N° /__/__/__/__/__/__/__/__/__/__/

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

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

Spécialité : Sciences de l'aliment

présentée et soutenue publiquement par

Sophie CHERIOT

le 11 décembre 2007

ROLE DES PRODUITS DE LA REACTION DE MAILLARD DANS L'INHIBITION DE L'OXYDATION ENZYMATIQUE DES PHENOLS ET DES LIPIDES

Directeur de thèse : ***Jacques NICOLAS***

Travail réalisé au Cnam, UMR 1211, Chaire de Biochimie Industrielle et Agro-alimentaire, F-75141 Paris

Devant le jury :

M. Pierre GIAMPAOLI, Professeur, **ENSIA**	**Président**
Mme Claude GENOT, Directrice de recherches, **INRA**	**Rapporteur**
M. Michel GIRARDIN, Professeur, **INPL – ENSAIA**	**Rapporteur**
M. Philippe MORAS, Ingénieur, **CTIFL**	**Examinateur**
M. Jacque NICOLAS, Professeur, **Cnam**	**Examinateur**
Mme Catherine BILLAUD, Ingénieur de recherches, **Cnam**	**Invitée**

TABLE DES MATIERES

Remerciements *(et excuses)* v

Résumé vii

Abstract viii

Liste des figures ix

Liste des tableaux xv

Liste des équations xviii

Liste des publications et communications xix

Participations à des congrès xix

Publications xx

Liste des abréviations xxi

Introduction 1

Travaux antérieurs 4

1. La réaction de Maillard 4

1.1. Découverte et redécouverte de la réaction de Maillard 5

1.2. Chimie de la réaction de Maillard 6

1.3. Les produits de chauffage du glucose seul et de la cystéine seule 17

1.4. Formation d'arômes par la réaction de Maillard 20

1.5. Propriétés anti-oxydantes des produits de la réaction de Maillard (PRM) 22

1.6. Effets immunologiques et toxicologiques des produits de la réaction de Maillard (PRM) . 29

2. Le brunissement enzymatique des fruits et légumes 33

2.1. Aspects économiques du brunissement enzymatique 33

2.2. Rôle physiologique des polyphénoloxydases (PPO) 34
2.3. Caractéristiques réactionnelles et structurales des polyphénoloxydases 35
2.4. Prévention du brunissement enzymatique 43

3. L'oxydation enzymatique des lipides 53
3.1. Les étapes de l'oxydation aérobie des lipides catalysée par la lipoxygénase (LOX) 54
3.2. Le site actif et la spécificité d'oxydation de la LOX 55
3.3. La spécificité de substrat de la LOX et les réactions enzymatiques catalysées 59
3.4. Rôles physiologiques de l'oxydation lipidique catalysée par la LOX dans les végétaux 59
3.5. Effets de l'oxydation enzymatique des lipides dans les aliments 61
3.6. Prévention de l'oxydation enzymatique des lipides dans les aliments 64

Objectifs de l'étude 66

Matériels et méthodes 68

1. Matériel biologique 68

2. Produits chimiques et préparation des produits inhibiteurs 69
2.1. Introduction à la méthodologie des plans d'expériences 69
2.2. Formation des produits inhibiteurs de l'activité PPO 70
2.3. Préparation des produits dont l'activité mutagène a été testée par le test d'Ames 74
2.4. Optimisation de la préparation des PRM inhibiteurs de l'activité LOX 75

3. Caracterisation des systèmes enzymatiques 78
3.1. Mesure des activités enzymatiques 78
3.2. Dosage des protéines 81
3.3. Détermination des masses moléculaires 81
3.4. L'électrophorèse 83

4. Méthodes d'extraction et de purification des enzymes 84
4.1. Extraction et purification de la PPO d'aubergine et de pomme 84
4.2. Extraction et purification de la PPO de pomme de terre 84
4.3. Extraction et purification de la lipoxygénase de farine de fève 86

