descriptive statistics for the consumption of the four defined foods among individuals of the study sample (n=400). More than 90% of the surveyed population consumes tahina for at least 2 times per month (Table 3). Nearly 50, 40 and 60 % of the population reported consuming roasted almonds, pistachios and peanuts at least 2 times per month respectively (Table 3). For consumers of the three nut products, the proportion of the population that consumes peanuts was the greatest. About 29 % are regular consumers of tahina (daily consumption of a food item containing tahina as an ingredient), whereas 16, 2.5 and 9 % are regular consumers of almonds, pistachios and peanuts respectively. These figures show that a significant proportion of Lebanese adults include nuts and tahina in their diets on a regular basis.

Since standard deviations on the mean values tend to be high indicating a very heterogeneous population response, food consumption is better expressed as median values. The median intake of tahina, roasted almonds, pistachios and peanuts was estimated to be 18.9, 8.4, 4.3 and 17.3

g/person/day respectively. Consumption of tahina in our population was the highest whereas consumption of pistachios was the lowest. Comparing these intake values with those of other Lebanese dietary studies is made difficult since the frequency and quantity of nut and sesame seed product consumption has not been yet well documented in Lebanon. Studies on dietary habits of the Lebanese population were only sparsely described in the scientific literature. Dietary research based on individual surveys has been lacking in continuity and few research projects have been representative of only small population groups and restricted to specific regions. This study is the first representative study to describe specifically the eating patterns of Lebanese adults for nuts and seeds. In a recent study (Nasreddine et al., 2006), a total diet survey of an adult urban population showed a mean tahina consumption of 3 g/person/day, which is much lower than our results. However, such discrepancy is normally expected since the food frequency questionnaire used in the Lebanese total diet study lists tahina as a single item which tends to underestimate its consumption, whereas all possible dishes containing tahina as an ingredient were included in our questionnaire. Moreover, frequency instruments designed to assess total diet generally list more than 100 individual line items, requiring much time to complete. This tends to be burdensome resulting in underestimating or overestimation consumption of certain food items. In the same study, the mean consumption of nuts, seeds and olives was estimated around 12.8 g/person/day, whereas in our study the average overall consumption of nuts and seeds, excluding olives was about 30 g/person/day.

Table 3. Descriptive statistics of the consumption data set g/day per food type (N=400)

<i>Food type</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Median</i>	<i>P95</i>	<i>% consumers*</i>
Tahina	26.7	26.4	18.9	74.1	91.7
Almonds	32.8	51.0	8.4	126.0	47
Pistachios	14.5	23.9	4.3	64.0	39.5
Peanuts	32.4	46.0	17.3	130.0	59.2

* An individual is considered a consumer of a given food type as long as he/she reported having eaten the food type at least 2 times per month.

Evidence of oxidative damage in commercial nuts and sesame seed products

p-anisidine value, which generally reflects the magnitude of aldehydic secondary oxidation products in fats (McGinely, 1991) ranged from 6.4 in roasted almonds to 11.1 in roasted pistachios, whereas TBARS values, which are more selective for malondialdehyde, ranged from 3.3 in roasted almonds to 6.2 mg of MDA equiv/kg in roasted pistachios. This suggests that oxidative deterioration have taken place during processing of nuts and sesame seed products as

shown in a previous work (Yaacoub et al., 2008), and that these secondary oxidation products have persist in the commercial end products. Pistachios were the most oxidized, followed by tahina and peanuts, whereas almonds were the least oxidized. After 3 months of storage at ambient temperature, p-anisidine values increased by 16, 25, 33, and 34 % in almonds, tahina, peanuts and pistachios respectively, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). TBARS values also increased significantly after 3 months of storage by 18, 29, 33, and 39% in almonds, peanuts, tahina and pistachios respectively. Since the oxidation level in freshly processed pistachios was the highest, the rate of oxidative deterioration was more pronounced in these products during storage, implying improvement of processing and storage conditions in order to reduce the levels of oxidation products in end products. The results indicate a poor stability of roasted nuts and sesame seed products upon storage, as expected from the well established rapid lipid oxidation in dry systems. This poor stability is related to destruction of natural antioxidants, namely tocopherols, breakdown of fatty acids, and physical changes such as disruption of cellular compartmentalization upon roasting (Mate et al., 1996; Perren et al., 1996). Chun et al. (2005) also found that roasted peanuts have poor oxidative stability during storage as compared to raw peanuts, and that after 12 weeks of storage, about 50% of α -tocopherol was lost for roasted peanuts under vacuum compared with about 90% under air, while for raw peanuts, more than 70% of each tocopherol remained after 38 weeks under air and vacuum.

Levels of CML and tFA in commercial products

The average and median concentrations, standard deviations, and ranges of CML and tFA in all samples are summarized in Table 4.

For CML, the highest concentrations were observed in pistachios, followed by peanuts, tahina and then almonds, with average values of 18.3, 16.4, 15.4 and 13.7 ng/mg respectively. For tFA, the highest concentrations were observed in pistachios, followed by almonds, peanuts and then tahina with average values of 1.05, 0.82, 0.64 and 0.56 g/100 g respectively. When expressed as g tFA/100 g fat, the average level of tFA found in pistachios exceeded the maximum allowed limit of 2g/100 g fat as specified by the Danish regulation (2003), whereas the other nuts and seed products analyzed complied with the maximum level set by this regulation. Concerning CML levels, no maximum allowed limits are set till now, therefore such comparison is not possible for the moment.

There was no significant change in CML and tFA concentration levels after 3 months of storage of food samples at ambient temperature, indicating that these compounds are quite stable under normal storage conditions.

A high heterogeneity in contaminant levels was observed between samples especially for tahina products (Figure 3), indicating certain variability in the processing conditions amongst industrial plants.

Table 4. Descriptive statistics of CML (ng/mg) and tFA (g/100g) contamination data per food type

<i>Contaminant</i>	<i>Food type</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Median</i>	<i>Max</i>
CML (ng/mg)	Tahina	15.4	3.4	11.8	14.8	19.7
	Almonds	13.7	1.6	11.8	13.0	15.7
	Pistachios	18.3	2.1	16.6	17.2	21.4
	Peanuts	16.4	1.9	14.7	15.3	19.2
tFA (g/100g)	Tahina	0.56	0.07	0.48	0.58	0.66
	Almonds	0.82	0.07	0.73	0.86	0.87
	Pistachios	1.05	0.01	1.03	1.05	1.07
	Peanuts	0.64	0.09	0.49	0.68	0.69

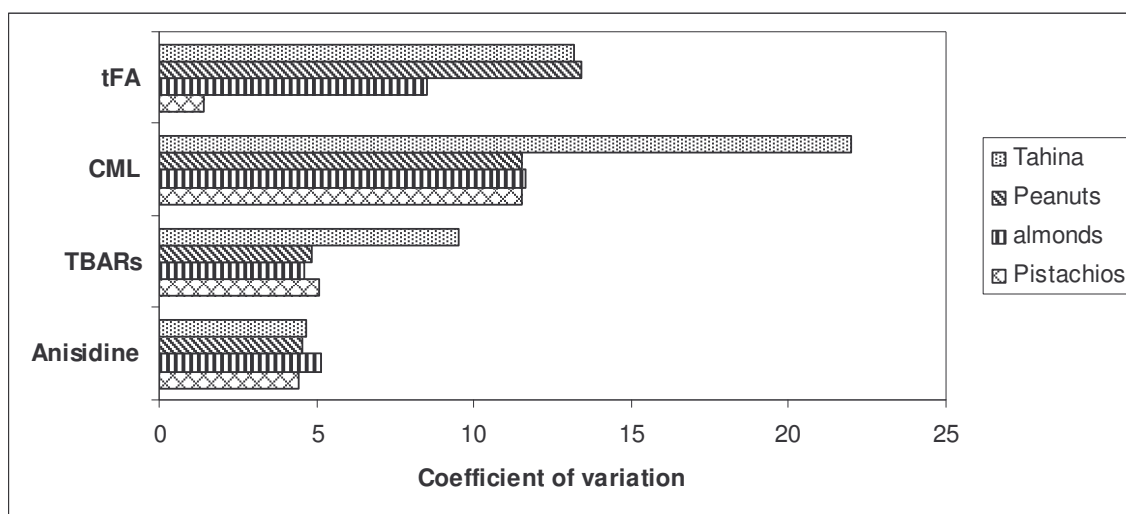


Figure 3. Variability of the contamination as a function of the brand.

Evaluation of the dietary exposure to CML and tFA through consumption of processed nuts and sesame seed products

Information about dietary intake of CML and tFA is necessary in order to evaluate the potential health risk for the individual. Apart from comparing the concentrations of these compounds with the maximum allowed levels in foods, a more significant assessment of potential health hazards for consumers can be obtained by calculating the daily intake of these compounds deriving from the consumption of nut and sesame seed products and comparing it with the tolerable daily intake set by international organizations. It should be stated that the purpose here is not to evaluate the total diet exposure, but rather to study the intake of NFC from nuts and sesame seed products. Since oxidation products are not stable over time, only dietary exposure to CML and tFA will be considered.

In the absence of toxicological studies for tFA, one should interpret the results of exposure to tFA on the basis of cardiovascular disease risk. The international organizations did not set a tolerable intake level for tFA. However, consensus in the professional community is that tFA intake should be as low as possible while consuming a nutritionally adequate diet (IOM/NAS report, 2002). However, the World Health Organization (WHO) has tried to balance public health goals with a practical level of trans fat consumption, recommending in 2003 that trans fats be limited to less than 1% of total energy intake (TEI). The American Heart Association released similar guidelines in 2006 recommending that just one per cent of a person's total calories should be from trans fats. This should mean a maximum tFA intake limit of 2.5 g per day, knowing that the average TEI of an adult lebanese is 2500 Kcal/person /day (Nasreddine et al., 2006). The French food safety agency (AFSSA) has adopted less strict guidelines and recommended a value of 2% tFA from the TEI to be considered as a consumption level that should not be exceeded, based on the scientific literature showing that daily consumption of total tFA higher than 2% of the total energy intake gives rise to a significant increase in the risk of cardiovascular disease (Léger & Razanamahefa, 2005). This should mean for an average TEI of 2500 Calories, a maximum limit of 5 g of tFA/day. We used this maximum recommended daily intake as the level of concern for our population and compared the tFA exposure distributions to this level.

Similarly, no conventional toxicological studies have been carried out for CML. However, in a recent clinical study, significant impact of dietary CML derived from a high NFC diet on risk

factors for diabetes and cardiovascular diseases was demonstrated in young healthy subjects at an exposure level of 6 mg CML/person/day (Lecerf et al., 2008). This value could then be considered as a level of concern above which negative health effects can be observed. This study is the only available scientific information till the moment allowing us to consider maximum acceptable levels of exposure to CML.

Table 5 shows the estimation of exposure of adults to CML and tFA through the selected nuts and sesame seed products. The CML and tFA exposure values for each food type were added together to estimate a total exposure to CML and tFA from the foods analyzed.

In the case of CML, the average overall dietary intake from nuts and sesame seed products was estimated to 0.77 mg per person per day, which corresponds to 13% of the level of concern. In the case of tFA, the average overall dietary intake from nut and sesame seed products was 0.33 g per person per day, which corresponds to 7% of the level of concern. Table 6 shows the estimation of exposure among subpopulations according to sex and age. No significant difference of exposure was found according to sex and age. Men and women from different ages were equally exposed to CML and tFA through their overall consumption of nuts and sesame seed products. However, when compared on a product by product basis, men showed a significant higher exposure to both CML and tFA through consumption of tahina products, while women showed a higher exposure to both CML and tFA through consumption of almonds and pistachios. No significant difference was found for exposure through peanut consumption. Among men, younger adults (25-34 years old) showed the highest average exposure to both CML and tFA from overall consumption of nuts and sesame seeds, and exposure decreased significantly with age. Among women, middle age adults (45-54) showed the highest exposure to both CML and tFA. Exposure increased significantly with age till 45-54 years old and then decreased for the group aged 55-64 years.

The 95th percentile was used to represent the highly exposed consumers. At the 95th percentile, CML and tFA exposure estimates were 6.15 mg/day and 2.94 g/day respectively, which are 8 times higher than average exposure values.

The frequency of CML and tFA exposure rates was then determined. Analysis of these frequency distributions allowed estimating the percentage of the population that exceed the level of concern. Results showed that only 0.25% of the surveyed population surpasses the level of concern for CML through the consumption of industrially processed nuts and sesame seeds. The 5 g tFA/day

threshold was not exceeded by any individual of our population through the consumption of nuts and sesame seed products.

Although pistachio samples were highest in NFC content, the contribution of selected foods to overall CML and tFA exposure was mostly influenced by the amount of food consumed. Tahina was the most important contributor to CML (38%) and tFA (32%) intake from nuts and sesame seed products, followed by peanuts (36 and 31% respectively), almonds (25 and 20% respectively) and finally pistachios (10 and 13 % respectively).

Table 5. Assessment of exposure among adults to CML (mg/person/day) and tFA (g/person/day) through selected nuts and sesame seed products.

Food	CML (mg/person/day)		tFA (g/person/day)	
	Average exposure	Exposure at P95	Average exposure	Exposure at P95
Tahina	0.29	1.14	0.106	0.415
Almonds	0.11	1.72	0.069	1.029
Pistachios	0.08	1.17	0.045	0.674
Peanuts	0.28	2.13	0.110	0.827
Total exposure	0.77	6.16	0.33	2.94
% exposure from the level of concern	13 %	103 %	7 %	59 %

Table 6. Assessment of exposure among subpopulations (sex and age) to CML (mg/person/day) and tFA (g/person/day) through overall nuts and sesame seed consumption.

Subpopulation		CML (mg/person/day)		tFA (g/person/day)	
Sex	Age (years)	Average exposure	Exposure at P95	Average exposure	Exposure at P95
Men	25-34	1.17	8.08	0.55	3.77
	35-44	0.98	6.25	0.45	2.97
	45-54	0.60	3.69	0.25	1.67
	55-64	0.61	1.95	0.22	0.78
Women	25-34	0.61	5.33	0.27	2.59
	35-44	0.85	5.23	0.39	2.55
	45-54	1.00	6.20	0.46	3.10
	55-64	0.49	0.61	0.20	3.31

CONCLUSION

The present study allowed the quantification of the daily intake of processed nuts and sesame seed products in the adult population in Beirut by means of an individual dietary study. We also determined the occurrence of NFC in selected nuts and sesame seed products and estimated the exposure of this population to CML and tFA through consumption of these products. What these levels of exposure mean in terms of degree of risk is not yet well characterized. However we attempted to compare the levels of exposure with levels of concern based on the poorly available scientific information. The results of ongoing studies on toxicity as well as long-term health effects will allow a better understanding of the risk associated to exposure to low levels of NFC in food. Although the results obtained do not show evidence of risk for the average consumers, the highly exposed consumers are subject to CML intake values that are very close to the level of concern from the only consumption of processed nuts and sesame seeds suggesting a toxicologically significant exposure. Therefore the use of more sophisticated tools to assess exposure such as probabilistic methods could be necessary. Moreover, a total diet exposure to NFC is needed to complete the exposure assessment. It should be highlighted that basing risk management on worst case scenarios is overprotective and would likely deprive consumers of the beneficial aspects of nuts and oilseeds. A risk/benefit study approach seems therefore to be important in order to balance the potential deleterious effects of NFC consumption with the nutritional benefits of nuts and seeds consumption.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Lebanese National Council for Scientific Research.

REFERENCES

- Addis, P. B., 1986. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem. Toxicol.* 24, 1021–1030.
- Bingham, S.; San Joaquin, M. A.; Saracci, R.; Kaaks, R.; Riboli, E., 2004. Association of nut and seed intake with colorectal cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(10), 1595-1603.

- Charissou, A.; Ait-Ameur, L.; Birlouez-Aragon, I. 2007. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *J. Chrom. A.* 1140, 189-194.
- Fraser, G. E., 1999. Nut consumption, lipids and risk of a coronary event. *Clin. Cardiol.* 22, 11-5.
- Genot, C., 1996. Some factors influencing TBA test. Annual report of the Vth PCRd EU project: Dietary treatment and oxidative stability of muscle and meat products: nutritive value, sensory quality and safety (Diet-ox), AIR III-CT-92-1577.
- Hwalla, N.; El-Khoury, D. T. D, 2007. Lebanese Traditional Diets and Health effects. In F. De Messter, and W. R. Ronald (Ed.) *Wild-type Food in Health Promotion and Disease Prevention: The Columbus Concept* (pp. 493-498). Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Institute of Medicine, National Academies of Science (IOM/NAS), 2002. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids*, Chapter 8, National Academy Press, Washington, DC, (<http://www.nap.edu>), (IOM/NAS report) at 335-432.
- Jenab, M.; Ferrari, P.; Slimani, N.; Norat, T.; Casagrande, C.; Overad, K.; Olsen, A.; Stripp, C.; Tjønneland, A.; Boutron-Ruault, M. C.; Clavel-Chapelon, F.; Kesse, E.; Nieters, A.; Bergmann, M.; Boeing, H.; Naska, A.; Trichopoulou, A.; Palli, D.; Krogh, V.; Celentano, E.; Tumino, R.; Sacerdote, C.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Ocké, M. C.; Peeters, P. H. M.; Engeset, D.; Quirós J. R.; González, C. A.; Martínez, C.; Chirlaque, M. D.; Ardanaz, E.; Dorronsoro, M.; Wallström, P.; Palmqvist, R.; Van Guelpen, B.; García-Lorda, P.; Rangil, I. M.; Salas-Salvadó, J., 2003. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 8-11.
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H., 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 6474-6479.
- Labrinea, E. P.; Thomaidis, N. S.; Georgiou, C. A., 2001 Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Anal. Chim. Acta.* 448, 201-206.
- Lebanese Central Administration for Statistics, 1998. Conditions de Vie des Ménages en 1997. Etudes Statistiques No. 9. Beyrouth: République Libanaise.
- Lecerf, J. M.; Cayzeele, A.; Vaysse, C.; Galinier, A.; Pouillart, P.; Tessier, F.; Birlouez-Aragon, I., 2008. Health impact of dietary neofomed Maillard products in young healthy adults:

- biological impact of high v. low dietary level. Proceedings of the Nutrition Society, 67 (OCE), E191.
- Léger, C. L.; Razanamahefa, L., 2005. Risks and benefits of food with trans fatty acids for human health-Recommendations. *Ol., Corps Gras, Lipides. 12*, 61–67.
- Mate, J.I., Saltveit, M.E. & Krochta, J.M. (1996). Peanut and walnut rancidity: effect of oxygen concentration and relative humidity. *Journal Food Science*, 61 (2), 465-472.
- McGinley L. 1991. Analysis and quality control for processing and processed fats. In Rossell JB, Printed, JLR, (Eds), *Analysis of Oilseeds, Fat and Fatty Food*, 440-470, Elsevier Applied Science, New York.
- Nasreddine L, Hwalla N, Sibai A, Hamzé M, Parent-Massin D., 2006. Food consumption patterns in an adult urban population in Beirut, Lebanon. *Public Health Nutr.* 9 (2), 194-203.
- Perren, R., Handschin, S. & Escher, F. (1996). Roasting technology of hazelnuts. II. Change in microstructure of hazelnuts during roasting. *Zucker- und Süßwaren-Wirtschaft*, 49 (2), 68-71.
- Saavedra, G.; Ait-Ameur, L.; Tessier, F.; Pouillart, P.; Lecerf, J. M.; Birlouez-Aragon, I., 2008. Health impact of dietary neoformed Maillard products in young healthy adults: occurrence in heat-treated foods and bioavailability. Proceedings of the Nutrition Society, 67 (OCE), E190.
- Wautier, J. L.; Zoukourian, C.; Chappey, O., 1996. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy; soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 97, 238–243.
- Yaacoub, R.; Saliba, R.; Nsouli, B.; Khalaf, G.; Birlouez-Aragon, I., 2008. Formation of lipid oxidation and isomerization products during processing of nuts and sesame seeds. *J. Agric. Food. Chem.* 56, 7082-7090.

**PARTIE IV. DISCUSSION, CONCLUSION ET
RECOMMANDATIONS GENERALES**

Cette thèse suivait initialement 3 principaux objectifs :

1. Caractériser l'évolution de la qualité chimique et nutritionnelle des noix et graines tout au long de leur procédé de transformation, en utilisant des marqueurs issus de la réaction de Maillard et de l'oxydation lipidique, ainsi que des indicateurs de la dégradation nutritionnelle.
2. Evaluer l'intérêt de la fluorescence frontale comme méthode alternative de caractérisation et de prédiction de la qualité chimique et nutritionnelle des noix et graines transformées.
3. Evaluer l'exposition des adultes libanais aux CNF via la consommation des noix et graines transformées.

Nous décrirons par la suite les principaux résultats obtenus au cours de ce travail pour répondre aux différents objectifs fixés pour cette étude.

Tout d'abord (**chapitre 1 de la partie III**), nous nous sommes intéressé à suivre l'évolution de l'oxydation des lipides ainsi que la formation de certains composés néoformés, la carboxyméthyllysine et les acides gras *trans* au cours du procédé de transformation industrielle des noix et graines (amandes, pistaches, cacahuètes et graines de sésame). Le but était de déterminer les étapes critiques du procédé de transformation responsables de l'apparition de ces molécules et de l'amplification des réactions d'oxydation. Pour répondre à cet objectif, des industries produisant des noix et graines grillées d'une part, et de la tahina (pâte de sésame) d'autre part ont été sélectionnées, et les procédés de transformation spécifique de chaque industrie ont été décrits. Ensuite des échantillons issus des industries concernées ont été prélevés à chaque étape de la chaîne de production, de la matière première au produit fini, et analysés pour leur contenu en produits d'oxydation (hydroperoxydes, MDA et aldéhydes totaux), carboxyméthyllysine et acides gras *trans*. Les cinétiques de formation de ces composés aux conditions réelles de torréfaction ont été aussi modélisées pour les graines de sésame. Les cinétiques de torréfaction des noix n'ont pas pu être décrites pour des raisons techniques (échantillonnage difficile à travers le tunnel de torréfaction). La teneur en eau et la température du produit ont été également enregistrées.

La torréfaction est une opération capitale. Elle joue un rôle majeur dans le développement des caractéristiques organoleptiques mais aussi l'abaissement du taux d'humidité des noix et graines.

En effet, les résultats ont montré que la torréfaction induit une perte en eau de la matière première de plus de 50% dans les noix et de 85% pour les graines de sésame, en suivant une évolution exponentielle ($R^2 = 0,97$) pour ces dernières. Des résultats similaires sur l'évolution de la teneur en eau des graines de sésame au cours de leur torréfaction ont été obtenus par Kahyaoglu et Kaya (2006). Normalement, cette diminution de la teneur en eau des graines de sésame est le résultat d'une augmentation progressive en température. Une montée en température très rapide au sein du produit (dès les premières 5 min de torréfaction des graines de sésame) a été suivie par une élévation progressive jusqu'à la fin du processus de torréfaction à 115 °C. Cette phase initiale d'augmentation rapide de température est essentiellement due à la condensation de l'eau à la surface encore froide des graines au début du chauffage. Ce phénomène de condensation – évaporation est considéré comme le mécanisme de transfert de chaleur gouvernant l'augmentation de température dans une matrice alimentaire (Chevallier et al., 2000 ; Sablani et al., 1998).

Un examen de la qualité initiale de la matière première a mis en évidence, malgré une teneur faible en hydroperoxydes, des teneurs relativement élevées en produits secondaires d'oxydation par rapport à d'autres études. Ceci indique qu'une oxydation lipidique a eu lieu pendant les phases qui ont précédé la transformation.

Le suivi des hydroperoxydes pendant les différentes étapes du procédé a montré que les hydroperoxydes ne se forment que de manière transitoire, puisqu'après leur apparition pendant l'étape de torréfaction des noix, leurs niveaux sont faibles dans le produit fini. Ce déclin indique leur décomposition en produits d'oxydation secondaires. Dans le cas de la tahina, l'étape de décorticage a amorcé l'oxydation probablement à cause d'un échauffement des graines dû à des forces de friction. La cinétique en forme de cloche pendant la torréfaction des graines de sésame prouve le caractère intermédiaire des hydroperoxydes. Ces derniers se forment très rapidement avec le début du chauffage, puis s'accumulent de manière exponentielle au fur et à mesure que la température augmente jusqu'au point où ils atteignent un maximum vers 30 min, puis diminuent jusqu'à la fin du chauffage. L'augmentation continue de la température a empêché de former un plateau, où la formation et la décomposition des hydroperoxydes se font à des vitesses similaires, comme le montrent certaines études (Tilbury et Miller, 2000). Au contraire, à partir de 30 min de chauffage, la vitesse de dégradation prend le pas sur la vitesse de synthèse.

Similairement, la torréfaction des noix a induit aussi une augmentation des taux d'aldéhydes totaux et de MDA. Cependant, les aldéhydes totaux, exprimés par l'indice d'anisidine, se sont accumulés tout au long du procédé de transformation, alors que le taux de MDA s'est incliné après torréfaction, probablement du fait de sa réactivité avec d'autres molécules. En effet, les produits secondaires de l'oxydation des lipides interagiraient avec d'autres molécules, notamment les protéines, et/ou seraient dégradés en d'autres substances non accessibles au dosage, ce qui expliquerait alors l'infléchissement des valeurs de TBARS observés. Le MDA réagit donc, donnant un ou des produits de dégradations. Il a été montré que le MDA réagit avec les amines primaires pour former des composés fluorescents (1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehyde) via la réaction de Kikugawa (1991). Le groupement ϵ -aminé de la lysine peut réagir avec le MDA pour donner des produits fluorescents (Itakura et al., 1996). En outre, du fait de la grande réactivité de la forme libre du MDA, des polymères peuvent se former sous l'action de la chaleur et sans réaction avec un groupement amine (Gutteridge et al., 1977). Une autre explication de la diminution du niveau du MDA serait une volatilisation du MDA au cours de la torréfaction à cause de sa nature volatile.

Cet effet n'a pas été observé dans le cas de la tahina, les niveaux de MDA continuaient à augmenter pendant les étapes qui ont suivi la torréfaction puisqu'une augmentation en température du fait du broyage et de la stérilisation avait toujours lieu favorisant une formation continue du MDA. Au cours de la torréfaction des graines de sésame, une augmentation significative en aldéhydes totaux et MDA a eu lieu seulement après 30 min de chauffage, lorsque les hydroperoxydes commençaient à se dégrader.

Plusieurs auteurs ont montré que la torréfaction des noix et graines favorise l'oxydation des lipides. En effet, Bett et Bobylston (1992) ont montré que la torréfaction des cacahuètes amorce et augmente l'oxydation des lipides ainsi que la formation des composés carbonylés. Une augmentation de la viscosité de l'huile extraite des graines de sésame, a également été notée qui suppose la formation de polymères lipidiques (Elleuch et al., 2007). Ozdemir et al. (2001) ont aussi montré que la torréfaction des noisettes augmente l'indice de peroxyde.

Par ailleurs, les résultats montrent que la formation de la CML et des AGT a été directement liée à l'étape de torréfaction, ces molécules étant absentes dans la matière première. L'étape de stérilisation de la tahina participait aussi à leur accumulation. La CML augmentait exponentiellement ($R^2=0,99$) en fonction du temps de torréfaction des graines de sésame, mais sa

formation est amorcée seulement après 60 min de chauffage lorsque la température dépasse les 85 °C. L'accumulation de la CML a été négativement corrélée ($R^2 = -0,96$) avec la dégradation des acides gras polyinsaturés (AGPI), mais positivement corrélée avec les indices d'oxydation mesurés, p-anisidine et TBARS ($R^2 = 0,89$ et $0,84$ respectivement). Ceci supporte l'hypothèse que dans les aliments riches en lipides, la voie majeure de la formation de la CML est l'oxydation des AGPI (Fu et al., 1996). En effet, le glyoxal, substrat majeur de la formation de la CML (Glomb et Monnier, 1995), est produit durant l'autoxydation de l'acide linoléique (C18 :2 n-6) (Zamora et Hidalgo, 2005). Enfin, nous avons montré que la CML est exponentiellement corrélée ($y = 73,84e^{-1,688x}$, $R^2 = 0,94$) avec la teneur en eau, indiquant que la teneur en eau pourrait être un facteur critique dans la formation de la CML dans les noix et graines grillées. En effet, les réactions de peroxydation et de glycoxydation sont favorisées par des teneurs en eau faibles (Goldberg et al., 2004).

De leur côté, les AGT augmentaient linéairement ($R^2 = 0,99$) en fonction du temps pendant la torréfaction des graines de sésame, mais seulement après 75 min de chauffage lorsque la température dépasse les 92 °C.

Les teneurs en CML et AGT ont variés entre 12 et 17 ng CML/mg, et entre 0,5 et 0,95 g TFA/100g respectivement dans les produits finis.

En conclusion, les résultats de ce chapitre montrent que le procédé de transformation entraîne d'une manière significative l'oxydation des lipides des noix et graines, ainsi que la formation de certains composés néoformés dans ces produits. La torréfaction apparaît comme l'étape clé dans ce processus, cependant la stérilisation de la tahina joue aussi un rôle significatif. L'indice d'anisidine et le TBARS test semblent être meilleurs indices que les hydroperoxydes pour le suivi de cette oxydation. Le couple temps/température de torréfaction paraît comme facteur critique dans ces réactions, puisque les pistaches, subissant le traitement thermique le plus sévère, ont été les plus touchées. Par conséquent, l'établissement de barèmes optimaux de temps/température est primordial pour optimiser la chaîne de production et minimiser ces réactions à l'origine de nombreux composés suspects de toxicité. Cependant, cette optimisation devrait tenir compte à la fois de la salubrité microbiologique du produit, surtout la présence de Salmonelle dans la tahina, ainsi que des propriétés organoleptiques recherchées.

Toutefois, la température de torréfaction paraît comme le facteur le plus important et le plus influent sur l'oxydation des lipides des noix et graines : on a montré que les taux d'oxydation des

noix et graines grillées augmentent considérablement avec l'élévation de la température de torréfaction. La durée de torréfaction a en revanche une influence mineure sur les niveaux d'oxydation et la durée de vie ultérieure, pour cela des durées de torréfaction plus longues, associées à des températures modérées (130-150°C) plutôt que sévères, sont en général recommandées pour obtenir une stabilité oxydative optimale (Perren et Escher, 2007). Par ailleurs, la torréfaction détruit la microstructure des cellules des noix et graines du fait de l'application de températures élevées (Saklar et al., 2003). En effet, dans les graines intactes, les cellules de stockage des lipides présentent un réseau endoplasmique en structure de nid d'abeille. Les lipides sont stockés alors au niveau des cavités subcellulaires dans des structures spécialisées appelées. Cette compartimentation et organisation subcellulaire réduit fortement l'accessibilité de l'oxygène à travers les pores extracellulaires, et limite par conséquent l'oxydation lipidique. Lors de la torréfaction, l'intégrité cellulaire est atteinte : le réseau endoplasmique est rompu et les oléosomes désintégrés. De même, les jonctions intercellulaires sont altérées et la surface interne élargie (Saklar et al., 2003). Ceci augmente la diffusion de l'oxygène jusqu'à l'intérieur de la graine et met le substrat au contact des enzymes, favorisant ainsi les réactions d'oxydation et réduisant la stabilité oxydative des noix et graines grillées (Perren et al., 1996).

Récemment, un procédé de torréfaction à deux étapes (*two-step process*), utilisant une température de torréfaction relativement faible (~130°C) pendant la première phase afin de plastifier le produit, suivie par une période de torréfaction plus longue et des températures plus élevées (mais autant faibles que possible), a été proposé pour limiter l'oxydation pendant et après la torréfaction des noix et graines (Perren et Escher, 2007). Ce procédé à deux étapes permet en effet de minimiser l'augmentation de la taille des pores intracellulaires lors de la torréfaction augmentant ainsi la stabilité oxydative du produit fini tout en achevant la qualité organoleptique désirée (Perren et Escher, 2007).

Concernant la chaîne de production de la tahina, une optimisation du procédé « traditionnel » devrait impliquer tout d'abord une optimisation des conditions de torréfaction par l'adoption d'une technique continue, plus efficace, moins lente et à l'abri de l'air ambiant, c.à.d. en système fermé. En effet, la technique de torréfaction des graines de sésame actuellement utilisée, consistant en un demi-cylindre (ouvert) à double manteau effectuant des mouvements de va-et-vient, est discontinue, de faible performance, occupe un espace très large, et dure un temps très long (2 heures et plus). A cause de cette durée longue de torréfaction, principalement due aux

caractéristiques du transfert de l'énergie aux graines, et du contact du produit avec l'air ambiant durant toute l'opération de torréfaction, la qualité des graines de sésame rôties est médiocre. En utilisant des techniques alternatives, telles que la torréfaction en lit fluidisé pulsé et rotatif (production continue), la durée de torréfaction peut être réduite à 25-30 min tout en ayant une qualité supérieure du produit fini (Djurkov et al., 1989; Djurkov et Elenkov, 1992). Cette technologie est spécifiquement adaptée pour les particules qui ont tendance à s'agréger, comme dans notre cas où les graines de sésame sont très humides à l'entrée du lit fluidisé du fait d'un lavage préalable.

D'autre part, dans le système de production traditionnel, on laisse refroidir les graines de sésame rôties à l'air ambiant immédiatement après torréfaction et avant les faire passer à la meule. Pendant ce temps, les réactions d'oxydation sont favorisées à cause du séjour à des températures élevées et en présence de l'air. De ce fait, une unité de refroidissement doit être conçue au sein du lit fluidisé ou à la sortie de ce dernier. L'optimisation de l'opération de broyage des graines de sésame rôties est aussi essentielle. En effet, le broyage se faisant par des meules de pierre provoque un échauffement de la pâte si la vitesse de broyage est excessive, la température du produit à la sortie du broyeur étant en moyenne 50°C. On recommande que le broyage se réalise dans un hall réfrigéré.

Enfin, les barèmes de stérilisation de la tahina doivent être aussi étudiés de manière détaillée de façon à trouver un optimum opérationnel.

Dans un deuxième temps (**chapitre 2 de la partie III**), nous nous sommes intéressés à étudier l'impact du procédé de transformation industrielle sur la qualité nutritionnelle des noix et graines. Cette évaluation a été basée sur le suivi des antioxydants thermolabiles, les tocophérols et les polyphénols totaux, ainsi que le profil des acides gras tout au long de la chaîne de production. Les cinétiques de dégradation des différents tocophérols au cours de la torréfaction des graines de sésame ont été aussi décrites.

Tout d'abord la composition nutritionnelle des noix et graines étudiées a été déterminée. La teneur en lipides totaux a varié entre 52 et 58%, la tahina étant le produit le plus riche en lipides. L'étude du profil des acides gras a révélé que ces lipides sont hautement insaturés (80-87%) et que les acides gras monoinsaturés (AGMI) sont prédominants, particulièrement dans les amandes. Les acides oléique (C18 :1 n-9) et linoléique (C18 :2 n-6) ont été les acides gras prédominants dans les noix et graines, alors que l'acide linoléique (C18 :3 n-3) était en moindre

concentrations. Les amandes étaient les plus riches en tocophérols et polyphénols totaux suivis par les cacahuètes, les pistaches et finalement la tahina. L' α -tocophérol était la forme prédominante dans les amandes (23 mg/100g) et les cacahuètes (9 mg/100g), alors que le β + γ -tocophérol était prédominant dans les pistaches (12 mg/100g) et la tahina (10 mg/100g). Le rapport de la teneur en vitamine E (mg α -tocophérol) sur la quantité d'AGPI (grammes) présents dans les noix et graines semble être un bon indicateur de l'apport réel en Vitamine E par ces aliments. En effet, les besoins en vitamine E augmentent lors d'une consommation plus élevée d'AGPI. Il est recommandé que ce rapport soit égal à 0,4 mg de vit E par g d'AGPI (Bieri et Evarts, 1973). Les rapports E/AGPI trouvés pour les échantillons d'amandes et de cacahuètes analysés ont été supérieurs à la valeur recommandée, indiquant que ces noix et graines constituent une bonne source de vitamine E.

Le suivi des acides gras tout au long de la chaîne de production a montré une diminution significative des acides gras insaturés. Cette modification du profil des acides gras est un bon indicateur de l'oxydation lipidique (Gray et Monahan, 1992). Les AGPI étaient plus sensibles à l'oxydation que les AGMI (perte de 6 à 12 fois de plus), alors que les acides gras saturés sont restés intacts. Cette altération du profil lipidique était la plus prononcée dans les pistaches (21 % de perte des acides gras insaturés) et la moins prononcée dans les amandes (7 % de perte). Luh et al. (1982) ont trouvé une perte similaire (22%) au cours de la torréfaction des pistaches. Lors de la torréfaction des graines de sésame, une légère diminution des AGMI contre une diminution significative des AGPI ont été observées après 60 min de chauffage. Nos résultats sont en désaccord avec les résultats d'autres études (Elleuch et al., 2007 ; Yoshida et Kajimoto, 1994) où un changement du profil en acides gras n'a pas été observé lors de la torréfaction des graines de sésame même après un chauffage à 120°C pendant 1 heure. Cependant les conditions de torréfaction menées dans ces études ne sont pas connues, d'autant plus qu'une torréfaction plus longue (2 h) menée en système ouvert (contact du produit avec l'air) dans le cas de notre étude favorise une telle oxydation.

Par ailleurs, la torréfaction des amandes, cacahuètes et pistaches a conduit à une perte significative en α -tocophérol (7,7%, 8 % et 37% respectivement) et β + γ -tocophérol (6,6%, 7,8% et 20.8% respectivement) dans ces produits. Les pistaches s'avèrent encore une fois les plus touchées par cette perte. D'une manière similaire, la torréfaction des graines de sésame a provoqué une perte linéaire en fonction du temps ($R^2=0,98$) d' α -tocophérol et de β + γ -tocophérol

de l'ordre de 70 % et 66 % respectivement. Les étapes de broyage et de stérilisation des graines de sésame ont également contribué à cette perte pour obtenir une perte totale d' α -tocophérol et de $\beta+\gamma$ -tocophérol de l'ordre de 88 et 72% respectivement dans le produit fini. L'étape de décorticage des graines de sésame a de même contribué à une diminution des tocophérols du fait de l'élimination des enveloppes riches en ces composés.

Concernant les polyphénols totaux, la torréfaction des amandes, cacahuètes et pistaches a conduit à une perte significative en polyphénols totaux (15%, 11% et 7% respectivement). Cette fois-ci, les polyphénols des amandes paraissent les plus sensibles au traitement thermique. Au cours de la production de tahina, les polyphénols totaux ont baissé après décorticage des graines de sésame du fait de l'élimination des enveloppes riches en composés phénoliques (Elleuch et al., 2007), puis ont continué à baisser après torréfaction, broyage et stérilisation. Elleuch et al. (2007) ont aussi montré l'effet du traitement thermique sur la dégradation des polyphénols totaux où une perte de 55% a été observée après séchage à 80°C pendant 15 min suivi d'une torréfaction à 120°C pendant 1h. La torréfaction des graines de sésame a provoqué une perte de 15% en polyphénols totaux dans les conditions de notre étude. Le suivi de cette dégradation au cours de la torréfaction a montré qu'après un temps de latence d'environ 15 min, les polyphénols totaux ont commencé à se dégrader progressivement jusqu'à la fin de la torréfaction. Cependant, les vitesses de dégradation avaient tendance à se ralentir après 60 min de torréfaction alors que la température continuait à augmenter. Ceci peut être expliqué par une éventuelle formation, pendant la torréfaction, d'autres produits phénoliques tels que le sésamol et le sésaminol exhibant une action anti-oxydante, respectivement à partir de la sésamoline et des glycosides de sésaminol dépourvus d'activité anti-oxydante (Mohamed et Awatif, 1998 ; Kumazawa et al., 2003).

Nous pouvons conclure pour cette partie que le procédé de transformation des noix et graines entraîne d'une manière significative une diminution de la qualité nutritionnelle des produits finis. Les acides gras insaturés, les tocophérols et les polyphénols totaux sont tous concernés dans cette perte. Les étapes clés responsables de cette détérioration de la qualité nutritionnelle sont en premier lieu la torréfaction, ensuite le décorticage, le broyage et la stérilisation dans le cas de la tahina. Parmi les acides gras, les AGPI ont été les plus sensibles à l'oxydation, tandis que les α -tocophérols se dégradaient plus rapidement que les $\beta+\gamma$ -tocophérols. Les polyphénols totaux se sont dégradés au cours de ces étapes de transformation, cependant le devenir de chaque composé

phénolique n'est pas connu de manière spécifique. En effet, certains composés phénoliques peuvent se dégrader alors que d'autres sont formés. Pour cela, une étude plus détaillée sur l'évolution de chaque molécule phénolique de manière individuelle, notamment les composés d'intérêt nutritionnel important, permettrait de mieux appréhender l'impact du procédé de transformation sur la qualité nutritionnelle des noix et graines apportée par les polyphénols. Par exemple, on a montré que les principaux flavonoïdes présents dans les amandes (catéchine, epicatéchine, quercétine, kaempférol, et isorhamnétine) présentent le pouvoir antioxydant, protecteur contre la mort des cellules, le plus élevé de tous les autres flavonoïdes (Milbury et al., 2006). De plus, des études *in vitro* récentes ont révélé que les polyphénols des amandes agissent de manière synergétique avec la vitamine E pour réduire la sensibilité des LDL à l'oxydation (Chen et al., 2005). Ces phénomènes de synergie montrent l'importance de considérer la totalité des nutriments lors de l'optimisation de la chaîne de production afin de produire des aliments ayant un maximum de bénéfices pour la santé.

D'autre part, dans le cadre de cette étude, les amandes ont été trouvées les plus riches en vitamine E et en polyphénols totaux dont le profil en flavonoïdes semble être particulièrement intéressant comme l'atteste d'autres études. Cependant, ces polyphénols semblent se dégrader plus rapidement que ceux des autres noix (pistaches et cacahuètes). Pour cela, une attention particulière doit être portée aux conditions de torréfaction des amandes afin de limiter une telle perte nutritionnelle.

Finalement, la perte en AGPI a été inversement liée au niveau initial en tocophérols et polyphénols démontrant ainsi le rôle essentiel de ces derniers dans la protection des AGPI contre l'oxydation. D'autre part, la dégradation des AGPI a été négativement corrélée à la dégradation des polyphénols mais positivement corrélée à celle des tocophérols. Ceci suggère que les polyphénols présents dans les noix et graines étaient capables de protéger les AGPI contre l'oxydation plus que les tocophérols, et agissent comme protecteurs de la vitamine E au cours du traitement thermique comme le montrent différentes études sur l'huile d'olive (Cheikhousman et al., 2005 ; Pellegrini et al., 2001).

Cette étude montre la nécessité d'optimiser la chaîne de production et de contrôler la qualité des noix et graines tout au long du processus de transformation afin de limiter toute perte nutritionnelle.

Un suivi analytique des qualités chimique et nutritionnelle des noix et graines au cours de leur transformation industrielle nécessite cependant la mise en œuvre de méthodes analytiques lourdes et coûteuses. Que l'enjeu soit un contrôle des paramètres de torréfaction ou une optimisation du procédé, l'industriel pourrait tirer profit d'un suivi et d'une maîtrise de ces réactions. Nous avons donc cherché dans le **chapitre 3 (partie III)** à développer une méthode simple, rapide et à faible coût pour répondre à cet objectif. Nous avons opté pour la fluorescence en mode frontal qui semble être très sensible à tout changement affectant la matrice soumise à un traitement thermique. Les données spectrales bidimensionnelles (matrices d'excitation et d'émission ou MEE), obtenues à partir de mesures rapides de fluorescence frontale des échantillons prélevés à différentes étapes de la production industrielle, ont été analysées par des outils chimiométriques. L'information spectrale systématique, extraite grâce à des modèles chimiométriques multivariés et multivoies, est utilisée pour décrire l'impact du traitement thermique. Des modèles d'étalonnage de la teneur en CNF, mesurée par des méthodes chromatographiques, ont été alors construits pour prédire la concentration en CNF des échantillons.

L'acquisition des MEE de fluorescence en mode frontal a été réalisée directement sur les échantillons broyés ou liquides (tahina). Des modèles PARAFAC ont été développés pour les noix et le sésame séparément vu les différences existantes dans la composition et le procédé de transformation entre les 2 types de produits ; la fluorescence étant mesurée sur les échantillons issus des différentes étapes de la transformation industrielle. La décomposition PARAFAC a été suivie d'une caractérisation des composants afin de pouvoir identifier les différents fluorophores présents et de suivre leur évolution grâce à leur scores tout au long de la chaîne de transformation. Ceci a permis d'étudier l'impact de chaque étape de transformation, surtout le traitement thermique, sur le devenir des différents fluorophores. En outre, les scores obtenus pour chaque modèle ont servi pour établir des modèles de prédiction des composés néoformés mesurés par méthodes d'analyse conventionnelles à partir des spectres de fluorescence. Pour cela, nous avons eu recours à deux méthodes, la régression linéaire multiple classique (MLR) et la régression PLS (Partial Least Squares Régression) ou la « régression au sens des moindres carrés partiels ». Les modèles d'étalonnages ont été réalisés avec des MEE déconcaténées d'un côté et les dosages chimiques des molécules d'intérêt correspondants au moyen de la PLS (Logiciel MATLAB, PLS toolbox). D'autres modèles ont été établis avec les scores de la décomposition PARAFAC d'une part et les données chimiques par régression linéaire multiple (MLR) et

régression PLS. Les différents modèles ont été validés par validation croisée « leave-one-out », puis comparés suivant le coefficient de corrélation (R) et l'erreur de prédiction exprimée en terme l'erreur quadratique moyenne de validation croisée RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation).