5. Caracterisation des composés inhibiteurs 88

5.1. Dosage des thiols par la méthode d'Ellman 88
5.2. Détermination des propriétés spectrales d'échantillons inhibiteurs 89
5.3. Méthodes chromatographiques appliquées aux composés inhibiteurs 90

6. Méthodes de mesure du pouvoir antioxydant 97
6.1. Mesure du pouvoir réducteur et antiradicalaire par le test DPPH° 97
6.2. Mesure du pouvoir antiradicalaire par le test AAPH° 98
6.3. Mesure du pouvoir chélateur du cuivre en utilisant le tétraméthylmurexide (TMM)..... 100

7. Le test d'Ames pour mesurer l'activité mutagéne et antioxydante des PRM..... 103
7.1. Les souches bactériennes utilisées..... 103
7.2. Mesure de la mutagénicité des PRM..... 105

8. Mesure de la couleur et application des PRM pour inhiber le brunissement enzymatique..... 109

Résultats et discussion 110

1. Caractérisation des systèmes enzymatiques..... 110
1.1. La PPO de pomme de terre 110
1.2. La LOX de farine de fève 121

2. Action des PRM et du mélange sur l'activité PPO et le brunissement enzymatique 125
2.1. Mesure du pouvoir inhibiteur, dosage des réactants résiduels et du HMF dans les PRM 125
2.2. Etude des composés inhibiteurs dans des mélanges composé carbonylé / cystéine chauffée : formation, stabilité, fractionnement et analyses des produits néoformés..... 131
2.3. Cinétique d'inhibition des PPO par des mélanges HMF ou furfural / cystéine chauffée – comparaison avec les PRM..... 163
2.4. Propriétés antioxydantes du mélange cystéine chauffée / HMF et des PRM inhibiteurs de l'activité PPO..... 169
2.5. Propriétés mutagènes du mélange cystéine chauffée / HMF et du PRM comparées à celles des réactifs..... 173
2.6. Mise en œuvre des PRM et des mélanges pour inhiber le brunissement enzymatique . 180

3. Action des PRM sur l'oxydation enzymatique des lipides 187
3.1. Optimisation de l'inhibition de l'oxydation enzymatique des lipides..... 187

3.2. Effet direct et cinétique d'inhibition de l'activité LOX de farine de fève par les PRM_{opt2} . 201
3.3. Mode d'inhibition de l'activité LOX par les PRM_{opt2} 204
3.4. Stabilité du PRM au cours du stockage dans différentes conditions 207

Conclusions générales et perspectives 209

ANNEXES 215

Annexe 1 : Liste des produits chimiques utilisés 215

Annexe 2 : Résultats du plan d'expériences à 4 facteurs et 5 niveaux pour l'optimisation de l'inhibition de la LOX de fève par les PRM issus de lysine (chapitre 3 – § 3.1.2.) 219

Annexe 3 : Résultats du plan d'expériences à 2 facteurs et 5 niveaux pour l'optimisation du traitement thermique des PRM glucose (0,08 M) – lysine (0,08 M) pH ≈10, en vue de l'inhibition de la LOX de fève (Chapitre 3 § 3.1.3.) 220

Bibliographie 221

Résumés des publications 241

Remerciements *(et excuses)*

C'est une habitude que de remercier au début d'un tel travail tous ceux qui, plus ou moins directement, ont contribué à le rendre possible ET agréable. Même si dans mon cas, cette liste peut sembler longue, c'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse. Je désire alors exprimer ma profonde gratitude :

- Au Professeur Jacques NICOLAS pour avoir accepté d'encadrer ce travail depuis le DEA, de m'avoir dirigée patiemment et pour son soutien pendant la rédaction de cette thèse,
- Au Professeur Pierre GIAMPAOLI qui m'a honoré en acceptant d'être Président de ce jury, mais également pour tous ses conseils toujours pertinents et ses encouragements.
- A Mme Claude GENOT et M. Michel GIRARDIN pour avoir accepté d'évaluer mon travail et d'être rapporteurs de ma thèse.
- A M. Philippe MORAS pour avoir accepté d'être examinateur dans ce jury… et pour m'avoir orienté vers la polyphénoloxydase d'aubergine…

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude envers le Dr. Catherine BILLAUD pour ses conseils particulièrement précieux, sa disponibilité mais surtout pour sa rigueur scientifique qui m'a permis de faire progresser rapidement ce travail et qui, je l'espère a quelque peu déteint sur ma personnalité. Ce fut un plaisir de travailler avec toi !