Dans un premier temps, une évaluation globale de l'empreinte de fluorescence des différents échantillons montre de fortes modifications des empreintes, celles-ci se déformant au fur et à mesure des transformations que subissent ces produits. Les différentes empreintes permettent de visualiser la dégradation des polyphénols et de l'alpha-tocophérol ainsi que l'accumulation de composés de dégradation thermique. En effet, l'identification des zones de fluorescence sur ces empreintes permet de distinguer 2 zones distinctes : d'une part le tryptophane confondu avec les tocophérols aux longueurs d'onde des maximums d'excitation et d'émission 290/330 nm dont l'intensité diminue avec la torréfaction, et d'autre part les produits néoformés représentés par une zone de fluorescence très large (max : 360-370/450 nm) se formant au fur et à mesure de la torréfaction. Cette fluorescence a été bien identifiée dans la littérature comme étant issue des produits de dégradation thermique des aliments riches en lipides (Christensen, 2005 ; Sikorska et al., 2004 ; Birlouez-Aragon et al., 2001). Cette analyse préliminaire a ainsi permis de montrer le potentiel d'une telle approche globale par fluorescence de la perte de qualité des noix et graines au cours de la transformation industrielle. La décomposition PARAFAC nous a permis ensuite d'identifier individuellement les fluorophores intrinsèques formant ces différentes zones de fluorescence et déterminer la contribution de chaque fluorophore à la fluorescence globale. Quatre fluorophores ont été identifiés dans les noix (amandes et cacahuètes) contre cinq dans les graines de sésame.

Une première fluorescence (**F1**), commune aux 2 types de produits, dont les longueurs d'onde des maximums d'excitation et d'émission sont situées à 296 et 332 nm respectivement, a été attribuée au tryptophane et tocophérols. Cette fluorescence diminuait fortement après torréfaction. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette importante baisse de l'intensité de fluorescence : concernant les tocophérols, ces composés sont connus comme composés très thermolabiles et nous avons démontré dans le chapitre 2 que leur concentration diminue avec la torréfaction. Concernant le tryptophane, celui-ci peut être directement touché, et serait dégradé par des réactions d'oxydation induites par des molécules telles que les radicaux libres ou éventuellement les aldéhydes, produits par les réactions d'oxydation des lipides. Ces

altérations se traduiraient par une modification du noyau indole induisant une perte de la propriété de fluorescence des résidus tryptophanyles. Une autre hypothèse est basée sur une possible extinction de la fluorescence du tryptophane sans dégradation directe de ce dernier. En effet, la fluorescence du tryptophane est essentiellement sensible aux modifications du milieu environnant, tels que ceux induits par la dénaturation protéique qui entraîne une baisse de rendement de fluorescence (Dufour et Riaublanc, 1997), l'apparition de produits de Maillard qui réabsorbent une partie de l'énergie émise, et surtout la modification de la structure physico-chimique du milieu. L'environnement du tryptophane pourrait être aussi modifié indirectement par les TBARS qui sont susceptibles de réagir avec différentes chaînes latérales d'acides aminés, voisins du tryptophane. La modification de cet environnement se traduirait aussi par une diminution de la fluorescence émise par le tryptophane. Cette deuxième hypothèse est supportée par la formation de composés fluorescents dans la zone de longueurs d'onde des maximums d'excitation et d'émission 360-370/440 nm, résultant de l'interaction entre produits secondaires d'oxydation et protéines, et qui constitue la deuxième fluorescence commune (**F2**) donnée par PARAFAC. Une troisième fluorescence commune (**F3**) aux longueurs d'onde des maximums d'excitation et d'émission 432/480 nm a été aussi attribuée aux produits avancés de Maillard. Les fluorescences F2 et F3 augmentaient continuellement tout au long de la chaîne de transformation, et principalement après 60 min de torréfaction. Une quatrième fluorescence commune (**F4**) émettant encore plus loin (530-540 nm) a été attribuée aux adduits avancés des produits d'oxydation aux protéines à cause de son apparition tardée (après 75 min de torréfaction des graines de sésame). Les fluorophores associés à F4 s'accumulaient durant les étapes de transformation des noix et graines. A l'opposé des autres fluorescences qui ont été bien identifiées dans d'autres études, la fluorescence F4 a été uniquement observée dans une autre étude au cours du processus de cuisson des biscuits (Ait ameur et al., 2006). Une dernière fluorescence (**F5**) observée uniquement dans le cas du sésame aux longueurs d'onde des maximums d'excitation et d'émission 336/380 nm a été attribuée à des produits précoces d'oxydation et/ou de Maillard puisque cette fluorescence diminue fortement après 90 min de chauffage, indiquant une décomposition de ces produits en d'autres produits avancés. On ne croit pas que la fluorescence F5 est spécifique du sésame mais que cette fluorescence transitoire n'a pas été observée dans les noix puisqu'un suivi de la torréfaction des noix à des intervalles de temps proches comme dans le cas des graines de sésame n'a pas été possible.

Des régressions linéaires simples utilisant les scores de chaque composant issu de la décomposition PARAFAC avec les résultats analytiques de la CML montrent d'une part, une corrélation négative ($R=0,73$) entre la CML et la fluorescence F1 (tryptophane et tocopherols), et d'autre part que le composant F2 explique au mieux la CML et contribue le plus à sa prédiction ($R=0,85$ pour les noix, $R=0,83$ pour le sésame). Cette corrélation de la fluorescence F2 avec la formation de CML confirme encore une fois son attribution aux composés fluorescents de Maillard. Cependant, les résultats indiquent qu'une prédiction de la CML à partir des scores des composants PARAFAC est optimisée par l'inclusion dans le modèle de tous les composants PARAFAC. Le modèle à 4 composants PARAFAC développé pour les noix a donné une très bonne corrélation ($R= 0,92$) avec une erreur de prédiction (RMSECV) de 0,56 ng/mg représentant 3,8% de la concentration moyenne en CML dans les noix. Le modèle à 5 composants PARAFAC développé pour le sésame a également donné une très bonne corrélation ($R= 0,95$) avec une erreur de prédiction (RMSECV) de 0,51 ng/mg représentant 8,2% de la concentration moyenne en CML dans le sésame. Cette moindre performance du modèle développé pour le sésame, représentée par une erreur de prédiction plus élevée peut être expliquée par une population d'échantillons plus hétérogène en terme de concentration en CML (allant de 0,5 à 18,6 ng/mg). En effet, en comparant les modèles sur la base de leurs erreurs de prédiction exprimées en pourcentage de leur étendue (RMSECV/étendue), on trouve que les modèles ont des performances similaires (13 et 14 % dans les noix et dans le sésame respectivement).

De manière similaire, les résultats ont montré que le composant PARAFAC F4 explique au mieux les AGT et contribue le plus à sa prédiction ($R=0,82$ pour les noix et le sésame). Ceci suggère que les AGT, généralement associés à des traitements thermiques sévères, sont bien corrélés avec les produits d'oxydation et/ou de Maillard très avancés qui fluorescent dans cette zone. Le modèle MLR à 4 composants PARAFAC développé pour les noix a donné une très bonne corrélation ($R= 0,82$) avec une erreur de prédiction (RMSECV) de 0,2 g AGT/100g d'acides gras, représentant 10% de la concentration moyenne en AGT dans les noix. Le modèle à 5 composants PARAFAC développé pour le sésame a également donné une très bonne corrélation ($R= 0,94$) avec une erreur de prédiction (RMSECV) de 0,16 g AGT/100g d'acides gras représentant 12% de la concentration moyenne en AGT dans le sésame.

En comparant ces modèles développés pour la prédiction de la CML et des AGT par la méthode de la MLR sur les scores des composant PARAFAC, avec les autres modèles de prédiction obtenus par d'autres méthodes chimiométriques (régression PLS sur composants PARAFAC et régression PLS sur MEE déconcaténées), la MLR sur composants PARAFAC semble être la méthode de choix dans notre cas car elle donne à la fois les meilleures calibrations et prédictions (RMSEC et RMSECV plus faibles et coefficients de corrélation R plus élevés).

Lorsqu'on a tenté d'explorer le potentiel de la fluorescence frontale dans le suivi de l'oxydation tout au long de la chaîne de production, les résultats ont montré que les valeurs de p-anisidine et de TBARS sont très bien corrélées avec le composant PARAFAC F2, confirmant encore une fois l'attribution de cette fluorescence aux composés de réaction entre les composés aldéhydiques secondaires d'oxydation et les amines peptidiques. Les modèles MLR sur composants PARAFAC développés pour prédire les aldéhydes totaux (p-anisidine) et le MDA (TBARS) ont donné des résultats satisfaisants pour les noix ($R=0,73$) et le sésame ($R= 0,96$). Ces résultats sont en accord avec ceux des autres études (Wold et al., 2002 ; Gatellier et al., 2007 ; Jensen et al., 2004). Les modèles de prédiction développés pour les hydroperoxydes ont donné des résultats moins satisfaisants en raison du caractère transitoire des hydroperoxydes.

Les résultats obtenus par cette étude révèlent donc l'intérêt de la technique de fluorescence pour remplacer les méthodes lourdes et coûteuses pour le contrôle la qualité des noix et graines au cours de leur transformation. La technique paraît très satisfaisante pour la prédiction de la CML et AGT et le suivi de l'oxydation tout au long des étapes de production, les erreurs de prédiction sur les modèles calibrés ne dépassant pas les 10% dans tous les cas. Ces modèles de prédiction développés pourraient, une fois validés sur un nombre plus important de données, permettre de remplacer les méthodes chromatographiques par l'approche en fluorescence.

Dans le **chapitre 4 (partie III)**, l'évaluation de l'exposition des libanais adultes aux composés néoformés, principalement la carboxyméthyllysine (CML) et les acides gras *trans* (AGT), à partir des noix et graines transformées a été réalisée en croisant les données de consommation alimentaire obtenues par le biais d'une enquête de consommation alimentaire exécutée dans le cadre de cette recherche sur une population urbaine adulte âgée entre 25 et 64 ans, avec les données de contamination obtenues par les analyses chimiques. L'approche par simple distribution a été ainsi adoptée pour répondre à cet objectif. Cette approche consiste à utiliser la

totalité de la courbe de consommation qui est alors croisée à une valeur fixe de la contamination (ici la moyenne). Cette approche a l'avantage d'être plus informative que l'approche déterministe puisqu'elle tient en compte la variabilité de la consommation alimentaire entre les individus de la population étudiée. De plus, cette approche adoptée pour l'évaluation de l'exposition permet une estimation réaliste du niveau moyen et des forts quantiles de l'exposition, et est considérée comme étant un bon outil pour l'identification des groupes ou des tranches d'âge plus fortement exposés ainsi que pour l'identification des principaux groupes d'aliments contributeurs à l'exposition.

Cette étude concerne spécifiquement : 1) la quantification du niveau de contamination des noix et graines transformées en composés néoformés, 2) la caractérisation et la quantification des niveaux de consommation des noix et graines transformées par les adultes libanais, 3) l'identification de la typologie des consommateurs selon les niveaux de consommation ; en particulier, une caractérisation sociodémographique des sujets (âge, sexe, catégorie socioprofessionnelle, etc.) selon leurs comportements alimentaires pour identifier d'éventuels groupes à risque, et 4) l'évaluation de l'exposition des adultes libanais aux CNF suite à leur consommation des noix et graines transformées.

Tout d'abord, les niveaux de contamination des différents échantillons en CNF ont été déterminés. Les résultats montrent des niveaux moyens de contamination en CML de l'ordre de 18,3, 16,4, 15,4 et 13,7 ng/mg dans les pistaches, les cacahuètes, la tahina et les amandes respectivement. Les niveaux moyens de contamination en AGT ont été de l'ordre de 1,05, 0,82, 0,64 and 0,56 g/100g dans les pistaches, les amandes, les cacahuètes et la tahina respectivement. Les pistaches s'avèrent alors les plus contaminés par ces deux composés. En exprimant les niveaux de TFA en g/100 g de lipides, on trouve que ces niveaux dans les pistaches dépassent les limites imposées par la réglementation danoise (2g/100g). Par contre, aucune teneur limite maximale dans les aliments n'a été fixée pour la CML, ce qui rend une telle comparaison impossible pour le moment.

Après 3 mois de stockage à température ambiante, aucun changement significatif dans les teneurs en CML et AGT des échantillons commerciaux n'a pu être mis en évidence, ce qui signifie que ces molécules sont stables au cours du stockage.

Concernant les produits d'oxydation, les valeurs de *p*-anisidine ont varié entre 6,4 dans les amandes et 11,1 dans les pistaches grillées, alors que les valeurs de TBARS ont varié entre 3,3 dans les amandes et 6,2 mg equiv MDA/kg dans les pistaches grillées. Ces résultats indiquent qu'une oxydation lipidique a eu lieu au cours du procédé de transformation comme nous l'avons pu montrer dans le chapitre 1, et que ces produits d'oxydation ont persisté dans les produits finis pendant la commercialisation. Les échantillons de pistaches grillées s'avèrent les plus oxydés, suivis par la tahina, les cacahuètes, et finalement les amandes qui sont les moins oxydées. Après 3 mois de stockage à température ambiante, les valeurs de *p*-anisidine ont augmenté de manière significative ($P < 0,05\%$) de 16, 25, 33, et 34 %, et les valeurs de TBARS de 18, 29, 33, et 39% dans les amandes, tahina, cacahuètes, et pistaches respectivement. Ceci indique que l'oxydation lipidique se poursuivait au cours du stockage, et que cette détérioration est proportionnelle au niveau d'oxydation initial. Les noix et graines grillées ont donc une faible stabilité oxydative au stockage, ce qui implique une optimisation à la fois des conditions de production et de stockage afin d'obtenir un produit fini de meilleure qualité et de durée de vie plus longue. Nos résultats confirment ceux d'autres auteurs ; Chun et al. (2005) ont montré que les cacahuètes grillées étaient moins stables au stockage que les cacahuètes crues : sous les mêmes conditions de stockage (21°C, sous atmosphère normale), l'indice de peroxyde a atteint 47 mEq/kg après 12 semaines seulement dans les cacahuètes grillées, alors que celui des cacahuètes crues est resté au dessous d'une valeur de 2 mEq/kg même après 38 semaines. De même, 90% de la vitamine E s'est dégradé après 12 semaines de stockage dans les cacahuètes grillées, alors que plus de 70% est resté intact après 38 semaines dans les cacahuètes crues. Une telle instabilité au stockage est liée à la destruction des antioxydants naturels tels que les tocophérols, la décomposition des acides gras, et la rupture de la compartimentation cellulaire des noix et graines au cours de la torréfaction.

Les données de consommation alimentaire obtenues pour la population étudiée montrent que 90% de la population sont des consommateurs de tahina (consommation d'au moins 2 fois par mois), alors que 50%, 40%, et 60% sont des consommateurs d'amandes, pistaches et cacahuètes grillées respectivement. D'autre part, 29%, 16%, 2,5% et 9% de la population ont une consommation régulière (au moins une fois par jour) de tahina, d'amandes, de pistaches et de

cacahuètes grillées respectivement. Ces résultats montrent qu'une proportion non négligeable des Libanais incorpore les noix et graines transformées d'une manière régulière dans leur diète.

Les consommations médianes d'amandes, de pistaches, de cacahuètes, et de tahina ont été estimées à 8,4, 4,3, 17,3 et 18,9 g/personne/jour respectivement. La consommation de tahina s'avère donc la plus élevée, alors que la consommation de pistaches paraît la moins élevée. La comparaison de ces niveaux de consommation avec ceux obtenus à partir d'autres études s'est rendue difficile en raison de l'absence de ce type d'information au Liban. En effet, très peu d'études sur la consommation alimentaire des Libanais ont été réalisées. Les données fournies par les bilans alimentaires ainsi que les enquêtes ménagères (conditions de vie des ménages, 1997) se réfèrent aux aliments disponibles au sein du pays ou du ménage plutôt qu'à des données de consommation alimentaire effective. D'autre part, les enquêtes alimentaires individuelles déjà réalisées ne sont représentatives que pour des régions et des groupes de population très spécifiques (Baba et al., 1996 ; Baba et al., 1994 ; Cowan et al., 1964 ; Zein El Abidine, 1996 ; Soubra, 2008). Les résultats ne peuvent ainsi être interprétés qu'avec prudence. Dans une étude récente (Nasreddine et al., 2006), une enquête alimentaire individuelle a été réalisée sur une population adulte âgée de 25 à 54 ans et vivant à Beyrouth. Cette étude a montré une consommation moyenne de tahina de l'ordre de 3 g/personne/jour, ce qui représente un niveau de consommation beaucoup plus faible que celui trouvé dans notre étude. Or, une telle différence peut être expliquée par le fait que dans cette étude, portant sur la ration totale, la tahina figure uniquement en tant qu'item distinct, et sa consommation est par suite déduite à partir de ce seul item sans tenir compte de sa consommation en tant qu'ingrédient à partir de tous les plats possibles. De plus, dans l'étude citée plus haut, la liste des aliments formant le questionnaire de l'enquête est très longue, comptant plus de 100 aliments, ce qui peut conduire à une sous-estimation de la consommation pour un aliment déterminé de la liste en raison de la fatigue de l'enquêté. Dans la même étude, la consommation des noix, graines et olives a été estimée à 12,8 g/personne/jour. La comparaison de nos résultats avec cette valeur est difficile, puisque cette étude ne précise pas sous quelle forme ces noix et graines sont consommées (cruës ou grillées), de plus les olives sont incluses dans ce groupe d'aliments.

La typologie des consommateurs a été ensuite effectuée à partir d'une analyse de données se déroulant en deux temps : une analyse en composantes principales (ACP) puis une classification

ascendante hiérarchique (CAH). Ces méthodes font partie des techniques d'analyses multidimensionnelles permettant de représenter de façon synthétique de vastes ensembles constitués d'un grand nombre d'individus et de variables quantitatives ou qualitatives. L'ACP nous a fourni une vue d'ensemble de l'information en réduisant le nombre de variables (les plats consommés). Quatre axes ont été retenus pour l'analyse, restituant près des deux tiers de l'information initiale. Le premier facteur en faisant émerger une corrélation avec les variables GO1, GO2, GO3 et GO7 (voir annexe 8 pour les codes) distingue les caractéristiques liées à la consommation des noix grillées. Le deuxième facteur est défini essentiellement par les données relatives aux pépins grillés (pépins de citrouille, de melon et de tournesol). Le troisième facteur se définit plus spécifiquement à partir des variables liées aux préparations sucrées à base de tahina. Le quatrième facteur distingue les plats et hors d'œuvre préparés à partir de la tahina. A l'issue de l'analyse en composantes principales, la classification ascendante hiérarchique a conduit à une typologie en 4 classes. La classe 1 regroupe les individus présentant une consommation forte en pépins grillés et se caractérise essentiellement par une majorité de femmes au foyer appartenant aux 2 groupes d'âge 25-34 et 35-44 ans. Le groupe d'âge 55-64 ans n'est pas représenté dans cette classe. La classe 2 regroupe les individus à forte consommation de noix grillées avec une majorité de femmes âgées entre 25 et 34 ans et exerçant une fonction de technicien supérieur/enseignant/chef d'entreprise. Les personnes les plus âgées (55-64 ans) ne sont pas représentées dans cette classe. La classe 3 regroupe les individus à forte consommation en plats à base de tahina et se caractérise par une majorité de jeunes hommes (25-34 ans). Enfin, la classe 4 est formée d'individus à forte consommation en préparations sucrées à base de tahina et se distingue par une majorité d'hommes et de femmes mariés, femmes au foyer ou retraités, appartenant au groupe d'âge 55-64 ans. La fréquence des individus appartenant à cette classe augmentait avec l'âge. Cette typologie des consommateurs fait donc ressortir plusieurs éléments intéressants : elle souligne l'influence de l'âge, du sexe, du statut marital et de l'activité professionnelle sur les différentes modalités de consommation. En effet, la prédominance des individus exerçant une activité professionnelle supérieure, associée à un niveau socio-économique élevé, dans la classe à haute consommation de noix grillées, indique un pouvoir d'achat élevé puisque ces produits sont considérés relativement chers. Les préparations sucrées à base de tahina sont plus populaires parmi les plus âgés puisque ces plats sont considérés typiquement traditionnels dans la cuisine libanaise. Enfin, les individus les plus âgés (55-64 ans)

présentent une consommation très faible en noix et pépins grillés puisque les individus à cet âge peuvent avoir une fonction masticatrice moins performante ou des prothèses dentaires mal adaptées (Hatch et al., 2001), les conduisant à se priver de ces produits difficiles à mâcher.

Le croisement des données de consommation issues du questionnaire et des teneurs en CNF dans les noix et graines transformées a permis de calculer une valeur d'exposition journalière pour chaque individu et d'obtenir la distribution des expositions sur toute la population. Dans cette partie, nous avons tenté d'évaluer cette exposition à partir de bases scientifiques actuelles potentiellement exploitables pour l'évaluation scientifique des risques liés aux composés néoformés.

Concernant les AGT, et faute d'études toxicologiques, il faudra probablement interpréter les résultats sur la base de risque de MCV. L'OMS préconise une consommation d'acides gras trans quotidienne n'excédant pas **1%** de l'apport énergétique total quotidien et la communauté scientifique admet que moins nous ingérons d'acides gras trans autres que ceux naturellement présents dans les produits animaux, meilleur cela s'avère pour notre santé. Dans son rapport de 2005, l'AFSSA avait réalisé une analyse très complète des données scientifiques expérimentales et épidémiologiques des effets biologiques des AGT. Elle avait confirmé, comme l'avait fait également l'AESA (Autorité européenne de sécurité alimentaire), le taux de **2%** de l'apport énergétique total d'AGT comme le seuil à partir duquel était observée une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (Léger & Razanamahefa, 2005). Pour un individu libanais adulte ayant un apport énergétique total quotidien de 2500 Kcal (Nasreddine et al., 2006), ce seuil de 2% correspondrait à un apport de 5 g d'AGT par jour à ne pas dépasser. Nous avons alors considéré cette valeur comme valeur toxicologique de référence et l'avons adoptée pour le reste de l'étude.