J'ai eu la chance au cours de ma thèse de pouvoir participer à une mission scientifique de trois mois financée par le COST Action 927. Je remercie vivement le Pr. Karl-Heinz Wagner de m'avoir accueillie dans son département : Ein herlzilches Dankeschön möchte ich an Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz WAGNER richten, der mir im Laufe meinder Dissertation stets unterstützend mit fachlichem und persönlichem Rat zur Seite stand. Ich möchte Stephan Pöchtrager für die nette Zusammenarbeit beim zählen der 688 008 Kolonien während meines drei-monatigen Aufenthalts in Wien danken.

J'adresse mes chaleureux remerciements aux personnes du département de Sciences de l'Aliment et plus particulièrement à l'équipe CSNAAC, à Mmes Marie-Noëlle MAILLARD et Barbara REGA, à M. Pierre GIAMPAOLI et Mlles Muriel MAIRE et Claire ORDONNAUD qui ont conjugué gentillesse et aide apportée à mon travail lors des expériences de mesure de pouvoir antioxydant et des analyses en chromatographie gazeuse. Merci pour vos encouragements et votre sympathie.

Merci à Mlle Céline NIQUET et M. Frédéric TESSIER pour m'avoir initiée à la chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse et pour leur aide en chimie

organique, … mais c'est aussi pour leur soutien et leur amitié que je souhaite les remercier.

Merci à M. Jean-Paul MONIN du laboratoire de génie analytique du Cnam, pour sa disponibilité et son aide précieuse dans la réalisation et l'analyse des spectres en infra-rouge.

Je ne saurais oublier les stagiaires : Stephan, Céline, Anna, Magali, Aline, Claire, Omar, Sofiane, Julie, Sophie, Olivier, Fanny, Jean-Pierre, Massoud, Virginie, Greg, Stéphane, Valérie, Molobaly, Jennifer, Elodie, Thomas, Julie, Alexandra, Lydia, Faten, Véronique et Véronique. Merci pour votre soutien et les chaleureux moments partagés …
(pardon à celles ou ceux que j'oublie de citer ici…)

Je dois et j'adresse un remerciement tout particulier, avec toute mon affection et ma reconnaissance, à TOUS mes collègues de la chaire de biochimie industrielle et agro-alimentaire : (dans le désordre …) Rebeca, Stéphane, Loïc et l'autre Loïc, Gabrielle, Sylvie, Lala, Frédérique, Marie-Line, Michèle, Aline, Ysilda, Simon, Potus, Laure, Christelle, Yin-Nai, Jérôme et Elise. Merci pour tous les agréables moments passés ensemble au travail et en dehors. A l'accueil chaleureux que vous m'avez fait lors de mon arrivée en DEA et au soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma thèse, dans les « hauts » mais surtout dans les « bas ».
Je vous exprime toute mon amitié.

Par ailleurs, ayant travaillé sur des composés soufrés, dont la puanteur n'a d'égal que la ténacité, je tiens à présenter mes excuses les plus sincères en raisons des gênes olfactives occasionnées par certains composés (furfurylthiol et sulfure d'ammonium principalement) auprès de toutes les personnes (en particulier Loïc LOUARME), qui ont eu la (mal ?)chance de partager paillasses et laboratoires….

Un dernier mot pour ma famille et pour David, pour leur patience et leur soutien, pour leur compréhension (surtout vers la fin), pour m'avoir supporté, et avoir supporté *mes absences à répétition* au cours de ces quatre années *!!!*

RESUME

La recherche de substituts aux antioxydants alimentaires synthétiques (sulfites, BHA : di-tertio-butylhydroxyanisol et BHT : di-tertio-butyl-hydroxytoluène) utilisés contre l'oxydation des phénols et des lipides est actuellement très active en raison des effets allergènes et toxiques de ces additifs.

Il a été montré que les produits de la réaction de Maillard (PRM) formés lors du chauffage de la cystéine et du glucose en milieu acide, sont de très puissants inhibiteurs du brunissement enzymatique des fruits et légumes du à l'oxydation des phénols catalysée par les polyphénoloxydases (PPO) en présence d'oxygène. Afin de pouvoir caractériser les composés inhibiteurs des PRM, ces systèmes modèles ont été simplifiés en un mélange de composés néoformés à partir de la réaction entre le HMF et la cystéine chauffée ou le sulfure d'ammonium. Ce mélange s'est révélé être environ trois fois plus efficace que les PRM pour inactiver la PPO de différentes origines végétales. La réaction de formation des composés inhibiteurs a été étudiée et une comparaison des pouvoirs antioxydants (tests AAPH° et DPPH°) et chélateurs du cuivre (test TMM) a été réalisée. Aux concentrations suffisantes pour prévenir le brunissement de purées de fruits et de légumes mesuré par des tests colorimétriques (L*, a*, b*), les produits néoformés, plus efficaces que les sulfites, n'ont montré aucun effet mutagène d'après les tests d'Ames réalisés sur les souches TA 98 et TA 102.

Les lipoxygénases (LOX) catalysent l'oxydation des acides gras poly-insaturés. La méthodologie des plans d'expériences a permis la détermination des PRM ayant le plus fort pouvoir inhibiteur (PI) de l'activité LOX extraites du soja et de la farine de fève : les PRM issus du chauffage de la lysine et du glucose à 120 °C pendant 15 h montrent une inhibition non-compétitive irréversible de la LOX. De plus, ces PRM sont particulièrement stables au cours du temps de stockage : congelés, le pouvoir inhibiteur de ces PRM ne montre pas d'évolution significative au cours des deux premiers mois de conservation.

Mots clés : Réaction de Maillard, brunissement enzymatique, oxydation enzymatique des lipides, antioxydant, test d'Ames.

ABSTRACT

In recent years, synthesis of « natural » and safe antioxidants attracted attention due to the allergenicity or toxic effects induced by the synthetic additives currently used (sulfites, BHA: tert-butyl-4-hydroxyanisole and BHT: 2,6-di-tert-butyl-hydroxytoluene) to prevent phenol and lipid oxidation.

Maillard reaction products (MRP) made from cysteine and glucose were proven to be very powerful inhibitors of enzymatic browning catalysed by polyphenoloxidase (PPO) in the presence of oxygen and detrimental to the quality of fresh and minimally processed fruits and vegetables. Because Maillard reaction is a complex whole of reactions between amino and aldehydic or ketonic compounds, a simple model reaction from heated thiol with carbonyl compounds was studied. Determination of the inhibitory constants and colorimetric measurements (L^*, a^*, b^*) showed that neoformed products from heated cysteine or ammonium sulphide mixed with 5-hydroxymethylfurfural (HMF) elicited a stronger inhibitory potency toward enzymatic browning of potato, eggplant, apple and mushroom than MRP. This strong inhibitory potency was linked to an inactivation of the enzyme. A comparison of the antioxidant (AAPH° and DPPH° tests) and copper-chelating properties (TMM test) between the MRP and the neoformed products was drawn. Before considering the potential application of such anti-browning model mixtures, their toxicological effects were studied in Ames test on TA 98 and TA102 strains to determine the best process conditions to produce safe antioxidant compounds.

Lipoxygenases (LOX) are iron-containing enzymes that catalyse the dioxygenation of polyunsaturated fatty acids. Optimal conditions to obtain Maillard reaction products (MRP) with a maximal inhibitory potency (IP) toward lipoxygenase activity were determined using the surface response methodology: MRP from lysine heated at 120 °C for 15 h with glucose showed almost irreversible non-competitive inhibition of LOX extracted from soja and horsebean flour. These MRP were stable for at least 3 months when frozen.