Similairement, il n'existe pas de valeur toxicologique de référence pour l'exposition à la CML. Cependant, dans une étude clinique récente (Birlouez-Aragon et al., 2007), portant sur des volontaires sains, non fumeurs et soumis à deux régimes alimentaires contrastés quant à leur niveau de contamination en composés néoformés (régime standard constitué de produits grillés et frits, riches en composés néoformés indésirables et un régime vapeur, équivalent sur le plan nutritionnel, mais dont tous les aliments ont subi des transformations douces limitant la production des contaminants néoformés) a permis montrer qu'une exposition quotidienne à 6 mg

de CML (Lecerf et al., 2008) induits chez les sujets sains des changements métaboliques à l'origine de risques de maladies cardiovasculaires et de diabète. Cette étude constitue jusqu'ici la seule information scientifique concernant les effets d'une exposition à la CML, pour cela la valeur de 6 mg de CML par jour sera adoptée dans cette étude en tant que valeur toxicologique de référence.

Les apports journaliers moyens en CML et AGT à travers la consommation des noix et graines dans leur ensemble ont été estimés à 0,76 mg CML/personne/jour et 0,32g TFA/personne/jour, représentant respectivement 13 et 7% des valeurs toxicologiques de référence correspondantes. Aucune différence d'exposition significative n'a été trouvée concernant le sexe et l'âge. Les femmes et les hommes sont exposés de manière égale à la CML et aux AGT à travers leur consommation totale en noix et graines. Cependant, en prenant chaque produit à part, les hommes montrent une exposition plus élevée à la CML et aux AGT à travers une consommation en tahina, alors que les femmes ont une exposition plus élevée à travers une consommation en amandes et pistaches grillées. Parmi les hommes, ce sont les plus jeunes (25-34 ans) qui sont les plus exposés à la CML et aux AGT, cette exposition diminuant avec l'âge. Parmi les femmes, le groupe d'âge moyen (45-54 ans) paraît le plus exposé, cette exposition augmentant avec l'âge jusqu'à 45-54 ans puis diminuant à l'âge 55-64 ans.

Pour les forts consommateurs de CML et AGT (95^{ème} percentile de la population), les apports étaient approximativement multipliés par un facteur de huit, soit 6,15 mg/personne/jour pour la CML et 2,94 g/personne/jour pour les AGT, avec des pourcentages de contribution de 103% et 59% de la valeur de référence respectivement. Au percentile 95^{ème} de l'exposition, les valeurs d'exposition à la CML par la seule consommation des oléagineux dépassent alors la valeur limite. Seulement 0,25% des individus dépassent la valeur toxicologique de référence pour la CML, tandis qu'aucun individu n'a une exposition qui dépasse la valeur recommandée pour les AGT. Bien que les échantillons de pistaches aient été les plus contaminés en CML et AGT, le principal oléagineux contributeur à l'exposition des libanais à la CML et aux AGT a été la tahina (38% et 32% de contribution à l'exposition totale respectivement). Elle est suivie des cacahuètes (36 et 31 % respectivement), des amandes (25 et 20% respectivement) et enfin des pistaches (10 et 13% respectivement). La contribution des différents types d'oléagineux à l'exposition totale semble alors être conditionnée par les niveaux de consommation plutôt que les niveaux de contamination.

Bien que ces résultats ne montrent pas un risque réel pour le consommateur moyen, cependant il paraît nécessaire de porter une attention particulière à l'exposition de certains groupes de population tels que les forts consommateurs pour lesquels le risque d'être exposés à un niveau supérieur aux valeurs toxicologiques de référence vis-à-vis des CNF étudiés n'est pas nul, sachant qu'aux noix et graines transformées vient s'ajouter une liste non négligeable d'aliments contributeurs à l'exposition aux CNF. Le fait que les CNF constituent des risques alimentaires potentiels pour un sous-groupe de la population nécessite par la suite l'emploi d'une méthode plus exhaustive pour évaluer l'exposition actuelle à ces molécules à partir de tous les aliments de la diète potentiellement contributeurs. Finalement, et puisque les noix et graines sont connues pour leurs effets bénéfiques pour la santé, se baser sur des scénarios extrêmes pourrait être surprotecteur et priver le consommateur de ces bienfaits bien connus. En effet, il est aussi nuisible de surestimer le risque que de le sous-estimer. Faut-il donc recommander la consommation de noix et graines transformées ou la déconseiller? Dans ce cas, une approche risques/bénéfices semble être nécessaire.

En termes d'applications pratiques, notre travail débouche sur les conclusions, les recommandations, et les perspectives suivantes :

1. Concernant la chaîne de transformation :

- Les étapes actuelles de transformation des noix et graines sont responsables de l'amplification des réactions de Maillard et d'oxydation, par conséquent de la formation et de l'accumulation des CNF, principalement les produits d'oxydation, la CML et les AGT, ainsi que de la dégradation de la qualité nutritionnelle, notamment les acides gras essentiels, les tocophérols et les polyphénols.
- Plusieurs étapes du procédé de transformation ont été jugées critiques. Les étapes de torréfaction des noix et du sésame, de broyage des graines de sésame et de la stérilisation de la tahina sont toutes impliquées dans le développement de ces réactions de détérioration. Cependant, la torréfaction se révèle particulièrement déterminante pour la qualité chimique et nutritionnelle du produit fini.
- Suite à ce criblage des étapes critiques du procédé, des modifications et améliorations techniques doivent être apportées à la chaîne de transformation. Plusieurs modifications

ont été proposées dans cet ouvrage, cependant il convient de les tester ultérieurement sur la chaîne de transformation. L'étude de l'efficacité de certaines technologies alternatives (chauffage ohmique, microondes, haute pression, etc.) peut être aussi envisagée. L'optimisation de cette dernière permettrait d'obtenir des produits finis de meilleure qualité, et dont le contenu en CNF est minimal.

- Une perspective importante de ce travail serait de rajouter parmi les indicateurs de qualité des noix et graines transformées, d'autres CNF tels que l'acrylamide, les oxyphytostéroïdes et les HAP fortement susceptibles d'être présents dans ce type d'aliments.
- Il nous semble aussi important de réaliser des expériences complémentaires sur l'étude de la torréfaction, afin de proposer des modèles permettant de déterminer à terme des conditions (durée, température) à ne pas dépasser pour obtenir un produit torréfié possédant à la fois une qualité chimique, nutritionnelle et organoleptique optimale.

2. Concernant la fluorescence frontale en tant qu'outil de suivi de la qualité :

- Les résultats de ce travail montrent que la spectroscopie de fluorescence frontale est une méthode très sensible aux modifications apportées par le procédé de transformation.
- Cette fluorescence a pu fournir des renseignements pertinents sur le degré d'oxydation et de thermo-dégradation des lipides des noix et graines transformées.
- Les modèles d'étalonnage des CNF dans les produits industriels ont permis l'identification des profils de fluorescence pertinents pour la prédiction des CNF.
- La décomposition multivoie PARAFAC du signal corrigé de fluorescence frontale, associée aux régressions multivariées, notamment la régression linéaire multiple, semble être une stratégie pertinente pour contrôler la qualité des procédés et pour prédire de manière satisfaisante les CNF dans les noix et graines.
- Nous pouvons conclure que la technique de fluorescence en mode frontal est un outil très prometteur qui peut être utilisé comme méthode alternative pour évaluer la qualité de ce type de produits.
- Il faut noter que ces modèles de calibration développés doivent encore faire l'objet d'une validation sur un échantillon assez large et représentatif.
- Il serait aussi intéressant d'étudier si un modèle universel peut être construit pour prédire les CNF quelque soit le type de noix et de graine.

3. Concernant le niveau d'exposition des Libanais adultes aux CNF :

- Les résultats ont montré que les AGT sont présents, d'une façon générale dans les noix et graines transformées présentes sur le marché libanais, à des taux conformes aux normes européennes en vigueur. Cependant des cas de dépassement des limites maximales dans certains échantillons de pistaches analysés ont été observés.
- S'agissant de la CML une telle comparaison n'est pas possible faute de limites maximales fixées. Cependant les résultats montrent que les niveaux de CML dans ces produits ne sont pas négligeables.
- L'étude de consommation alimentaire des noix et graines transformées nous a permis de fournir une typologie des consommateurs intéressante, permettant de décrire et d'analyser les patterns de consommation parmi les différents individus.
- Il semble nécessaire que soit portée une attention particulière à l'exposition de certains groupes de population tels que les forts consommateurs pour lesquels le risque d'être exposés à un niveau supérieur aux valeurs toxicologiques de référence vis-à-vis des CNF étudiés n'est pas nul, sachant qu'aux noix et graines transformées vient s'ajouter une liste non négligeable d'aliments contributeurs à l'exposition aux CNF.
- On ne sait pas encore de manière très précise à quoi correspondent ces niveaux d'exposition en termes de risque. Cependant, nous avons tenté dans ce travail d'engager une évaluation de l'exposition à la lumière des données existantes et sans attendre le parachèvement des travaux d'évaluation scientifique du risque lié aux CNF. Cette étude constitue alors une étape préliminaire vers une future évaluation du risque plus pointue lorsque des données scientifiques suffisantes seront disponibles.
- Par ailleurs, il est recommandé d'examiner la situation d'une façon plus détaillée (recherche d'autres CNF tels que les oxyphytostérols, l'acrylamide, les HAP, le furane, etc.) et plus étendue (touchant d'autres secteurs) pour juger de la sécurité chimique en termes de CNF de la diète libanaise totale.
- Il est également recommandé de mettre à jour régulièrement ce type de travail afin d'observer les tendances de l'évolution des risques liés à ces substances suite aux modifications des comportements alimentaires et/ou des niveaux de contamination des denrées alimentaires par ces substances.

BIBLIOGRAPHIE

-A-

Abbey, M., Noakes, M., Belling, G. B., Nestel, P. J. Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers total plasma cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1994, **59**, 995-999.

Abou-Gharbia, H. A., Shehata, A. A. Y., Youssef, M., Shahidi, F. Oxidative Stability of Sesame Paste (Tehina). *Journal of food Lipids*, 1996, **3**, 129-137.

Ackman, R. G., Hooper, S. N., Hooper, D. L. Linolenic acid artefacts from the deodorization of oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1974, **51**, 42-49.

Addis P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 1986, **24**, 1021-1030.

Adrian J., Billaud C., Potus J. Les manifestations de la réaction de Maillard en nutrition et pathologie. *Médecine et nutrition*, 2000, **36**, 69-89.

Adrian, J., Potus, J., Frangne, R. *La Science Alimentaire de A à Z*, Paris: Lavoisier Tec & Doc ed, 1999.

AFNOR NF EN ISO 15304. Détermination de la teneur en isomères *trans* d'acides gras de corps gras d'origine végétale. Agence Française de Normalisation, Paris, France, 2002.

AFNOR NF V 03-030. Produits agricoles et alimentaires-Extraction de la matière grasse en vue de sa caractérisation. Agence Française de Normalisation, Paris, France, 1991.

AFSSA. Acrylamide : point d'information. Saisine n° 2002-SA-0125, 2002.
<http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Acrylamide-point-info-24-07-02.pdf>

AFSSA. Estimation de l'exposition à l'acrylamide de la population française (adultes et enfants), Note technique OCA/AT/2004-232, 2004.

Ahmed, M. U., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. Identification of N^ε-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, **261**, 4889-4894.

Ahmed, E. M., Young, C. T. Composition, quality, and flavor of peanuts. In *Peanut Science and Technology*. H. E. Pattee, Young, C. T. (eds.), Yoakum, Texas: Amer. Peanut Res. & Educ. Soc., Inc., 1982, p. 655-688.

Ait Ameer, L. Evolution de la qualité nutritionnelle des protéines de biscuits modèles au cours de la cuisson au travers d'indicateurs de la réaction de Maillard: intérêt de la fluorescence frontale. *PhD thesis*, Institut National Agronomique Paris Grignon, France, 2006 (<http://pastel.paristech.org/2269>).

Ajandouz, E. H., Puigserver, A. Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**, 1786-1793.

Albani, J. R. *Absorption et Fluorescence Principes et applications*. Tec&Doc Ed., Paris, France, 2001.

Albert, C. M, Gaziano, J. M, Willett, W. C., Manson, J.E. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' Health Study. *Archives of Internal Medicine*, 2002, **162**, 1382-1387.

Allais, I., Edoura-Gaena, R.-B., Dufour, É. Characterisation of lady finger batters and biscuits by fluorescence spectroscopy – Relation with density, color and texture. *Journal of Food Engineering*, 2006, **77**, 896-909.

Allais, I., Viaud, C., Pierre, A., Dufour, É. A rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of the texture of meat emulsions and frankfurters. *Meat Science*, 2004, **67**, 219-229.

Alstrup, K. K., Gregersen, S., Jensen, H. M., Thomsen, J. L., Hermansen, K. Differential effects of *cis* and *trans* fatty acids on insulin release from isolated mouse islets. *Metabolism*, 1999, **48**, 22-29.

Amaral, J. S., Casal, S., Seabra, R. M., Oliveira, B.P. Effects of roasting on hazelnut lipids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006, **54** (4), 1315-21.

Amarowicz, R., Troszyńska, A., Shahidi, F. Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *Journal of Food Lipids*, 2005, **12**, 344-358.

Ames, J. M. The Maillard browning reaction: an update. *Chemistry and Industry*, 1988, **5**, 558-561.

Ames, J. M. Melanoidins as pro- or antioxidants. *Cerevisia*, 2001, **26**, 210-216.

Ames, J. M., Bates, L., Mcdougall, D. B. Colour development in an intermediate moisture Maillard model system. In *The Maillard reactions in chemistry, food and health*. Labuza T. P., Reineccius G. A., Monnier V. M., O'brien J., Baynes J. W., Ed., London: Roy. Soc. Chem., 1993, p. 120-126.

Andersson, C. A., Bro, R. The N-way toolbox for Matlab. *Chemometrics and Intelligent Laboratory systems*, 2002, **52**, 1-4, toolbox disponible sur le site (<http://www.models.kvl.dk/source/>).

Anderson, M. M., Requena, J. R., Crowley, J. R., Thorpe, S. R., Heinecke, J. W. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *Journal of Clinical Investigations*, 1999, **104**, 103-113.

Anderson, J. W., Smith, B. M., Gustafson, N. J. Health benefits and practical aspects of high fiber diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1994, **59**,1242S–7S.

Andreoni, N. Hazelnut phenolic substances as natural antioxidants. *Acta Horticulturae*, 1996, **445**, 217-221.

Arnoldi, A., Arnoldi, C., Baldi, O., Ghizzoni, C. Effect of lipids in the Maillard reaction. In *The Maillard reactions in food processing, human nutrition and physiology*. Finot P. A., Aeschbacher H. U., Hurrell R. F., Liardon R., Ed., Birkhäuser, 1990, p.133-138.

Ashoor, S. H., Zent J. B. Maillard browning of common amino-acid. *Journal of Food Science*, 1984, **49**, 1206-1207.

Asakawa, T., Matsushita, S. Thiobarbituric test for detecting lipid peroxides. *Lipids*, 1980, **14**, 400.

Assoumani, M. B., Maxime, D., N'guyen, N. P. Evaluation of a lysine-glucose Maillard model system using three rapid analytical methods. In *The Maillard reactions in chemistry, food and health*. Labuza T. P., Reineccius G. A., Monnier V. M., O'brien J., Baynes J. W. (Eds.), London: Roy. Soc. Chem., 1993, p. 43-48.

Aubourg, S. P., Medina, I. Influence of storage time and temperature on lipid deterioration during cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, **79**, 1943-1948.

-B-

Baba, N. H., Shaar, K., El Sheikh Ismail, L., Adra, N. Comparison of nutritional status of preschool children at day care centers and at home from different socioeconomic backgrounds in Beirut. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 1996, **9**, 89-103.

Baba, N. H., Shaar, K., Hamadeh, S., Adra, N. Nutritional status of Bedouin children aged 6–10 years in Lebanon and Syria under different nomadic pastoral systems. *Ecology of Food and Nutrition*, 1994, **32**, 247-59.

Bakker, N., van't Veer, P., Zock P. L. Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon: An ecological study. *International Journal of Cancer*, 1997, **72**, 587-597.

Baltes, W., Bochmann, G. Model reactions on roast aroma formation. II.-Mass spectrometric identification of furans and furanones from the reaction of serine and threonine with sucrose under the conditions of coffee roasting. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 1987, **184**, 179-186.

Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., Lister, S. J. Standard normal variate transformation and detrending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 1989, **45**, 772-777.

Barrett-Connor E. Diet assessment and analysis for epidemiologic studies of osteoporosis. In: *Nutritional Aspects of Osteoporosis*. Burckhardt, P., Heaney, R.P. (eds.), New York: Raven Press; 1991, 91-98.

Basha, S. M., Young, C. T. Changes in the polypeptide composition of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed during roasting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1985, **33**, 350-354.

Baunsgaard, D. Analysis of color impurities in sugar processing using fluorescence spectroscopy and chemometrics. PhD thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, 2000.

Becker, E. M., Christensen, J., Frederiksen, C. S., Haugaard, V. K. Front-face fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of yogurt: Rapid analysis of riboflavin. *Journal of Dairy Science*, 2003, **86** (8), 2508-2515.

Bedigian D. History and lore of sesame in Southwest Asia. *Economic Botany*, 2004, **58** (3), 329-353.

Berset, C., Cuvelier, M. E. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments*, 1996, **16**, 219-245.

Bertrand, D., Dufour, E. *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Tec & Doc., 2000.

Bertrand D., Scotter, C. N. G. Application of multivariate analysis to NIR spectra of gelatinized starch. *Applied Spectroscopy*, 1992, **46** (9), 1420-1425.

Bett, K. L., Bobylston, T. D. Effect of storage on roasted peanut quality, in *Lipid Oxidation in Foods*, American chemical Society, USA, 1992, p. 322-343.

Biedermann, M., Noti, A., Biedermann-Brem, S., Mozzetti, V., Grob, K. Experiments on acrylamide formation and possibilities to decrease the potential of acrylamide formation in potatoes. Official Food Control Authority of the canton of Zurich, 2002.

Bieri, J. G., Evarts, R. P. Tocopherols and fatty acids in American diets: the recommended allowance for vitamin E. *Journal of American Dietetic Association*, 1973, **62**, 147-151

Billeaud C., 2000. Implication des acides gras trans alimentaires chez la femme enceinte. *Oléagineux, corps gras, lipides*, **7**, 50-53.

Birlouez-Aragon, I., 2007. The need for well controlled clinical assays to evaluate the bioavailability and health impact of Maillard products in humans. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2007, **51**(suppl 1), 1-422.

Birlouez-Aragon, I., Girard, F., Ravelontseheno, L., Bourgeois, C., Belliot, J. P., Abitbol, G. Comparison of two levels of vitamin C supplementation on antioxidant vitamin status in elderly institutionalized subjects. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1995, **65**, 261-266.

Birlouez-Aragon, I., Leclère, J., Ouedraogo, C. L., Birlouez, E., Grongnet, J. F. The FAST method, a rapid approach of the nutritional quality of heat-treated foods. *Nahrung/Food*, 2001, **45** (3), 201-205.

Birlouez-Aragon, I., Locquet N., De St Louvent, E., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Stahl P. Evaluation of the Maillard reaction in infant formulas by means of front face fluorescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, **1043**, 308-318.

Birlouez-Aragon, I., Nicolas, M., Metais, A., Marchond, N., Grenier, J., Calvo, D. A. Rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk. *International Dairy Journal*, 1998, **8** (9), 771-777.

Birlouez-Aragon, I., Pischetsrieder, M., Leclère, J., Morales, F. J., Hasenkopf, K., Ducauze, C., Rutledge, D. Loss of nutritional quality and chemical safety in heat processed infant formulas. *Food Chemistry*, 2004, **87**, 253–259.

Birlouez-Aragon, I., Tessier, F. J. Antioxidant vitamins and degenerative pathologies: a review of vitamin C. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 2003, **7**, 103-109.

Biro, G., Ovesen, L., Cruz, A. Selection of a methodology to assess food intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002, **56**, 25S-32S.

Bolland, J. L., Gee, G. Kinetic studies in the chemistry of rubber and related material. II. The kinetics of oxidation of unconjugated olefins. *Transactions of the Faraday Society*, 1946, **42**, 236-243, DOI: 10.1039/TF9464200236.

Bonomi, F., Mora, G., Pagani, M. A., Lametti, S. Probing the structural features and the solvation behaviour of wheat proteins by front-face fluorescence. *Analytical Biochemistry*, 2004, **329** (1), 104-111.

Bonvehí, J. S., Coll, F. V. Oil content, stability, and fatty acid composition of the main varieties of Catalonian hazelnuts (*Corylus avellan* L.). *Food Chemistry*, 1993, **56**, 39-44.

Borrelli, R. C., Fogliano, V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2005, **49**, 673-678.

Bosch, L., Alegria, A., Farre, R., Clemente, G. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. *Food chemistry*, 2007, **105** (3), 1135-1143.

Bostoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J. and Trakatellis, A. G. Rapid sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**, 1931-1937.

Botta, R., Gianotti, C., Richardson, D., Suwanagul, A., Sanz, C. L. Hazelnut variety organic acids, sugars, and total lipid fatty acids. *Acta Horticulturae*, 1994, **351**, 693-700.

Boue, C., Combe, N., Billeaud, C., Entressangles, B. Nutritional implications of trans fatty acids during perinatal period, in French pregnant woman. *Oléagineux, corps gras, lipides*, 2001, **8**, 68-72.

Bray, G. A., Lovejoy, J. C., Smith, S. R., et al. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *Journal of Nutrition*, 2002, **132**, 3488-2491.

Breitling-Utzmann, C. M., Unger, A., Friedl, D. A., Lederer, M. O. Identification and quantification of phosphatidylethanolamine-derived glycosylamines and aminoketoses from human erythrocytes-Influence of glycation products on lipid peroxydation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, **391**, 245-254.

Bro, R. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory systems*, 1997.

Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A., Vlassara, H. Lipid advanced glycosidation: Pathway for lipid oxidation *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1993, **90**, 6434-6438.

Buckholz, L. L., Daun, H., Stier, E. Influence of roasting time on sensory attributes of fresh roasted peanuts. *Journal of Food Science*, 1980, **45**, 547-554.

Buedge, J. A., Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In *Biomembranes (Part C: Biological Oxidation)*, *Methods in Enzymology*, Fleisher S.F. & Packer L. (Eds.) London Academic Press, 1978, Vol.52, p. 302-309.

Buera, P., Chirife, J., Resnik, S. L., Wetzeler, G. Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to Maillard reaction between different single sugars and glycine in comparison with caramelization browning. *Food Chemistry*, 1987, **52**, 1063-1067.

Burcham, P. C., Kuhan, T. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malonaldehyde. *Biochemical and Biophysical Communications*, 1996, **220**, 996-1001.