Keywords: Maillard reaction, enzymatic browning, enzymatic lipid oxidation, antioxidant, Ames test

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard (adapté de Hodge, 1953) 5
Figure 2 : Représentation conceptuelle de la réaction de Maillard : formation et interaction des « groupes » chimiques (adapté de Yaylayan, 1997) 7
Figure 3 : Addition nucléophile d'une fonction amine sur la fonction carbonyle d'un sucre réducteur (D-glucose) lors de la première étape de la réaction de Maillard 8
Figure 4 : Schéma de la formation du composé d'Amadori dans la réaction de Maillard entre le glucose et un composé aminé (d'après Chuyen *et al.*, 1998) 8
Figure 5 : Schéma de la réaction de déshydratation forte conduisant à la formation de composés α–dicarbonylés. 9
Figure 6 : Décomposition de la cystéine par le mécanisme de la dégradation de Strecker : formation du sulfure d'hydrogène (I) et du 2-mercaptoéthanal (II) (d'après Belitz *et al.*, 2004) 11
Figure 7 : Schéma de synthèse de mélanoïdines à partir de réductones et de résidus d'arginine (d'après Hofmann, 1998) 12
Figure 8 : Relation entre l'absorbance (350 nm) et le pouvoir inhibiteur de la PPO pomme de PRM dérivés de systèmes modèles fructose/cystéine (□) et de glucose/cystéine (■) au cours du temps de chauffage (0 – 48 h) à 90 °C (d'après Billaud *et al*. 2003) 28
Figure 9 : Formation des quinones catalysée par la diphénoloxydase en présence d'oxygène. 36
Figure 10 : Formation des mélanoidines à partir de la tyrosine (adapté de Lerner, 1953). 36
Figure 11 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases 37
Figure 12 : Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la tyrosinase (d'après Lerch, 1995) 39
Figure 13 : Structures de composés phénoliques substrats des polyphénoloxydases 41
Figure 14 : Coupe longitudinale de tubercule de pomme de terre (adapté de Reeve *et al.*, 1969) 42
Figure 15 : Inactivation thermique de la fraction thermostable de la lipase, lipoxygénase, polyphénoloxydase et peroxydase de pomme de terre (d'après Svensson, 1977) 45
Figure 16 : Effets de la cystéine (Cy-SH) sur l'oxydation enzymatique d'*o*-diphénols (d'après Richard-Forget *et al.*, 1992) 52

Figure 17 : Cascade de réactions enzymatiques impliquées dans l'oxydation des lipides (adapté de Gardner, 1988) 53
Figure 18 : Schéma des voies catalytiques de l'oxydation de l'acide linolénique en 13-hydroperoxyde et / ou 9-hydroperoxyde par la LOX..... 55
Figure 19 : Schéma et caractéristiques de la structure du groupement prosthétique de la LOX de soja (adapté de Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1997)..... 56
Figure 20 : Voies réactionnelles de l'oxydation des lipides catalysée par la LOX en milieu aérobie (adapté de Gardner, 1988) 56
Figure 21 : Mécanisme de l'oxydation de l'acide linoléique par la LOX – Implication du fer du site actif (d'après Tejero *et al.*, 2004) 57
Figure 22 : Ruptures des chaînes des 13- et 9- hydroperoxydes d'acide linoléique et linolénique catalysées par l'hydroperoxyde-lyase..... 61
Figure 23 : Structures des composés carbonylés mélangés (4 mM) à la cystéine chauffée (10 mM).... 72
Figure 24 : Structures des composés soufrés (10 mM) chauffés à 115 °C pendant 200 min puis mélangés au HMF (4 mM) à 0 °C (3 h) pour produire les composés néoformés inhibiteurs. 73
Figure 25 : Activité LOX de fève (nkat) en fonction du volume d'enzyme mis en cuve (µL) pour les deux extraits enzymatiques de farine de fève utilisés (C50 : ○ et GFd : □) – Mise en évidence d'une relation non linéaire pour des volumes supérieurs à 20 µL 80
Figure 26 : Courbe de calibration de la colonne Sephacryl S – 200 HR utilisée pour la détermination du poids moléculaire de la LOX de fève 82
Figure 27 : Spectres d'absorbance du HMF et du furfural..... 91
Figure 28 : Chromatogramme à 283 nm d'une solution de HMF et de furfural..... 91
Figure 29 : Gamme d'étalonnage externe pour doser le HMFpar HPLC-DAD 92
Figure 30 : Gamme d'étalonnage pour le dosage du glucose par HPLC-DDL 94
Figure 31 : Courbes expérimentales obtenues dans la mesure du pouvoir antiradicalaire par le test AAPH° mettant en évidence un temps d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique en présence de composés antioxydants 100
Figure 32 : Réaction de dosage des ions cuivriques libres en utilisant le tétraméthylmurexide (TMM) 101
Figure 33 : Schéma du protocole pour test d'Ames 107
Figure 34 : Activité PPO de l'extrait brut de pommes de terre de différentes variétés récoltées en 2004, 2005 et 2006 111
Figure 35 : Activité PPO de l'extrait brut de pomme de terre en fonction du pourcentage de Triton X-100 (a), de la concentration en acide ascorbique (b), de la concentration en cystéine (c) , du pH