-C-

Cai, J., Hurst, H. E. Identification and quantitation of *N*-(carboxymethyl)valine adduct in hemoglobin by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 1999, **34**, 537-543.

Cammarn, S. R., Langue, T. J., Beckett, G. D. Continuous fluidized-bed roasting. *Chemical Engineering Progress*, 1990, 40-46.

Cämmerer, B., Kroh, L. W. Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. *Food Chemistry*, 1995, **53**, 55-59.

Cämmerer, B., Jalyschko, W., Kroh, L. W. Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 2083-2087.

Carroll, J. D., Chang J. J. Analysis of individual differences in multidimensional scaling via n-way generalization of Eckart-Young decomposition. *Psychometrika*, 1970, **35** (3), 283-319.

Cattell, R. B. Parallel proportional profiles and other principles for determining the choice of factors by rotation. *Psychometrika*, 1944, **9**, 267-283.

CDR, 2002. Schéma d'aménagement du territoire libanais. Rapport provisoire : synthèse, situation existante. Beyrouth : Conseil du développement et de la reconstruction (CDR-Liban), Dar al-Handassah (Liban) et IAURIF (Institut d'Aménagement et d'Urbanisme de la Région d'Ile-de-France, 154 p.

Chan, H. W. S., Prescott, F. A. A., Swoboda, P. A. T. Thermal decomposition of individual positional isomers of methyl linoleate hydroperoxide: evidence of carbon-oxygen bond scission. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1976, **50**, 572-576.

Chang, L. W., Yen, W. J., Huang, S. C., Duh, P. D. Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry*, 2002, **78**, 347-354.

Charissou, A., Ait-Ameur, L., Birlouez-Aragon, I. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *Journal of Chromatography A*, 2007, **1140**, 189-194.

Cheftel, J. C., Cheftel, H. *Introduction à la biochimie et à la biotechnologie des aliments*. Lavoisier Technique et Documentation, Paris, 1977, Volume 1, 381p.

Cheikhousman, R., Zude, M., Bouveresse, D. J.-R., Rutledge, D. N., Birlouez-Aragon, I. Fluorescence spectroscopy for monitoring extra virgin olive oil deterioration upon heating. *Czech Journal of Food Science*, 2004, **22**, 147-150.

Cheikhousman, R., Zude, M., Bouveresse, D. J.-R., Léger, C. L., Rutledge, D. N., Birlouez-Aragon, I. Fluorescence spectroscopy for monitoring extra virgin olive oil deterioration during heating. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, **382**, 1438-1443.

Chen, J., Gao, J. The Chinese total diet study in 1990. Part II. Nutrients. *Journal of AOAC International*, 1993, **76** (6), 1206-1213.

Chen, H., Li, D., Saldeen, T., et al. Mixed tocopherol preparation is superior to alpha-tocopherol alone against hypoxia-reoxygenation injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **291**, 349-353.

Chen C., Milbury, P. E., Lapsley, K., Blumberg, J. B. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance Hamster and human LDL resistance to oxidation. *Journal of Nutrition*, 2005, **135**, 1366-1373.

Chevallier, S., Colonna, P., Della Valle, G., Lourdin, D. Contribution of major ingredients during baking of biscuit dough systems. *Journal of Cereal Science*, 2000, **31**, 241-252.

Chiou, R. Y. Y. Antioxidative activity in oils prepared from peanut kernels subjected to various treatments and roasting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1992, **40**, 1958-1962.

Chiou, R. Y. Y., Chang, Y. S., Tsai, T. T. Variation of flavor related characteristics of peanuts during roasting as affected by initial moisture contents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1991, **39**, 1155-1158.

Chiou, R. Y. Y., Cheng, S. L., Tseng, C. Y., Lin, T. C. Flavor fortification and characterization of raw peanut oils subjected to roasting with partially defatted peanut meal under various atmospheric conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1993, **41**, 1110-1113.

Chiou, R. Y. Y., Tsai, T. T. Characteristics of peanut proteins during roasting as affected by initial moisture content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1989, **37**, 1377-1381.

Chisholm, A., Mann, J., Skeaff, M., Frampton, C., Sutherland, W., Duncan, A., Tiszavari, S. A diet rich in walnuts favourably influences plasma fatty acid profile in moderately hyperlipidaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1998, **52**, 12-16.

Christensen, J. Autofluorescence of Intact Food - An Exploratory Multi-way Study. PhD thesis. Quality and Technology, Department of Food Science, 2005.

Christensen, J., Becker, E. M., Frederiksen, C. S. Fluorescence spectroscopy and PARAFAC in the analysis of yogurt. *Chemometrics and Intelligent Laboratory systems*, 2005, **75** (2), 201-208.

Christensen, J., Povlsen, V. T., Sorensen, J. Application of fluorescence spectroscopy and chemometrics in the evaluation of processed cheese during storage. *Journal of Dairy Science*, 2003, **86** (4), 1101-1107.

Christiansen, E., Schnider, S., Palmvig, B., Tauber-Lassen, E., Pedersen, O. Intake of a diet high in trans monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM. *Diabetes Care*, 1997, **20**, 881-887.

Chun, J., Lee, J., Eitenmiller, R. R. Vitamin E and oxidative stability during storage of raw and dry roasted peanuts packaged under air and vacuum. *Journal Food Science*, 2005, **70** (4), 292-297.

Cillard, J., Cillard, P. Pro-oxidant effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 1980, **34** (3), 579-592.

CIRC. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Acrylamide*. [60], 389-433, 1994, Lyon, France, International Agency for Research on Cancer.

Clotet, R., Erruz, E., Valero, J. Brunissement non enzymatique dans un aliment complexe en fonction du temps, de l'activité de l'eau, du pH et de la température : corrélations. *IAA*, 1994, **111**, 667-670.

Combe, N., Boue, C., Entressangles, B. Consommation en acides gras trans et risque cardiovasculaire : étude Aquitaine. *Oléagineux, corps gras, lipides*, 2000, **7**, 30-34.

Cooney, R.V., Custer, L.J., Okinaka, L. & Franke, A.A. Effects of dietary sesame seeds on plasma tocopherol levels. *Nutrition and Cancer*, 2001, **39** (1), 66-71.

Corongiu, F. P., Banni, S. Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods in Enzymology*, 1994, **233**, 303-313.

Cowan, J. W., Chopra, S., Houry, G. Dietary surveys in rural Lebanon. *Journal of the American Dietetic Association*, 1964, **30**, 753-6.

Crastes de Paulet, A., Astruc, M. E., Bascoul, J. Les oxystérols: Propriétés biologiques et problèmes nutritionnels. *Biologie des Lipides Chez L'homme*. L. Dousta-Blazy and F. Mendy, Ed.Medicales Internationales, Paris, 1988, p.154-174.

Cuadrado, C., Kumpulainen, J., Moreiras, O. Lead, cadmium and mercury contents in average Spanish market basket diets from Galicia, Valencia, Andalucia and Madrid. *Food Additives and Contaminants*, 1995, **12** (1), 107-118.

Cuq, J. L. Qualité de nos aliments et technologies. In *Alimentation et nutrition humaines*, Dupin H., Paris: ESF editeur, 1992, p. 1235-1259.

-D-

Dagher, S. M. Traditional foods in the Near East. *Food and Nutrition paper (FAO)*, n° 50 / Rome (Italie), 1991, pp 131-135.

Damame, S. V., Chavan, J. K., Kadam, S. S. Effect of roasting on protein and oil in peanut kernels. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1990, **40** (2), 143-148.

De Jong, N., Plat, J., Mensink, R. P. Metabolic effects of plant sterols and stanols. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003, **4**, 362-369.

Devinat, G., Scamaroni, L., Naudet, M. Isomérisation de l'acide linoléique durant la désodorisation des huiles de colza et de soja. *Revue Française des Corps Gras*, 1980, **27**, 283-287.

Dhale, L. K., Hill, E. G., Holman, R. T. the thiobarbituric acid reaction and the autoxidation of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1962, **98**, 253-261.

Dills W. L. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1993, **58**, 779-787.

Djurkov, T. G., Elenkov, V. R.. *Kinetics of Sesame roasting in rotation-pulsed fluidized bed apparatus*. 2nd Symposium of South-East European Countries (SEEC) on Fluidized Beds in Energy Production, Chemical and Process Engineering and Ecology. Arandjelovac, Yugoslavia, Sept. 1999.

Djurkov, T. G., Elenkov, V. R., Kondov P. S. Laboratory rotation-pulsed fluidized bed dryer for bioproducts. Second international conference of laboratory equipment, Laborbio, Plovdiv, 1989.

Dufour, E., Devaux, M. F., Fortier, P., Herbert, S. Delineation of the structure of soft cheeses at the molecular level by fluorescence spectroscopy - relationship with texture. *International Dairy Journal*, 2001, **11** (4-7), 465-473.

Dufour, E., Frencia, J. P. Les spectres de fluorescence frontale : Une empreinte digitale de la viande. *Viandes et Produits Carnés*, 2001, **22** (1), 9-14.

Dufour, E., Frencia, J. P., Kane, E. Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. *Food Research International*, 2003, **36**, 415-423.

Dufour, É., Karoui, R., Bosset, J. O. Utilisation de la fluorescence frontale intrinsèque de fromages de type L'Étivaz AOC et Gruyère AOC pour reconnaître leur origine géographique. *Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène (Mitt. Lebensm. Hyg.)*, 2003, **94**, 379-393.

Dufour, É., Letort, A., Laguet, A., et al. Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **563**, 292-299.

Dufour, E., Lopez, C., Riaublanc, A., Mouhous Riou, N. La spectroscopie de fluorescence frontale: une approche non invasive de la structure et des interactions entre constituants des aliments. *Agoral*, 1998, **10**, 209-215.

Dufour, E., Riaublanc, A. Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products. I. Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Lait*, 1997, **77**, 657-670.

Duh, P. D., Yen, G. C. Antioxidant Efficacy of Methanolic Extracts of Peanut Hull in Soybean and Peanut Oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1997, **74**, 745-748.

Dunn, J. A., Ahmed, M. U., Murtiashaw, M. H., et al. Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of N-ε-(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochemistry*, **29**, 1990, 10964-10970.

Dunn, J. A., Mc Cance, D. R., Thorpe, S. R., Lyons, T. J., Baynes, J. W. Age-dependant accumulation of N-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry*, 1991, **30**, 1205-1210.

Dyer, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Baillie, K. E., Lyons, T. J., Mccance, D. R., Baynes, J. W. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging, *Journal of Clinical Investigation*, 1993, **91**, 2463–2469.

-E-

Edem, D. O. Palm oil. Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: a review. *Plant Foods and Human Nutrition*. 2002, **57**, 319-341.

Edwards, K., Kwaw, I., Matud, J., Kurtz, I. Effect of pistachio nuts on serum lipid levels in patients with moderate hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Nutrition*, 1999, **18**, 229-232.

Eisenbrand, G., Tang, W. Food-borne heterocyclic amines. Chemistry, formation, occurrence and biological activities. A literature review. *Toxicology*, 1993, **84**, 1-82.

El-Adawy, T. A., Mansour E. H. Nutritional and physicochemical evaluations of tahina (sesame butter) prepared from heat-treated sesame seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, **80**, 14, 2005-2011.

Engelsen, S. B. Explorative spectrometric evaluations of frying oil deterioration. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1997, **74** (12), 1495-1508.

Elleuch, M., Besbes S., Roiseux, O., Blecker, C., Attia, H. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chemistry*, 2007, **103**, 641-650.

Erbersdobler, H. F. Protein reactions during food processing and storage-their relevance to human nutrition. *Bibl. Nutr. Dieta*, 1989, **43**, 140–155.

Esterbauer, H., Koller, E., Snee, R. G., Koster, J. F. Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Biochemical Journal*, 1986, **239** (2), 405-409.

Evranuz, E. O. The effect of temperature and moisture content on lipid peroxidation during storage of unblanched salted roasted peanuts: shelf-life studies for unblanched salted roasted peanuts. *International Journal of Food Science and Technology*, 1993, **28**, 193-199.

Evrard, Y., Pras, B., Roux E. *Market : études et recherche en marketing*. Nathan, 2ème édition, Paris, 1993.

-F-

FAO/WHO. Report of a joint consultation on health implications of acrylamide in food, 2002.

Farag, R. S., Ghali, Y., Rashed, M. M. Linoleic acid oxidation catalysed by Amadori compounds in aqueous media. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1982, **15**, 174-179.

Fearn T. On orthogonal signal correction. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2000, **50**, 47-52.

Felton, J. S., Knize, M. G. New mutagens from cooked food. Mutagens and carcinogens in the diet, Willey-Liss, Inc., 1990, p.19-38.

Felton, J. S., Knize, M. G., Shen, N. H., Andresen, B. D., Bjeldanes, L. F., Hatch, F. T. Identification of the mutagens in cooked beef. *Environmental Health Perspectives*, 1986, **67**, 17-24.

Fernandez, X., Kerverdo, S., Dunach, E., Lizzani-Cuvelier, L. Les hétérocycles dans la chimie des arômes. *L'actualité Chimique*, 2002, 4-14.

Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., Romero, F. Effects of Thermal Processing and Storage on Available Lysine and Furfural Compounds Contents of Infant Formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48** (5), 1817–1822.

Fourie, P. C., Basson, D. S. Predicting occurrence of rancidity in stored nuts by means of chemical analysis. *Lebensmittel Wissenschaft und technologie*, 1989, **22**, 225-253.

Frank, J. Beyond vitamin E supplementation: an alternative strategy to improve vitamin E status. *Journal of Plant Physiology*, 2005, **162** (7), 834-843.

Frank, J., Kamal-Eldin, A., Traber, M. G. Consumption of sesame oil muffins decreases the urinary excretion of gamma-tocopherol metabolites in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, **1031**, 365-367.

Frankel, E. N. *Lipid oxidation*. The Oily Press, Dundee, Scotland, 1998, Vol. 10.

Franzke, C., Iwainsky, H. Antioxidant activity of melanoidins. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 1954, **50**, 251-254.

Fraser, G. E., Sabaté, J., Beeson, W. L., Strahan, T. M. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. *Archives of Internal Medicine*, 1992, **152**, 1416-1424.

Friedman, M., Cuq, J.-L. Chemistry, analysis, nutritional value and toxicology of tryptophan in food. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, **36**, 1079-1093.

Fu, M.-X., Requena, J.R., Jenkins, A.J., et al. The advanced glycation endproduct, N^ε-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxydation and glycoxydation reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**, 9982-9986.

Fujioka, K., Shibamoto, T. formation of genotoxic dicarbonyl compounds in dietary oils upon oxidation. *Lipids*, 2004, **39**, 481-486.

Fukuda, Y., Nagata, M., Osawa, M., Namiki, M. Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seed oil, and the effect of using the oil for frying. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, **50**, 857-862.

-G-

Gardner, H. W. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979, **27**, 220-229.

Gatellier, P., Gomez, S., Gigaud, V., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., & Santé-Lhoutellier, V. Use of a fluorescence front face technique for measurement of lipid oxidation during refrigerated storage of chicken meat. *Meat Science*, 2007, **76**, 543-547.

Genot, C. Some factors influencing TBA test. Annual report of the Vth PCRD EU project: Dietary treatment and oxidative stability of muscle and meat products: nutritive value, sensory quality and safety (Diet-ox), AIR III-CT-92-1577, 1996.

Genot, C., Meynier, A., Riaublanc, A., Chobert, J. M. Protein alterations due to lipid oxidation in multiphase systems. In *Lipid oxidation pathways*, Kamal-Eldin A. (Ed.), Champaign: AOACS Press, 2003, p. 265-292.

Glomb, M. A., Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the maillard reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**, 10017-10026.

Goldberg, T., Cai, W., Peppas, M., et al. Advanced glycoxydation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 2004, **104** (8), 1287-1291.

Grandgirard, A. Transformations des lipides au cours des traitements thermiques. Effets nutritionnels et toxicologiques. *Les Cahiers de l'ENSBANA*, 1992, **8**, 49-57.

Grandgirard, A., Martine, L., Demaison, L., et al. Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 2004, **91**, 101-106.

Granger, C., Barey, P., Toutain, J., Cansell, M. Direct quantification of protein partitioning in oil-in-water emulsion by front-face fluorescence: Avoiding the need for centrifugation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, **43**, 158-162.

Gray, J. I. Measurement of lipid oxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1978, **55**, 539-546.

Gray, J. I., Monahan, F. J. Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends Food Science and Technology*, 1992, **3**, 315-318.

Grivas, S., Jägerstad, M., Lingnert, H., Skog, K., Törnqvist, M., Åman, P. Acrylamide in food-Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Report of the scientific commission of the Swedish Institute for Food and Biotechnology*, 2002, pp 1-22.

Grosch, W., Laskawy, G., Senser, F. Storage stability of roasted hazelnuts. *Review of chocolate confectionary & Bakery*, 1983, **8** (3), 21-23.

Gross, G. A., Turesky, R. J., Fay, L. B., et al. Heterocyclic aromatic amine in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings. *Carcinogenesis*, 1993, **14**, 2313-2318.

Gu, Y., Kim, I., Ahn, J., et al. Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines as affected by muscle types/skin and cooking in pan-roasted mackerel. *Mutation Research*, 2002, **515**, 189-195.

Guillén-Sans, R., Guzmàn-Chozas. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, 1998, **38** 315-330.

Gutteridge, J. M. C., Heys, A. D., Lunec, J. Fluorescent malondialdehyde polymers from hydrolysed 1,1,3,3-tetramethoxypropane. *Analytica Chimica Acta*, 1977, **94** (1), 209-211.

-H-

Hadorn, H., Keme, T., Kleinert, J., Zürcher, F. The behavior of hazelnuts under different storage conditions. *Review of chocolate confectionary & Bakery*, 1977, **2**, 25-36.

Hamada, Y., Akari, N., Koh, N., Nakamura, J., Kato, K., Horiuchi, S., Hotta, N. Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of glycolytic pathway and polyol pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, **228**, 539-543.

Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., et al. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**, 9966-77.

Harshman, R. Foundations of the PARAFAC procedure: Model and conditions for an "explanatory multi-mode factor analysis", *UCLA Working Papers in phonetics*, 1970, **16**.

Hashim, L., Chaveron, H. Use of methylpyrazine ratios to monitor the coffee roasting. *Food Research International*, 1996, **28**, 619-623.

Hatch, J. P., Shinkai, R. S. A, Sakai, S., Rugh, J. D., Paunovich, E. D. Determinants of masticatory performance in dentate adults. *Archives of Oral Biology*, 2001, **46**, 641-648.

Hertog, M. G. L., Kromhout, D., Aravanis, C., et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Archives of Internal Medicine*, 1995, **155**, 381-386.

Hewedi, M. M., Kiesner, C., Meissner, K., Hartkopf, J., Erbersdobler H. F. Effects of UHT heating of milk in an experimental plant on several indicators of heat treatment. *Journal of Dairy Research*, 1994, **61**, 305-309.

Heyns, K., Hauber, R. Determination of structure of specific C-14 labeled brown polymerisates of sorbose by thermal fragmentations. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1970, **733**, 159- 169.

Hidalgo, F.J., Alaiz, M., Zamora, R. Effect of pH and temperature on comparative nonenzymatic browning of proteins produced by oxidized lipids and carbohydrates, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**, 742-747.

Hirata, F., Fujita, K., Ishikura, Y., Hosoda, K., Ishikawa, T., Nakamura, H. Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atherosclerosis*, 1996, **122** (1), 135-136.

Hodge, J. E. Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1953, **1**, 928-943.

Hofmann, T. Studies on melanoidin-type colorants generated from the Maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde - chemical characterisation of a red coloured domaine. *European Food Research and Technology*, 1998, **206**, 251-258.

Hoffmann, S. M, Dong, H. J, Li, Z., et al. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary of glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes*, 2002, **51**, 2082-2089.

Holland B., Brown, J., Buss, D. H. *Fish and Fish Products*. Third supplement to 5th edition of *McCance and Widdowson's the Composition of Foods*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1993.

Holmes, M. D., Hunter, D. J., Colditz, G. A., et al. Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *Journal of the American Medical Association*, 1999, **281**, 914-920.

Hu, F. B., Stampfer, M. J. Nut consumption and risk of coronary heart disease: a review of epidemiologic evidence. *Current Atherosclerosis Reports*, 1999, **1** (3), 204-209.

Hu, F. B., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Rimm, G. A., Colditz, G. A., Rosner, B., Speizer, F. E., Hennekens, C. H., Willet, W.C. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *British Medical Journal*, 1998, **317**, 1341-1345.

Hulshof, K. F., van Erp-Baart, M. A., Anttolainen, M., Becker, W., Church, S. M, Couet, C., Hermann-Kunz, E., Kesteloot, H., Leth, T., Martins, I., Moreiras, O., Moschandreas, J.,

Pizzoferrato, L., Rimestad, A. H., Thorgeirsdottir, H., van Amelsvoort, J.M., Aro, A., Kafatos, A. G., Lanzmann-Petithory, D., van Poppel, G. Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1999, **53** (2), 143-57.

-I-

Ikeda, K., Higashi, T., Sano, H., Jinnouchi, Y., Yoshida, M., Araki, T., Ueda, S., Horiuchi, S. Nε-(Carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry*, 1996, **35** (24), 8075–8083.

Ikeda, S. Kagaya, M., Kobayashi, K., Tohyama, T., Kiso, Y., Higuchi, N., Yamashita, K. Dietary sesame lignans decrease lipid peroxidation in rats fed docosahexaenoic acid. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2003, **49** (4), 270-276.

ISO 665-2000. Oil seeds - Determination of moisture and volatile matter content, International Standards Organization, 2000.

Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., et al. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b) pyrodine. *Carcinogenesis*, 1991, **12**, 1503-1506.

-J-

Jablonski A. Über den Mechanisms des Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Z Phys*, 1935, **94**, 38–46.

Jagerstad, M., Skog, K. Formation of meat mutagens. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1991, **289**, 83-105.

Janeiro D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, **9**, 6, 515-540.

Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., Eisenbrand, G. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, **38**, 801-809.

Jenab, M., Ferrari, P., et al. Association of nut and seed intake with colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2004, **13** (10), 1595-603.

Jensen, P. N., Christensen, J., Engelsen, S. B. Oxidative changes in pork scratchings, peanuts, oatmeal and muesli viewed by fluorescence, near-infrared and infrared spectroscopy. *European Food Research and Technology*, 2004, **219** (3), 294-304.

Jiang, Z. E., Woollard, A. C. S., Wolff, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 1990, **26** (10), 853-856.

Johnson, L. A., Suleiman, T. M., Lusas, E. W. Sesame protein: A review and prospectus. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1979, **6**, 463-468.

Jones, R. C., Weisburger, J. H. Characterization of aminoalkylimidazol-4-one mutagens from liquid reflux models. *Mutation Research*, 1985, **222**, 43-51.

Judd, J. T., Clevidence, B., Muesing, R. A., Wittes, J., Sunkin, M. E., Podczasy, J. J. Dietary trans fatty acids: Effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1994, **59**, 861-868.

-K-

Kahyaoglu, T., Kaya, S. Modeling of moisture, color and texture changes in sesame seeds during the conventional roasting. *Journal of Food Engineering*, 2006, **75**, 167-177.

Kanazawa, K., Kanazawa, E., Natake, M. Uptake of secondary autoxydation products of linoleic acid by the rat. *Lipids*, 1985, **20**, 412.

Kanazawa, A., Sawa, T., Akaik, T. and Maeda, H. Formation of abasic sites in DNA by t-butyl peroxy radicals: implication for potent genotoxicity of lipid peroxy radicals. *Cancer Letters*, 2000, **156**, 51-55.

Kang, M. H., Naito, M., Sakai, K., Uchida, K., Osawa, T. Mode of action of sesame lignans in protecting low-density lipoprotein against oxidative damage in vitro. *Life Science*, 2000, **66** (2), 161-171.

Karoui, R., Bosset, J.-O., Mazerolles, G., A., et al. Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: a preliminary investigation. *International Dairy Journal*, 2005, **15**, 275-286.

Karoui, R., Thomas, É., Dufour, É. Utilization of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets. *Food Research International*, 2006a, **39**, 349-355.

Karoui, R., Cartaud, G., Dufour, E. Front-face fluorescence spectroscopy as a rapid and non destructive tool for differentiating between flours, semolinas and pasta made from different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006b, **54**, 2027-2034.

Karoui, R., Dufour, É., de Baerdemaeker, J. Front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring the oxidation of semi-hard cheeses throughout ripening. *Food Chemistry*, 2006c, **101**, 1305-1314.

- Karoui, R., Dufour, É., de Baerdemaeker, J., Bosset, J.-O. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chemistry*, 2006d, **101**, 314-323.
- Karoui, R., Laguët, A., Dufour, E. Fluorescence spectroscopy: A tool for the investigation of cheese melting - Correlation with rheological characteristics. *Lait*, 2003, **83** (3), 251-264.
- Karoui, R., Schoonheydt, R., Decuypere, E., Nicolai, B., De Baerdemaeker, J. Front face fluorescence spectroscopy as a tool for the assessment of egg freshness during storage at a temperature of 12.2 °C and relative humidity of 87%. *Analytica Chimica Acta*, 2007, **582**, 83-91.
- Kashani, G. G., Valadon, L. R. G. Effect of salting and roasting on the carbohydrates and proteins of Iranian pistachio kernels. *Journal of Food Technology*, 1984, **19**, 247-253.
- Kato, H., Doi, Y., Tsugita, T., Kosai, K., Kamiya, T., Kurata, T. Changes in volatile flavor components of soybeans during roasting. *Food Chemistry*, 1981, **7**, 87-94.
- Keme, T., Messerli, M., Shejbal, J., Vitali, F. The storage of hazelnuts at room temperature under nitrogen (II). *Review of chocolate confectionary & Bakery*, 1983, **8** (2), 15-20.
- Khalil, J. K., Chughtai, M. I. D. Chemical composition and nutritional quality of five peanut cultivars grown in Pakistan. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1983, **33** (1), 63-70.
- Kikugawa, K., Beppu, M. Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross linked proteins. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1987, **44**, 277-296.
- Kinderlerer, J.L. & Johnson, S. Rancidity in hazelnuts due to volatile aliphatic aldehydes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1992, **58**, 89-93.
- Kiso, Y. Antioxidative roles of sesamin, a functional lignan in sesame seed, and its effect on lipid- and alcohol-metabolism in the liver: a DNA microarray study. *Biofactors*, 2004, **21** (1-4), 191-196.
- Klein, R. A. The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochemistry and Biophysical Acta*, 1970, **210**, 486-489.
- Klevay, L. M. Copper in nuts may lower heart disease risk. *Archives of Internal Medicine*, 1993, **153**, 401-402.
- Koehler, P. E., Mason, M. E., Newell, J. A. Formation of pyrazine compounds in sugar-amino acids model systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1970, **17**, 393-396.
- Kohlmeier, L., Simonsen, N., van't Veer, P., et al. Adipose tissue trans fatty acids and breast cancer in the European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infraction, and Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997, **6**, 705-710.

- Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagaoka, S., Takahashi, M., Mukai, K. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radicals by squalene in n-butanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, **1256**, 52-56.
- Koletzko, B., Desci, T. Metabolic aspects of trans fatty acids. *Clinical Nutrition*, 1997, **16**, 229-237.
- Konings, E., Baars, A., van Klaveren, J., Spanjer, M., Rensen, P., Hiemstra, M., Van Kooij, J., Peters, P. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, **41**(11), 1569-1579.
- Kornsteiner, M., Wagner, K.-H., Elmadfa, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 2006, **98**, 381-387.
- Koyuncu, M. A., Koyuncu, F., Bostan, S. Z., Islam, A. Change of fat content and fatty acid composition during the fruit development period in the hazelnuts Tombul and Palaz cultivars grown in Ordu. *Acta Horticulturae*, 1996, **445**, 229-233.
- Kris-Etherton, P. M., Zhao, G., Binkoski, A. E., Coval, S. M., Etherton, T. D. The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutrition Reviews*, 2001, **59**, 103-111.
- Kris-Etherton, P. M., Yu-Poth, S., Sabate, J., Ratcliffe, H. E., Zhao, G., Etherton, T. D. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, **70**, 504S-511S.
- Kroes, R., Galli, C., Munro, I., Schilter, B., Tran, L.-A., Walker, R., Wurtzen, G. Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: A practical tool for assessing the need for toxicity testing. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, **38**, 255-312.
- Kroes, R., Muller, D., Lambe, J., Verger, P., Visconti, A. Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, **40**, 327-385.
- Kruskal, J. B. Three-way arrays: Rank and uniqueness of trilinear decompositions. *Linear Algebra and Applications*, 1977, **18**, 95-38.
- Kubow, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Science and Technology*, 1990, **1**, 67-71.
- Kubow, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine*, 1992, **12**, 63-81.
- Kulmyrzaev, A., Dufour, E. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy. *Le Lait*, 2002, **82**, 725-735.
- Kumazawa, S., Koike, M., Usui, Y., Nakayama, T., Fukuda, Y. Isolation of sesaminols as antioxidative components from roasted sesame seed oil. *Journal of Oleo Science*, 2003, **52**, 303-307.

-L-

Labrinea, E. P., Thomaidis, N. S., Georgiou, C. A. Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta*, 2001, **448** (1-2), 201-206.

Ladikos, D., Lougovois, V. Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chemistry*, 1990, **35**, 295-314.

Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983, p. 76-78.

Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2nd ed., Kluwer Academics, 1999.

Lebecque, A., Laguet, A., Devaux, M.F., Dufour, E. Delineation of the texture of Salers cheese by sensory analysis and physical methods. *Le Lait*, 2001, **81** (5), 609-623.

Leblanc, J. C. Acrylamide: Occurrence data/Food Consumption/Dietary Intake estimates. 64th, 2005.

Leblanc, J. C., Guérin, T., Verger, P., Volatier, J. L. Etude de l'alimentation totale française. Mycotoxines, minéraux et éléments traces. INRA, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales, 2004, 72 p.

Lecerf, J. M., Cayzeele, A., Vaysse, C., Galinier, A., Pouillart, P., Tessier, F., Birlouez-Aragon, I. Health impact of dietary neoformed Maillard products in young healthy adults: biological impact of high v. low dietary level. Proceedings of the Nutrition Society, 2008, **67** (OCE), E191.

Lecerf, J.-M., Christiani I. Acides gras trans et cancer. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, 2004, **39**, 41-47.

Leclère, J., Birlouez-Aragon, I. The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**, 4682-4687.

Leclère, J., Birlouez-Aragon, I., Méli, M. Fortification of milk with iron-ascorbate promotes lysine glycation and tryptophan oxidation. *Food Chemistry*, 2002, **76**, 491-499.

Lee, Y. C., Shlyankevich, M., Jeong, H. K., Douglas, J. S., Surh, Y. Bioactivation of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde to an electrophilic and mutagenic allylic sulfuric acid ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, **209**, 996-1002.

Ledl F., Schleider E. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie*, 1990, **29**, 565-594.

Léger, C. L. Vitamine E, tocophérols et composés apparentés: Propriétés antioxygène et rôle biologique - source alimentaires. CNERNA-CNRS Commission "Nutrition - Membranes". Paris: Polytechnica, 1992, 157 p.

Léger, C. L., Razanamahefa, L. Risks and benefits of food with trans fatty acids for human health – Recommendations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 2005, **12** (1), 61-67.

Liang, J. H. Kinetics of fluorescence formation in whole milk powders during oxidation. *Food Chemistry*, 2000, **71** (4), 459-463.

Ling, A. R., Malting, J. *Journal of the Institute of Brewing*, 1908, **14**, 494-521.

Lingnert, H. Development of the Maillard reaction during food processing. In *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Birkhauser, Basel, 1990, p. 171-185.

Lopez, A., Pique, M. T., Boatella, J., Romero, A., Ferran, A., Garcia, J. Influence of drying conditions on the hazelnut quality. III. Browning. *Drying Technology*, 1997a, **15** (3,4), 989-1002.

Lopez, A., Pique, M. T., Boatella, J., Romero, A., Ferran, A., Garcia, J. Influence of drying conditions on the hazelnut quality. III. Enzymatic activity. *Drying Technology*, 1997b, **15** (3,4), 978-988.

Lopez, A., Pique, M. T., Boatella, J., Romero, A., Ferran, A., Garcia, J. Influence of drying conditions on the hazelnut quality. III. Lipid oxidation. *Drying Technology*, 1997c, **15** (3,4), 965-977.

Loprieno, N., Boncristiani, G., Loprieno, G. An experimental approach to identifying the genotoxic risk from cooked meat mutagens. *Food Chemistry and Toxicology*, 1991, **29**, 377-86.

Lou, H., Yuan, H., Ma, B., Ren, D., Ji, M., Oka, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. *Phytochemistry*, 2004, **65**, 2391-2399.

Lovejoy, J. C. The impact of nuts on diabetes and diabetes risk. *Current Diabetes Reports*, 2005, **5** (5), 379-84.

Lovejoy, J. C., Most, M. M, Lefevre, M., Greenway, F. L, Rood, J. C. Effect of diets enriched in almonds on insulin action and serum lipids in adults with normal glucose tolerance or Type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002; **76**, 1000-1006.

Luh, B. S., Wong, W. S., El Shimi, N. E. Effect of processing on some chemical constituents of pistachio nuts. *Journal of Food Quality*, 1982, **5** (1), 33-41.

-M-

Machiels D., Istasse L. La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 2002, **146**, 347-352.

- MacIntosh, D. L., Spengler, J. D, Ozkaynak, H., Tsai, L., Ryan, P.B. Dietary exposures to selected metals and pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 1996, **104** (2), 202-209.
- MacLeod, G., Seyyedain-Ardebili, M. Natural and simulated meat flavors (with particular reference to beef). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1981, **14**, 309-437.
- Maguire, L.S., O'Sullivan, S. M, Galvin, K., O'Connor, T. P., O'Brien, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2004, **55**, 171-178.
- Maillard, L. C. Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 1912, **154**, 66-68.
- Maleki, S., Chung, S., Champagne, E., Raufman, J. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, **106** (4), 763-768.
- Maleki, S., Yamaki, K. Roasted Peanuts Are More Likely to Sensitize Mice than Raw Peanuts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, **119** (1), S114-S114.
- Manley, C. H., Vallon, P. P., Erikson, R. E. Some Aroma Components of Roasted Sesame Seed (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Food Science*, 1974, **39**, 73-76.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M. C., Lerici, C. R. Review of non enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 2001, **11**, 340-346.
- Mason, M. E., Johnson, B., Hamming, M. Flavor components of roasted peanuts. Some low molecular weight pyrazines and a pyrrole. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1966, **14**, 454-460.
- Mate, J. I., Saltveit, M. E., Krochta, J. M. Peanut and walnut rancidity: effect of oxygen concentration and relative humidity. *Journal Food Science*, 1996, **61** (2), 465-472.
- Mayer, K. P. Infrared roasting of nuts, particularly hazelnuts. *Confectionary production*, 1985, **51**, 313-314.
- Meyer, W., Jungnickel, H., Jandke, M., Dettner, K., Spitteller, G. On the cytotoxicity of oxidized phytosterols isolated from photoautotrophic cell cultures of chenopodium rubrum tested on mealworms tenebrio molitor. *Phytochemistry*, 1998, **47** (5), 789-797.
- Meyer, W., Spitteller, G. Oxidized phytosterols increase by aging in photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry*, 1997, **45**, 297-302.
- Meynier, A., Gandemer, G. Flavour of cooked meat: relation to oxidation of phospholipids. *Viandes et Produits Carnés*, 1994, **15**, 179-182.

Milbury, P. E., Chen, C.-Y., Dolnikowski, G. G., Blumberg, J. B. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**, 5027-5033.

Milder, I. E., Arts, I. C., Van de Putte, B., Venema, D. P., Hollman, P. C. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*, 2005, **93** (3), 393-402.

Mihara, S., Shibamoto, T. Mutagenicity of products obtained from cysteamine-amine glucose browning model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1980, **28**, 62-66.

Ministère de l'Environnement Libanais. *State of the Environment Report 2001*. Ministry of Environment, Republic of Lebanon, 2001. Disponible sur: <http://www.moe.gov.lb/Reports/SOER2001.htm>).

Mohamed, H. M. A., Awatif, I. I. The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant. *Food Chemistry*, 1998, **62**, 269-276.

Moller, J. K. S., Parolari, G., Gabba, L., Christensen, J., Skibsted, L. H. Monitoring chemical changes of dry-cured parma ham during processing by surface autofluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51** (5), 1224-1230.

Montgomery, B., Murphy, J., Chen J., Desai, V., McGarrity, L., Morris, S., et al. Mutagenicity of food-derived carcinogens and the effect of antioxidant vitamins. *Nutrition and Cancer*, 2002, **43**, 103-110.

Morales, F. J., Babel, M. B. Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, **50**, 4657-4661.

Morales, F. J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chemistry*, 1996, **57**, 423-428.

Moss, J. R., Otten, L A relationship between color development and moisture content during roasting of peanut. *Canadian Institute of Food Science and Technology journal*, 1989, **22**, 34-39.

Mostafa, M. M. Nutritional aspects of thermal and irradiation processing of peanut kernels and their oils. *Food Chemistry*, 1987, **26**, 31-45.

Mottram, D., Wedzicha, B., Dodson, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 2002, **419**, 448-449.

Mucci, L., Dickman, P., Steineck, G., Adami, H. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *British Journal of Cancer*, 2003, **88**, 84-89.

Mukuddem-Petersen, J., Oosthuizen, W., Jerling, J. C. A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans. *Journal of Nutrition*, 2005, **135** (9), 2082-2089.

Muller, K., Bauer, W. Detection and kinetics of chemical reactions during the drying process. In *Preservation processes and related techniques*, London: Elsevier Science LTD, 1990, Vol 2, p. 644-657.

-N-

Nasreddine, L., Hwalla, N., Sibai, A., Hamzé, M., Parent-Massin, D. Food consumption patterns in an adult urban population in Beirut, Lebanon. *Public Health Nutrition*, 2006, **9** (2), 194-203.

Nawar, W. W. Lipids. *Food Chemistry*, 1996, 255-264.

Nelson, M., Bingham, S. Assessment of food consumption and nutrient intake. In: *Design Concepts in Nutritional Epidemiology*, 2nd edition, Oxford: oxford university press, 1997, p.123-169.

Nepote, V., Grosso, N. R., Guzman, C. A. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites*, 2002, **53** (4), 391-395.

Newel, F. A., Mason, M. E., Matlock, R. S. Precursors of typical and atypical roasted peanut flavor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1967, **15**, 767-772.

Nagai, R., Matsumoto, K., ling X., et al. Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end-products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes*, 2000, **49**, 1714-1723.

Nagao, M., Fujita, Y., Wakabayashi, K., Nukaya, H., Kosuge, T., Sugimura, T. Mutagens in coffee and other beverages. **Environmental Health Perspectives**, 1986, **67**, 89-91.

Nagao, M., Sugimura, T. Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. *Mutation Research*, 1993, **290**, 43-51.

Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., Seino, Y., et al. *Progress in genetic toxicology*. Elseiver/ North Holland, 1977, p. 259-264.

Newell, F. A., Mason, F. E., Matlock, R. S. Precursors of typical and atypical roasted peanut flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1967, **15**, 767-772.

Nilufer, D., Boyacioglu, D. Comparative study of three different methods for the determination of Aflatoxins in Tahini. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 3375-3379.

Niwa, H., Takeda, A., Wakai, M., et al. Accelerated formation of N-ε-(carboxymethyl)lysine, an advanced glycation endproduct, by glyoxal and 3-deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, **248**, 93-97.

Norat, T., Lukanova, A, Ferrari, P, Riboli, E. Meat Consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *International Journal of Cancer*. 2002, **98** (2), 241-256.

-O-

O'Byrne, D. J., Knauff, D. A., Shireman, R. B. Low fat-monounsaturated rich diets containing high-oleic peanuts improve serum lipoprotein profiles. *Lipids*, 1997, **32**, 687-695.

Ohta, S. Toxicity of oxidized oils and fats. *Shoku no Kagaku*, 1985, **91**, 43-48.

O'keefe, S. F., Wiley, V. A., Knauff, D. A. Comparison of oxidative stability of high and normal oleic peanut oils. *Journal of American oil Chemist Society*, 1993, **70**, 489-492.

Olsen, E., Vogt, G., Veberg, A., Ekeberg, G., Nilsson, A. Analysis of early lipid oxidation in smoked, comminuted Pork or poultry sausages with spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**, 7448-7457.

Osawa, T. Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1999, **111**, (2-3), 133-139.

O'Sullivan, L., Woods, J. A., O'Brien, N. M. Squalene but not n-3 fatty acids protect against hydrogen peroxide-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells. *Nutrition Res*, 2002, **22**, 847-857.

Ory, R. L., St Angelo, A. J., Gwo, Y. Y., Flisk, G. J., Mod R. R. Oxidation-induced changes in foods. In *Chemical changes in foods during processing*. Ed. by Institute of Food Technologists, 221 N. Lasalle St. Chicago, Illinois, 1985, p. 205-210.

Otto M. *Chemometrics, Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. WILEY-VCH, 1999.

Oupadissakoon, C., Young, C. T. Changes in free amino acids and sugars of peanuts during oil roasting. *Peanut Science*, 1984, **11**, 6-9.

Ozdemir, M., Ackurt, F., Yildiz, M., Biringen, G., Gurcan, T., Loker, M. Effect of roasting on some nutrients of hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *Food Chemistry*, 2001, **73**, 185-190.

-P-

Parceriza, J., Boatella, J., Codony, R., Farran, A., Garcia, J., Lopez, A., Rafecas, M., Romero, A. Influence of variety and geographical origin on lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: I. Fatty acid composition. *Food Chemistry*, 1993a, **43**, 13-16.

Parceriza, J., Rafecas, M., Castelloti, A. I., Codony, R., Farran, A., Garcia, J., Lopez, A., Romero, A., Boatella, J. Influence of variety and geographical origin on lipid fraction of

hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: II. Triglyceride composition. *Food Chemistry*, 1993b, **50**, 245-249.

Parcerisa, J., Rafeces, M., Castellote, A. I., Codony, R., Farran, A., Garcia, J., Lopez, A., Romero, A., Boatella, J. Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellan* L.) from Spain: III. Oil stability, tocopherol content and some mineral contents. *Food chemistry*, 1995, **53**, 71-74.

Park, C. K., Kim D. H. Relationship between fluorescence and antioxidant activity of ethanol extracts of a maillard browning mixture. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1983, **60**, 22-26.

Parmar, B., Miller, P. F., Burt, R. Stepwise approaches for estimating the intakes of chemicals in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1997, **26**, 44-51.

Pattee, H. E., Giesbrecht, F. G., Isleib, T. Roasted peanut flavor intensity variations among U.S. genotypes. *Peanut Science*, 1995, **22**, 158-162.

Pattee, H. E., Pearson, J. L., Young, C. T., Giesbrecht, F.G. Changes in roasted peanut flavor and other quality factors with seed size and storage time. *Journal of food Science*, 1982a, **47**, 455-460.

Pattee, H .E., Young, C. T., Pearson, J. L., Singleton, J. A., Giesbrecht, F. G. Storage and moisture effects on peanut composition and roasted flavor. *Peanut Science*, 1982b, **9**, 98.

Pellegrini, N., Visioli, F., Buratti, S., Brighenti, F. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**, 2532-2538.

Pelucchi, C., Franceschi, S., Levi, F., Trichopoulos, D., Bosetti, C., Negri, E. Logical study on dietary acrylamide and cancer. *British Journal of Cancer*, 2003, **89**, 774 -775.

Peng, S. K, Hu, B., Morin, R. J. Angiotoxicity and atherogenecity of cholesterol oxides. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1991, **5**, 144-152.

Peshern, A. S., Breene, W. M., Lulai, E. C. Analysis of factors influencing lipid oxidation in hazelnuts (*Corylus* spp.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 1995, **19**, 9-25.

Perren, R., Handschin, S., Escher, F. Roasting technology of hazelnuts. II. Change in microstructure of hazelnuts during roasting. *Zucker- und Süswaren-Wirtschaft* , 1996, **49** (2), 68-71.

Perren, R., Escher, F. Nut roasting - technology and product quality. *Manufacturing Confectionary*, 2007, **87** (6), 65-75.

Petersen, B. J., Barraj, L. M., Muenz, L. R., Harrison, S. L. An alternative approach to dietary exposure assessment. *Risk Analysis*, 1994, **14** (6), 913-916.

Plat, J., Brzezinka, H., Lutjohann, D., Mensink, R.P., von Bergmann, K. Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 2001, **42**, 2030-2038.

Pokorny, J. Interactions of oxidized lipids with protein. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 1977, **IV**, 389-393.

Pokorny, I., Rzepa, J., Janicek, G. lipid oxidation. Part I. effect of carbonyl group on the decomposition of lipid hydroperoxide. *Nahrung*, 1976, **20**, 1-14.

Pryor, W. A., Stanley, J.P., Blair, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, 1976, **11** (5), 370-379.

-R-

Rainey, C. J., Nyquist, L. A. Nuts-Nutrition and health benefits of daily use. *Nutrition Today*, 1997, **32**,157-163.

Ramanujam, N. Fluorescence Spectroscopy In vivo. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers, R. A. Ed., Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000.

Rampon, V., Villière, A., McClements, D. J., Genot, C. Fluorescence of oxidizing oil-in-water emulsions. *Czech journal of food sciences*, 2004, **22**, 153-153.

Reddy, S., Bichler, J., Wells-Knecht, K. J., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. N-Epsilon carboxymethyllysine is a dominant advanced glycation end-product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry*, 1995, **34** (34), 10872-10878.

Reineccius, G. A. The influence of Maillard reactions on the sensory properties of foods. In: *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Birkhauser, Basel, 1990, p.157-170.

Renn, P. T., Sathe, S. K. Effect of pH, temperature, and reactant molar ratio on L-leucine and D-glucose Maillard browning reaction in an aqueous system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, **45**, 3782-3787.

Renwick A. G. Exposure estimation, toxicological requirements and risk assessments. In: *The food safety handbook*. Kees van der heijden et al. (eds). TX: Marcel Dekker inc., 1999, p.59-94.

Ribéreau-Gayon P. *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod, Paris, 1968, 254 p.

Riedl, O., Mohr, E. Quality assessment of shelled hazelnuts. *Review of chocolate confectionary & Bakery*, 1979, **4**, 29-30.

Rimm, E. M., Stampfer, M. J. The role of antioxidants in preventive cardiology. *Current Opinion in Cardiology*, 1997, **12**, 188-194.

Rinnan, A. Application of PARAFAC on Spectral Data. PhD thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, 2004.

Rizkallah, J., Morales, F. J., Ait-Ameur, L., Fogliano, V., Hervieu, A., Courel, M., Birlouez-Aragon, I. Front face fluorescence spectroscopy and multiway analysis for process control and NFC prediction in industrially processed cookies. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems*, 2008, **93**, 99-107.

Robbana-Barnat, S., Rabache, M., Rialland, E., Fradin, J. Heterocyclic amines: occurrence and prevention in cooked food. *Environmental Health Perspectives*, 1996, **104**, 280-288.

Rodriguez, M. M., Basha, S. M., Sanders, T. H. Maturity and roasting of peanuts as related to precursors of roasted flavor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1989, **37**, 760-765.

Roggo, Y. Détermination de la qualité de la betterave sucrière par spectroscopie infrarouge et chimiométrie. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, France, 2003.

Rohan, T. A., Stewart, T. The precursors of chocolate aroma: changes in the free amino acids during roasting of cocoa beans. *Journal of Food Science*, 1966, **31**, 206-209.

Ruoff, K., Karoui, R., Dufour, É., et al. Authentication of the botanical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**, 1343-1347.

Ryan, E., Chopra, J., McCarthy, F., Maguire, A. R., O'Brien, N. M. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytostérols oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *British Journal of Nutrition*, 2005, **94**, 443-451.

Ryan, E., Galvin, K., O'connor, T. P., Maguire, A. R., O'brien, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2006, **57**, 219-228.

Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., Tomqvist, M. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 7012-7018.

-S-

Saavedra, G., Ait-Ameur, L., Tessier, F., Pouillart, P., Lecerf, J. M., Birlouez-Aragon, I. Health impact of dietary neoformed Maillard products in young healthy adults: occurrence in heat-treated foods and bioavailability. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2008, **67** (OCE), E190.

- Sabaté, J., Fraser, G. E., Burke, K., Knutsen, S. F., Bennett, H., Lindsted, K. D. Effects of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men. *The New England Journal of Medicine*, 1993, **328**, 603-607.
- Sablani, S. S., Marcotte, M., Baik, O. D., Castaigne, F. Modeling of simultaneous heat and water transport in the baking process. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 1998, **31**, 201-209.
- Saklar, S. Optimization of hazelnut roasting process by using response surface methodology, 213 p. *PhD thesis*, Metu, Ankara: 1999.
- Saklar, S., Urgan, S., Katnas, S. Microstructural changes in hazelnuts during roasting. *Food Research International*, 2003, **36** (1), 19-23.
- Saleh, H. Brunn, Paetzold, R., Hussein, L. Nutrients and chemical residues in an Egyptian total mixed diet. *Food Chemistry*, 1998, **63**, 535-541.
- Salih, A. M., Smith, D. M., Price, J. F., Dawson, L. E. Modified extraction 2- thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry science*, 1987, **66**, 1483-1488.
- Salméron, J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, **73**, 1019-1026.
- Sanders, T. H., Vercelotti, J. H., Blankenship, P. D., Crippen, K. L., Civille, G. V. Effect of maturity on roast color and descriptive flavor peanuts. *Journal of Food Science*, 1989, **54** (2), 1066-1069.
- Sankar, D., Sambandam, G., Ramakrishna Rao, M., Pugalendi, K. V. Modulation of blood pressure, lipid profiles and redox status in hypertensive patients taking different edible oils. *Clin Chim Acta*, 2005, **355** (1-2), 97-104.
- Sawaya, W. N., Ayaz, M., Khalil, J. K., Al-Shalhat, A .F. Chemical composition and nutritional quality of Tehineh (sesame butter). *Food Chemistry*, 1985, **18**, 35-45.
- Scalbert, A., Monties, B., Janin, G. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, **37**, 1324-1329.
- Schmidt, S., Pokorny, J. Potential application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids - a review. *Czech Journal of Food Science*, 2005, **23**, 93-102.
- Sébédio, J.-L., Chardigny, J.-M. Biochemistry of trans polyunsaturated fatty acids. In *Trans fatty acids in human nutrition*, Sébédio J.-L., Christie W.W. (eds.), Dundee: The Oily Press, 1998, p. 191-215.
- Sébédio, J.-L., Grandgirard, A., Prevost, J. Linoleic acid isomers in heat treated sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1988, **65**, 362-366.

- Seeram, N. P., Zhang, Y., Henning, S. M., Lee, R., Niu, Y., Lin, G., Heber, D. Pistachio skin phenolics are destroyed by bleaching resulting in reduced antioxidative capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **5**, 7036-7040.
- Selhub, J., Jacques, P. F., Bostom, A. G., et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *The New England Journal of Medicine*, 1995, **332**, 286-291.
- Sell, D. R., Monnier, V. M. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *Journal of Biological Chemistry*, 1989a, **264**, 21597-21602.
- Sell, D. R., Monnier, V. M. Isolation, purification and partial characterization of novel fluorophores from aging human insoluble collagen-rich tissue. *Connective Tissue Research*, 1989b, **19**, 77-92.
- Shahidi, F., Aishima T., Abou-gharbia H. A., Youssef M., Shehata A. A. Y. Effect of Processing on Flavor Precursor Amino Acids and Volatiles of Sesame Paste (Tehina). *Journal of American Oil Chemists Society*, 1997, **74**, 667-678.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., Wanasundara, P. D. Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1992, **32** (1), 67-103.
- Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. M., Wall, D.S. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fraction. *Food Chemistry*, 2006, **99**, 478-483.
- Shewfelt, A. L., Young, C. T. Storage stability of peanut-based foods: A review. *Journal of Food Science*, 1977, **42** (5), 1148-1152.
- Shibamoto, T. Occurrence of mutagenic products in browning model systems. *Food Technology*, 1982, 59-62.
- Shibamoto, T. Mutagenicity of 1,5 (or 7)-dimethyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H- dicyclopentapyrazine obtained from cyclotene/NH₃ browning model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1980, **28**, 883-884.
- Shibamoto, T., Bernhard, R. A. Formation of heterocyclic compounds from the reaction of L-rhamnose with ammonia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1980, **26**, 183-187.
- Shimoda, M., Nakada, Y., Nakashima, M., Osijima, Y. Quantitative comparison of volatile flavor compounds in deep-roasted and light roasted sesame seed oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1997, **45**, 3193-3196.
- Shokraii, H. E. Chemical composition of the pistachio nuts (*Pistachia vera* L.) of Kerman, Iran. *Journal of Food Science*, 1977, **42** (1), 244-245.

Siegl, T., Schwarzenbolz, U., Henle, T. Irreversible casein oligomerisation and formation of fluorescent cross-link amino acids in dairy products. *Czech. Journal of Food Science*, 2000, **18**, 72-73.

Sikorska, E., Gorecki, T., Khmelinskii, I. V., Sikorski, M., De Keukeleire, D. Fluorescence Spectroscopy for Characterization and Differentiation of Beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 2004, **110** (4), 267-275.

Sjöblom, J., Svensson, O., Josefson, M., Kullberg, H., Wold, S. An evaluation of orthogonal signal correction applied to calibration transfer of near infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1998, **44**, 229-244.

Skog K. Cooking procedures and food mutagens: a literature review. *Food and Chemical Toxicology*, 1993, **31** (9), 655-675.

Slob, W., Pieters, M. N. A probabilistic approach for deriving acceptable human intake limits and human health risks from toxicological studies: General framework. *Risk analysis*, 1998, **18**, 787-798.

Smith, T. J. Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2000, **9**, 1841-1848.

Somoza, V., Saavedra, G., Ait Ameer, L., Tessier, F., Pouillard, P., Lecerf, J. M., Sebekova, K., Birlouez-Aragon, I. Bioavailability of some N^ε-carboxymethyllysine in healthy infants and adults. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2007; **51**(suppl 1):1-422.

Soubra, L. Evaluations scientifiques des risques toxiques liés à certaines substances chimiques (additifs alimentaires) et contaminants (mycotoxines). Thèse de doctorat, AgroParisTech, Paris, France, 2008.

Spiller, G. A., Jenkins, D., Cragen, L. N., Gates, J. E., Bosello, O., Berra, K., Rudd, C., Stevenson, M., Superko, R. Effect of a diet high in monounsaturated fat from almonds on plasma cholesterol and lipoprotein. *Journal of the American College of Nutrition*, 1992, **11**, 126-130.

St Angelo, J. A. Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1996, **36** (3), 175-224.

St Angelo, J. A., Ory L. R. Effect of minor constituents and additives upon peroxidation of oil n peanut butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1975, **52** (2), 38-40.

Stender, S., Dyerberg J. Influence of trans fatty acids on health. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2004, **48**, 61-66.

Stich, H. F., Stich, W., Rosin, M. P., Powrie, W. D. Mutagenic activity of pyrazine derivatives: a comparative study with *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* and Chinese hamster ovary cells. *Food Cosmetics Toxicology*, 1980, **18**, 581-586.

Strasburg, G. M., Ludescher, R. D. Theory and Applications of Fluorescence Spectroscopy in Food Research. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, **6**, 69-75.

Suja, K. P., Jayalekshmy, A., Arumughan, C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*sesamum indicum* L.) in DPPH(*) system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, **52** (4), 912-915.

Sugimura, T. Food and cancer. *Toxicology*, 2002, **181**, 17-21.

Sugimura T. Past, present, and future of mutagens in cooked foods. *Environmental Health Perspectives*, 1986, **67**, 5-10.

Sun, Q., Faustman, C., Senecal, A., Wilkinson, A.L., Furr, H. Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerates storage. *Meat Science*, 2001, **57**, 55-60.

Svensson, K, Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenäs, K., Lind, Y., Rosén, J. Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, **41**, 1581–1586.

-T-

Talcott, S. T., Passeretti, S., Duncan, C. E., Gorbet, D. W. Polyphenolic content and sensory properties of normal and high oleic acid peanuts. *Journal of Food Chemistry*, 2005, **90** (3), 379-388.

Tessier, F., Birlouez-Aragon, I. Effect of pH, phosphate and copper on the interaction of glucose with albumin. *Glycoconjugate Journal*, 1998, **15**, 571-574.

Tessier, F. J., Morales, F., Ait-Ameur, L., et al. Exposure to Neo-Formed Compounds (NFCs) in a standard diet and its nutritionally equivalent low-NFCs diet: The ICARE clinical study. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2007, **51** (suppl 1), 1-422.

Tessier, F., Obrenovich, M., Monnier, V. M. Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1. Relationship to vesperlysine A and the advanced Maillard reaction in aging, diabetes, and cataractogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**, 20796-20804.

Thompson, F. E., Byers, T. Dietary assessment resource manual. *Journal of Nutrition*, 1994, **124** (Suppl 11), 2245-2317.

Thorpe, S. R., Baynes, J. W. CML a brief history. *International Congress Series*, 2002, **1245**, 91-99.

Thygesen, L. G., Rinnan, A., Barsberg, S., Moller, J. K. S. Stabilizing the PARAFAC decomposition of fluorescence spectra by inserting zeros outside the data area. *Chemometrics and Intelligent Laboratory systems*, 2004, **71**, 97-106.

Tilbury, R. N., Miller, H. Chemiluminescence from the oxidation of model lipid systems, 2000

<http://www.photobiology.com/photobiology99/contrib/tilbury/index.htm>.

Tomasin, G., Trifiro A. Vocational Education and Training School for Food Industries. A feasibility Study. Beirut: Lebanon, 2002.

Topallar, H., Bayrak, Y., Mehmet, A. A Kinetic Study on the Autoxidation of Sunflowerseed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, **74** (10), 1323-1327.

Tressl, R., Kersten, E., Nittka, C., Rewicki, D. Mechanistic studies on the formation of pyrroles and pyridines from [1-¹³C]-D-glucose and [1-¹³C]-D-arabinose. In *Maillard reaction in chemistry, food and health*. Labza T.D., Reineccius, G.A., Monnier, V.M, O'Brien, J., Baynes, J.W. (Eds). United Kingdom, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994.

Tressl, R., Wondrak, G. T., Garbe, L. A., Kruger, R. P., Rewicki, D. Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, **46**, 1765-1776.

Tsai, C. J., Leitzmann, M. F., Hu, F. B., Willett, W. C., Giovannucci, E. L. A prospective cohort study of nut consumption and the risk of gallstone disease in men. *American Journal of Epidemiology*, 2004a, **160** (10), 961-8.

Tsai, C. J., Leitzmann, M. F., Hu, F. B., Willett, W. C., Giovannucci, E. L. Frequent nut consumption and decreased risk of cholecystectomy in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004b, **80** (1), 76-81.

-U-

Umano, K., Shibamoto, T., Fernando, S. Y., Wei, C. I. Mutagenicity of 2-hydroxyalkyl-N-nitrosothiazolidine. *Food and Chemical Toxicology*, 1984, **22**, 253-259.

Underland, I., Stading, M., Lingnert, H. Influence of skinning on lipid oxidation in different horizontal layers of herring (*Clupea harengus*) during frozen storage. *Journal of Science and Food Agriculture*, 1998, **78**, 441-450.

-V-

Van De Bovenkamp, P., Kosmeijer-Schuil, T., Katan, M. Quantification of oxysterols in Dutch foods: egg products and mixed diets. *Lipids*, 1988, **23**, 1079-1085.

Varo, P., Koivistoinen, P. Mineral composition of Finnish foods XII. General discussion and nutritional evaluation. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 1980, **22**, 165-171.

Vedrine, J.-P. *Le traitement des données en marketing*. Les Editions d'Organisation, Paris, 1991.

Villarroel, M., Biolley, E., Schneeberger, R., Ballester, D., Ramirez, S. Amino acid composition of Chilean hazelnuts. *Food Chemistry*, 1987, **25**, 155-158.

Vincke, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichm*, 1970, **72**, 1084-1096.

Vlassara, H. Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, **1043**, 452-460.

-W-

Wang, B., Pace, R. D., Dessai, A. P., Bovell-Benjamin, A., Phillips, B. Modified extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values in meat with increased specificity and simplicity. *Journal of Food Science*, 2002, **67** 2833-2836.

Wautier, J. L., Zoukourian, C., Chappey, O. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy ; soluble receptor for advanced glycation end-products blocks hyper-permeability in diabetic rats. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, **97**, 238-243.

Weggemans, R. M., Rudrum, M., Trautwein, E. A. Intake of ruminant versus industrial trans fatty acids and risk of coronary heart disease : what is the evidence? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2004, **106**, 390-397.

Weisburger, J. H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research*, 2002, **506**, 9-20.

Wells-Knecht, M. C., Thorpe, R., Baynes, J. W. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry*, 1995, **34**, 15134-15141.

Westerhuis, J. A., Sijmen de Jong, Smilde, A. K. Direct Orthogonal Signal Correction. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2001, **56**, 13-25.

WHO. Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals, IPCS 210 Geneva: WHO, 1999.

Wold, S., Antti, H., Lindgren, F., Ohman, J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1998, **44**, 175-185.

Wold, J. P., Jorgensen, K., Lundby, F. Nondestructive measurement of light-induced oxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy and imaging. *Journal of Dairy Science*, 2002, **85** (7), 1693-1704.

Wold, J. P., Mielnik, M., Nondestructive assessment of lipid oxidation in minced poultry meat by autofluorescence spectroscopy. *Journal of Food Science*, 2000, **65** (1), 87-95.

Wolff, R. L. Further studies on artificial geometrical isomers of alpha-linolenic acid in edible linolenic acid-containing oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1993, **70**, 219-224.

Wolff, R. L. Ubiquité et caractéristiques des isomères trans de l'acide linoléique : une revue. *Oléagineux Corps gras Lipides*, 1995, **2**, 391-400.

Wolff, R. L., Combe, N. A., Destailats, F., et al. Follow-up of the D4 to D16 *trans*-18:1 isomer profile and content in French Processed foods containing partially hydrogenated vegetable oils during the period 1995-1999 - Analytical and nutritional implications. *Lipids*, 2000, **35**, 815-825.

Wolff, R. L., Sébédio, J.-L. Geometrical isomers of linolenic acid in low-calories spreads marketed in France. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1991, **68**, 719-725.

Wong, J. W., Shibamoto, T. Genotoxicity of Maillard reaction products. In *The Maillard reaction: consequences for the chemical and life sciences*. Ikan R., Ed., John Wiley & Sons Ltd, 1996, p. 129-159.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, J. M., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**, 4026-4037.

-Y-

Yaylayan V. A. In search of alternative mechanisms for the Maillard reaction. *Trends in Food Science and Technology*, 1990, **1**, 20-22.

Yaylayan, V., Wnorowski, A., Perez Locas, C. Why asparagines needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 1753-1757.

Yen, G. C., Chau, C. F., Lii, D. J. Isolation and characterization of most antimutagenic Maillard reaction products derived from xylose and lysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, **41**, 771-776.

Yen, G. C., Lai, Y. H. Influence of antioxidant on Maillard browning reaction in a caseine model system. *Journal of Food Science*, 1987, **52**, 1115-1116.

Yen, G. C., Tsai, L. C., Lii, J. D. Antimutagenic effect of Maillard browning products obtained from amino acids and sugars. *Food and Chemical Toxicology*, 1992, **30** (2), 127-132.

Yin, D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med*, 1996, **21**, 871-888.

Yoshida, H., Takagi, S. Antioxidative effects of sesamol and tocopherols at various concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, **79**, 220-226.

-Z-

Zamora, R., Hidalgo, F. J. Coordinate contribution of lipid oxidation and maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, **45**, 49-59.

Zambon, D., Sabate, J., Munoz, S., Campero, B., Casals, E., Merlos, M., Laguna, J. C., Ros, E. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women: a randomized crossover trial. *Annals of Internal Medicine*, 2000, **132**, 538-546.

Zandomenighi, M. Fluorescence of cereal flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47** (3), 878-882.

Zandomenighi, M., Carbonaro, L., Calucci, L., Pinzino, C., Galleschi, L., Ghiringhelli, S. Direct fluorometric determination of fluorescent substances in powders: The case of riboflavin in cereal flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51** (10), 2888-2895.

Zein El Abidine, S. Obesity and dietary habits of urban and rural populations in Lebanon. MSc thesis, American University of Beirut, Beirut, Lebanon, 1996.

Zock, P. L., Katan, M. B. Trans fatty acids, lipoproteins and coronary risk. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1997, **75**, 211-216.

Zoukourian, C., Wautier, M. P., Chappey, O. Endothelial cells dysfunction secondary to the adhesion of diabetic erythrocytes, modulation by iloprost. *International Angiology*, 1995, **15**, 195-200.

Zulkifli, S. N., Yu, S. M. The food frequency method for dietary assessment. *Journal of the American Dietetic Association*, 1992, **92**, 681-685.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : Composition nutritionnelle des principales noix et graines crues ou grillées
(D'après la USDA)**

Composition (pour 100g de MH)	Amandes, grillées à sec	Pistaches, cruces	Pistaches, grillées à sec	Arachides, cruces	Arachides grillées à sec	Sésame, graines crue, déshydratées
Macronutriments						
Eau (g)	2,6	3,9	1,9	6,6	1,55	4,6
Cendres (g)	3,2	3	3	2,3	3,6	4,4
Protéines (g)	22	20,6	21,3	25,8	23,6	17,7
Lipides (g)	52,8	44,4	45,9	49,2	49,6	49,6
Glucides (g)	19,2	27,9	27,65	16,1	21,5	23,4
Énergie (kcal)	597	557	571	567	585	573
Autres glucides						
Fibres alimentaires totales (g)	18,8	8,8	10,3	7,8	8	11,8
Glucose (g)	0,04	0,27	0,23			
Fructose (g)		0,17	0,13			
Maltose (g)	0,14	0,2	0,19			
Sucrose (g)	4,72	7	7,26			
Autres sucres (g)	0,7			0,5	0,4	0,2
Sucres totaux (g)	4,9	7,64	7,81	3,9	4,1	0,3
Minéraux						
Ca (mg)	266	107	110	92	54	975
Fe (mg)	4,5	4,1	4,2	4,5	2,2	14,5
Mg (mg)	286	121	120	168	176	351
P (mg)	489	490	485	376	358	629
K (mg)	746	1025	1042	705	658	468
Na (mg)	1	1	10	18	6	11
Zn (mg)	3,5	2,2	2,3	3,2	3,3	7,7
Cu (mg)	1,1	1,3	1,3	1,1	0,6	4
Mn (mg)	2,6	1,2	1,2	1,9	2	2,4
Se (µg)	2,8	7	9,3	7,2	7,5	5,7
Vitamines						
carotène (µg)	1	332	157	0	0	5
Folates (µg)	33	51	50	240	145	97
Niacine (mg)	3,85	1,3	1,42	12	13,52	4,51
Acide pantothénique (mg)	0,22	0,52	0,51	1,76	1,39	0,05
Riboflavine (mg)	0,85	1,16	0,15	0,13	0,09	0,24
Thiamine (mg)	0,07	0,87	0,84	0,64	0,43	0,79
Vit B6 (mg)	0,12	1,7	1,27	0,34	0,25	0,79
Tocophérol, alpha (mg)	26	2	2	8	7	0

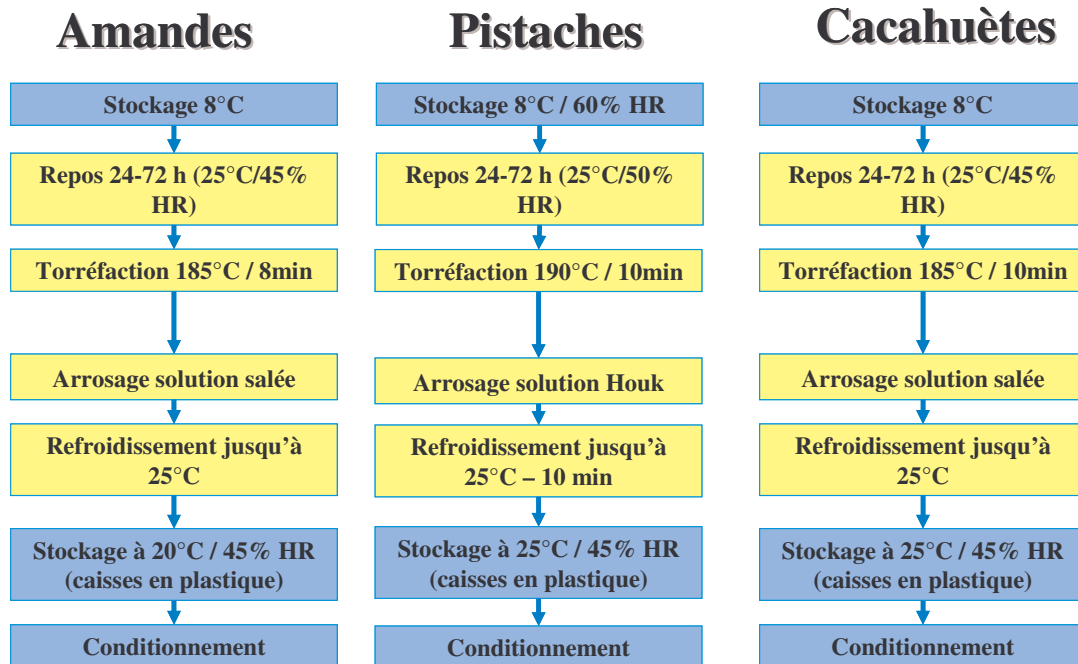
Acides aminés						
Tryptophane (g)	0,19	0,27	0,28	0,25	0,23	0,38
Thréonine (g)	0,70	0,67	0,69	0,88	0,81	0,73
Isoleucine (g)	0,71	0,90	0,93	0,9	0,83	0,76
Leucine (g)	1,52	1,55	0,61	1,67	1,53	1,35
Lysine (g)	0,62	1,15	0,19	0,92	0,85	0,56
Méthionine (g)	0,19	0,33	0,35	0,31	0,29	0,58
Cystine (g)	0,29	0,35	0,37	0,33	0,3	0,35
Phénylalanine (g)	1,19	1,06	1,10	0,33	1,22	0,94
Tyrosine (g)	0,55	0,41	0,43	1,04	0,96	0,74
Valine (g)	0,83	1,23	1,28	1,08	0,99	0,99
Arginine (g)	2,56	2,02	2,1	3,08	2,83	2,63
Histidine (g)	0,61	0,5	0,52	0,65	0,59	0,52
Alanine (g)	1,04	0,92	0,95	1,02	0,94	0,92
Acide aspartique (g)	2,83	1,81	1,88	3,14	2,88	1,64
Acide glutamique (g)	5,37	3,81	3,97	5,39	4,94	3,95
Glycine (g)	1,52	0,95	0,99	1,55	1,42	1,21
Proline (g)	1	0,81	0,84	1,13	1,04	0,81
Sérine (g)	1,04	1,22	1,27	1,27	1,16	0,96
Acides gras						
AGS totaux (g)	4,04	5,44	5,55	6,83	6,89	6,95
16:0 (g)	3,33	4,88	4,94	5,15	5,19	4,44
18:0 (g)	0,71	0,46	0,51	1,1	1,1	2,09
AGMI totaux (g)	33,65	23,31	24,21	24,42	24,64	18,75
16:1 (g)	0,25	0,46	0,45	0,009	0,009	0,14
18:1 (g)	33,4	22,68	23,58	23,75	23,96	18,52
20:1 (g)	0	0,17	0,17	0,66	0,66	0,07
AGPI totaux (g)	12,649	13,45	13,89	15,559	15,694	21,773
18:2 (g)	12,649	13,2	13,63	15,555	15,690	21,375
18:3 (g)	0	0,25	0,26	0,003	0,003	0,376

ANNEXE 2 : Littératures concernant l'étude de la fluorescence frontale dans les produits alimentaires (par type de produit)

Graines oléagineuses	Céréales	Corps gras et émulsions	Produits laitiers	Viandes et poissons
Liang J.H. 1999. Food Chem., 66, 103–108.	Zandomeneghi M. 1999. JAFc, 47(3), 878–882.	Genot, C. et al. 1992. Sci. Alim., 12, 687–704.	Dufour E. et Riaublanc A. 1997. Le Lait, 77, 651–675.	Dufour E. et Frençia J.P. 2001. Viandes et produits carnés, 22 (1), 9–14.
Liang J.H. 1996. J. Chinese Agric. Chem. Soc., 346, 715–722.	Zandomeneghi M. et al. 2000. JAFc, 48 (6), 2216–2221.	Sikorska et al. 2005. Food Chem., 89, 217–225.	Dufour E. et al. 2000. International Dairy Journal, 10, 81-93.	Allais, I. 2003. Sciences des Aliments, 23 (1), 128–131.
Jensen P.N. et al. 2004. European Food Research and Technology, 219, 294-304.	Zandomeneghi M. et al. 2003. JAFc, 51 (10), 2888–2895.	Granger C. 2005. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 43, 158–162.	Dufour E. et al. 2001. International Dairy Journal, 11, 465-473.	Allais, I. et al. 2004. Meat Science, 67 (2), 219-229.
	Allais I. et al. 2006. Journal of Food Engineering, 77, 896-909.	Rampon V. 2001. JAFc, 49, 4046–4051.	Birlouez-Aragon I. et al. 1998. International Dairy Journal, 8, 771-777.	Dufour E. et al. 2003. Food Research International, 36 (5) 415–423.
	Bonomi F. et al. 2004. Analytical Biochemistry, 329, 104–111.	Rampon V. 2004. Advances in Colloid and Interface Science, 108 –109, 87–94.	Birlouez-Aragon I. et al. 2005. Ann NY Acad Sci., 1043, 308–318.	Karoui R. 2006. Food Research International, 39, 349-355.
	Christensen J. 2005. Journal of the Institute of Brewing, 111, 3-10.	Pernille N. 2004. European Food Research and Technology, 219 (3), 294-304.	Leclere J. et al. 2001. JAFc, 49, 4682-4687.	Olsen E. et al. 2005. JAFc, 53, 7448-7457.
	Sinha N.K et Yamamoto P.K.W. 1997. Food Chem., 59, 387-393.	Kyriakidis N.B. et Sharkalis P. 2000. Journal of AOAC International, 83, 1435-1439.	Kulmyrzaev A. et Dufour E. 2002. Lait, 82, 725–735.	Wold J.P. et al. 1999. Journal of Food Science, 64, 377-383.
	Karoui R. et al, 2006. JAFc, 54, 2027-2034.	Birlouez-Aragon I. et al. 2004. Czech J. Food Sci., 22, 68-71.	Kulmyrzaev A. et al. 2005. International Dairy Journal, 15, 669–678.	Wold J.P. et Mielnik M. 2000. Journal of Food Science, 65, 87-95.
	Jensen, S.A. et al. 1982. Cereal Chemistry, 59, 477-484.		Granger C. 2006. International Dairy Journal, 16, 489-496.	Wold J.P. et al. 2002. Journal of Food Science, 67, 2397-2404. Hasegawa K. et al. 1993. Nippon Shokuhin Kogyo

	<p>Jensen, S.A. et al. 1984. <i>Journal of Cereal Science</i>, 2, 187-201.</p> <p>Symons S. J. et al. 1996. <i>Journal of Cereal Science</i>, 23, 73-83.</p> <p>Birlouez-Aragon I., et al. 2004. <i>Czech J. Food Sci.</i>, 22, 68-71.</p> <p>Rizkallah J. et al. 2008. <i>Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems</i>, in press.</p>		<p>Herbert S. et al. 2000. <i>Le Lait</i>, 80, 621-634.</p> <p>Miquel Becker E. 2003. <i>J. Dairy Science</i>, 86,2508-2515</p> <p>Karoui R. et al. 2003. <i>Le Lait</i>, 83, 251-264.</p> <p>Karoui R. et al. 2004. <i>Le Lait</i>, 84, 359-374.</p> <p>Karoui R. et al, 2005. <i>Le Lait</i>, 85, 223-236.</p> <p>Karoui R. et Dufour E. 2006. <i>Intern. Dairy J.</i>, 16, 1490-1497.</p> <p>Mazerolles G. et al. 2001. <i>Le lait</i>, 81, 509-527.</p> <p>Wold et al. 2002. <i>Journal of Dairy Science</i>, 85, 1693-1704.</p> <p>Christensen J. et al. 2005. <i>Chemom Intel Lab Syst</i>, 75, 201-208.</p> <p>Christensen J. et al. 2003. <i>Journal of Dairy Science</i>, 86, 1101-1107.</p> <p>Garimelle Purna S.K. et al. 2005. <i>Journal of Dairy Science</i>, 88, 470-477.</p>	<p>gakkaiishi, 40, 150-153.</p> <p>Kamarei A.R. et Karel M. 1984. <i>Journal of food science</i>, 49, 1517-1520.</p> <p>Moller et al. 2003. <i>JAFc</i>, 51, 1224-1230.</p> <p>Swatland H.J. et al. 1997. <i>Food Quality and Preference</i>, 8, 233-239.</p> <p>Andersen C.M. et al. 2003. <i>JAFc</i>, 51, 466-476.</p> <p>Pedersen D.K. 2002. <i>Journal of Chemometrics</i>, 16, 451-460.</p> <p>Frencia J.P. et al. 2003. <i>Science des aliments</i>, 23, 142-145.</p> <p>Gatellier P. et al. 2007. <i>Meat Science</i>, 76, 543-547.</p>
--	---	--	--	---

ANNEXE 3 : Description du procédé industriel de torréfaction des échantillons de noix et graines



ANNEXE 4 : Dérivation des acides aminés et leurs dérivés de glycation

Etape	Protocole	Matériels	Commentaires
<p>1 <i>Préparation de la solution (chlorure de thionyl + méthanol) Solution à refaire toutes les semaines</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - 1,46 ml de SOCl₂ (Fluka) - 98,54 ml de méthanol (Carlo Erba for HPLC) 	<ul style="list-style-type: none"> -Flacon à paroi épaisse (ne pas travailler dans un bécher). -Mettre le SOCl₂ avec une pipette automatique et rajouter le méthanol avec une éprouvette bien propre et surtout bien sèche car le chlorure de thionyl réagit violemment avec l'eau. 	<ul style="list-style-type: none"> -Toujours mettre le SOCl₂ d'abord. -Rajouter le méthanol lentement (contre la paroi du flacon) jusqu'à ce qu'il y ait plus de bulles (la réaction a lieu) puis il est possible de rajouter le méthanol plus rapidement car une fois que la réaction est finie, le méthanol est en excès. -Si la réaction exothermique gêne le manipulateur, il est possible de travailler dans de la glace. -En présence d'eau, il y aura des projections. Il faut alors jeter la solution. -Bien fermer le flacon de SOCl₂ après utilisation car il réagit avec l'humidité de l'air.
<p>2 <i>Estérification par le méthanol</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 1ml de (SOCl₂ + MeOH) dans l'Eppendorf contenant l'extrait sec. - Vortexer jusqu'à dissolution totale. 	<ul style="list-style-type: none"> - P1000 - Agitateur Vortex 	
<p>3</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Verser le contenu de l'Eppendorf dans un tube en pyrex. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tubes en pyrex (10 cm de hauteur, fermeture à vis, bouchon en téflon). 	<ul style="list-style-type: none"> -Nettoyer les tubes d'abord au liquide vaisselle à l'aide d'un goupillon, puis les faire tremper une nuit dans un mélange acétone / eau. -Les tubes doivent être bien propres pour éviter les contaminations.
<p>4</p>	<ul style="list-style-type: none"> Mettre les tubes dans l'étuve à 110°C pendant 30 minutes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Etuve à 110°C 	<ul style="list-style-type: none"> -Bien fermer les tubes. -Vérifier après 5 minutes qu'il n'y ait pas d'évaporation.

5	- Sécher sous azote.	- 2 rampes et 1 bouteille d'azote.	-Laver les têtes à l'acétone afin d'éviter les contaminations.
6 <i>Acylation des fonctions NH₂</i>	- Ajouter 2 ml de dichlorométhane (Carlo Erba). - Ajouter 400 µl de TFAA (Sigma). - Laisser réagir pendant 1 heure à température ambiante, bouchons bien fermés.	- P1000	-Mouiller le cône avant de pipeter le dichlorométhane. -Bien mettre le dichlorométhane au fond du tube et non sur les parois. -Ne pas vortexer, agiter doucement les tubes.
7	- Sécher sous azote.	- 2 rampes et 1 bouteille d'azote.	-Laver les têtes à l'acétone afin d'éviter les contaminations.
8	- Ajouter 1 ml de dichlorométhane (Carlo Erba). - Bien vortexer.	- P1000 - Agitateur Vortex	-Serrer le milieu du tube avec les doigts afin que le liquide ne monte pas trop haut.
9	- Mettre environ 333 µl dans un vial et sécher sous azote. Répéter 3 fois l'opération.	- 2 rampes et 1 bouteille d'azote. - Pipettes jetables car le volume prélevé est approximatif.	-Laver les têtes à l'acétone afin d'éviter les contaminations.
10	- Ajouter 100 µl de dichlorométhane. - Saturer avec l'azote puis boucher immédiatement. - Stocker le vial au congélateur pendant 15 min. - Pipeter le contenu du vial et le transvaser dans un insert qu'on remet dans le vial.	- P100	-Stocker le vial au congélateur si l'injection n'est pas immédiate.

ANNEXE 5 : Paramètres de la GC/MS pour le dosage de la CML

Paramètres du chromatographe en phase gazeuse

Colonne : colonne capillaire DB5-MS (longueur : 30 m, diamètre interne : 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25 mm) composée de 5% de phényle et de 95% de méthylpolysiloxane.

Mode d'injection : Split (40%) à 250°C.

Volume d'injection : 1 µl.

Gaz vecteur : hélium à flux constant de 1,5 ml/min.

Programme de température :

Température initiale : 70°C pendant 2 min

1^{er} palier : de 70°C à 260°C par 5°C/min

2^{ème} palier : de 260°C à 290°C par 15°C/min

Température finale : 290°C pendant 5 min

Durée du programme : 47 min.

Paramètres du spectromètre de masse

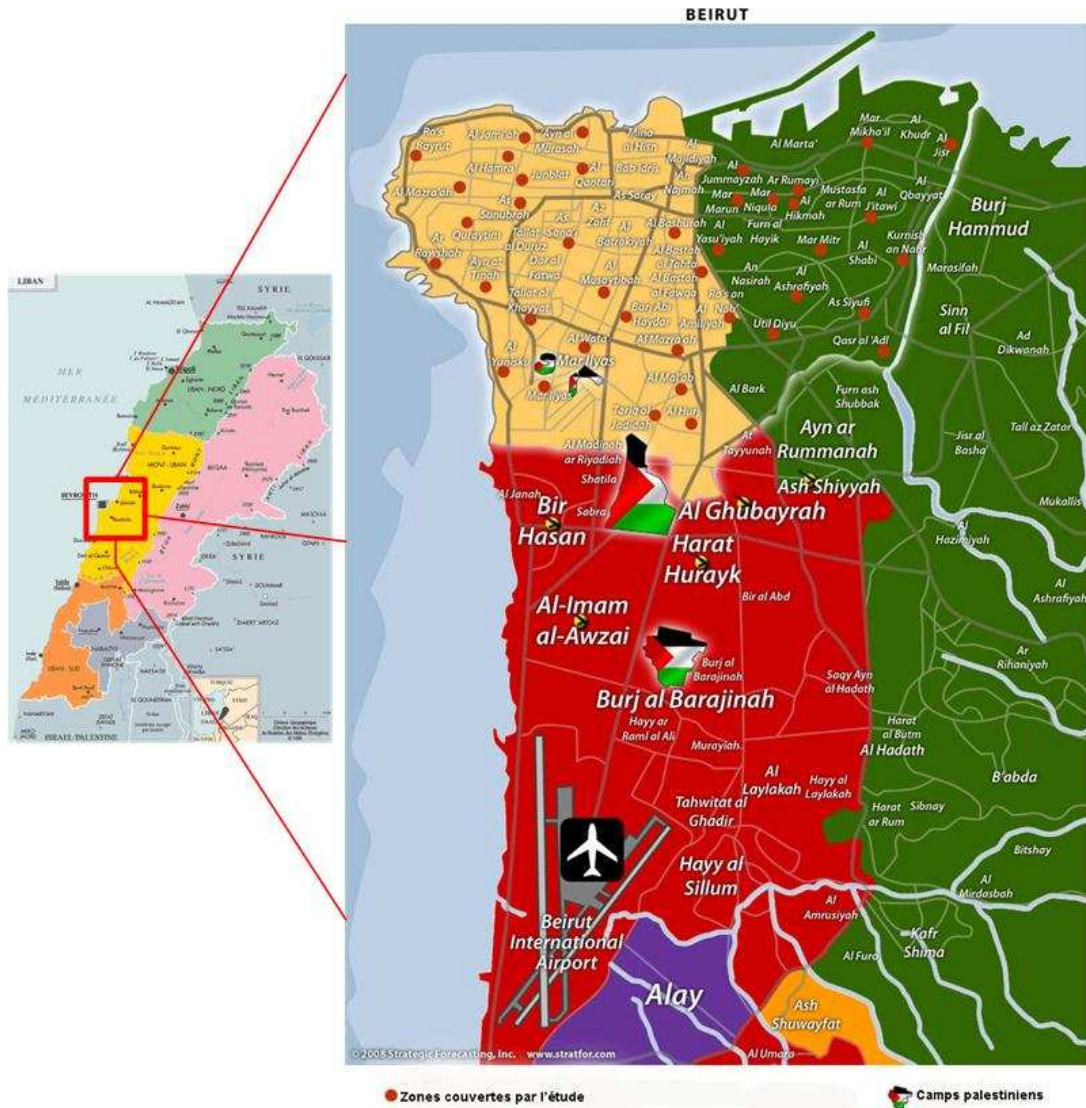
Mode d'ionisation : impact électronique à 70 eV.

Mode d'acquisition : SIM (Selected Ion Monitoring).

Détection : trappe d'ions, source à 200°C.

Détection MS/MS : l'ion parent de $m/z=392$ est isolé avec une énergie de 0,90V. Les ions générés sont : 374 (25%), 360 (100%), 332(40%) et 206(10%).

ANNEXE 6 : Périmètre de l'enquête alimentaire



ANNEXE 7 : Caractéristiques sociodémographiques de l'échantillon (% , n=400)

Age (ans)/sexe	Hommes	Femmes
25-34	17,0	17,5
35-44	11,8	14,8
45-54	10,3	11,5
55-64	8,8	8,5
Statut matrimonial	Tous	
Célibataire	35,5	
Marié	64,5	
Situation professionnelle/occupation	Tous	
ouvrier / employé	17,3	
Artisan / secrétaire / petit commerçant/agriculteur	19,8	
Technicien supérieur/chef d'entreprise/enseignant	14,8	
Professeur/cadre supérieur/professions libérales	9,8	
En recherche d'emploi	5,0	
Femme au foyer	23,3	
Retraité	3,0	
Etudiant/en formation/stage non rémunéré	7,0	

ANNEXE 8 : Questionnaire quantitatif de fréquence

Numéro individuel: _____

Quartier: _____

1. Numéro de téléphone : _____

Date: _____

2. Prénom et nom de famille: _____

3. Sexe: (1) Homme _____ (2) Femme _____

4. Age: (1) 25-34 _____ (2) 35-44 _____ (3) 45-54 _____ (4) 55-64 _____

5. Poids corporel (Kg): _____

6. Situation professionnelle:

1) Employé

Ouvrier/employé

Artisan/petit commerçant/secrétaire/agriculteur

Technicien supérieur/chef d'entreprise/enseignant

Professeur/cadre supérieur/professions libérales

2) En recherche d'emploi

3) Femme au foyer

4) Retraité

5) Etudiant/en formation/stage non rémunéré

7. Situation professionnelle du conjoint : _____

Code	Type d'aliment	Portion de référence (PDR)	Fréquence de consommation (qualitative)	Portion habituelle (en fonction de la PDR)	Fréquence de consommation (exprimée en terme de PDR)	Précisions complémentaires
T	<i>Tahina</i>					
T1	Hommos tahina	1 petit plat	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
T2	Baba ghannouj	1 petit plat	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
T3	Taratour sauce	1 cuillère à soupe	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
T4	Dibs tahina	1 cuillère à soupe	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
T5	Moufattaka	1 portion moyenne	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			

H	<i>Halawa Tehinieh</i>	1 cuillère à soupe	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
GO	<i>Graines oléagineuses, grillées et salées</i>					
GO1	Amandes, GS	½ verre	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
GO2	Pistaches, GS	½ verre	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
GO3	Cacahuètes, GS	½ verre	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
GO4	Pépins citrouille, GS	½ verre	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			
GO5	Pépins tournesol, GS	½ verre	1 <input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour 2 <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem 3 <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois 4 <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois 5 <input type="checkbox"/> jamais			

G06	Pépins melon, GS	½ verre	<input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois <input type="checkbox"/> jamais			
G07	Noix mélangées, GS	½ verre	<input type="checkbox"/> au moins 1 fois par jour <input type="checkbox"/> au moins 2-3 fois par sem <input type="checkbox"/> au moins 4 fois par mois <input type="checkbox"/> moins de 2 fois par mois <input type="checkbox"/> jamais			

ANNEXE 9 : Conversion des portions de référence du questionnaire quantitatif de fréquence en masse (g)

Aliment	Portion en mesure ménagère	Masse (g)
Tahina	1 cuillère à soupe	11
Hommos tahina	1 petit plat	120
Baba ghannouj	1 petit plat	106
Taratour sauce	1 cuillère à soupe	18,5
Dibs tahina	1 cuillère à soupe	20
Moufattaka	1 portion moyenne	138
Halawa Tehinieh	1 cuillère à soupe	29
Amandes, GS	½ verre*	63
Pistaches, GS	½ verre	64
Cacahuètes, GS	½ verre	65
Pépins citrouille, GS	½ verre	28
Pépins tournesol, GS	½ verre	12
Pépins melon, GS	½ verre	13
Noix mélangées, GS	½ verre	60

* Le volume du verre est de 240 ml.