de la solution de tampon phosphate (d) et du pourcentage de PVPP (e) dans le milieu d'extraction. 113
Figure 36 : Profils d'activité PPO et d'absorbance (280 nm) des fractions issues de la chromatographie d'interactions hydrophobes sur gel TSK-butyl 650 M Toyopearl..... 115
Figure 37 : Activité PPO de pomme de terre vis-à-vis du 4-méthylcatéchol (20 mM - ■) et de l'acide chlorogénique (10 mM - ○) en fonction du pH..... 116
Figure 38 : Structures des composés phénoliques utilisés comme substrats de la PPO de pomme de terre..... 118
Figure 39 : Structures des acides carboxyliques et du 4-hexylrésorcinol testés en tant qu'inhibiteurs de la PPO de pomme de terre..... 120
Figure 40 : Chromatographie de gel filtration sur Sephacryl S – 200 HR de la fraction C_{50d} de la farine de fève..... 122
Figure 41 : Activité de la LOX purifiée de fève (GFd – 20 µL) en fonction de la concentration en acide linoléique (1-15 mM à pH 6,5 et à 30 °C) 124
Figure 42 : Concentration en HMF et pouvoir inhibiteur (PI) vis-à-vis de l'activité PPO de pomme de systèmes modèles (glucose : 0 - 1 M / cystéine : 0,25 M) chauffés à 115 °C pendant 200 min après acidification initiale (pH = 2) ou non 129
Figure 43 : Récapitulatif des différents échantillons testés - Mise en évidence du rôle du HMF dans la formation des composés inhibiteurs 129
Figure 44 : Cinétique d'apparition à 0 °C des composés inhibiteurs au cours du temps de mélange entre des composés carbonylés (4 mM) et la cystéine chauffée (10 mM) à 115 °C pendant 200 min..... 132
Figure 45 : Evolution de l'activité PPO résiduelle de pomme en présence de 2 µL de mélange (cystéine chauffée 10 mM / HMF 5 mM – réaction pendant 60 min à 0 °C) en fonction de la température (90 – 120 °C) et du temps de chauffage (0 – 360 min) des solutions de cystéine 137
Figure 46 : Graphique de Pareto représentant les effets standardisés des concentrations des réactants sur l'activité PPO résiduelle d'aubergine en présence de 10 µL de mélange de cystéine chauffée (115 °C – 200 min) et de HMF ayant réagi pendant 60 min à 0 °C. 140
Figure 47 : Effet du pH initial de la cystéine chauffée (115 °C – 200 min) sur la formation de composés inhibiteurs de l'activité PPO d'aubergine après mélange avec le HMF..... 141
Figure 48 : Effet des conditions de stockage du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,5mM}$ sur la stabilité de son pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité PPO d'aubergine au cours du temps 142

Figure 49 : Effet du pH sur la stabilité du pouvoir inhibiteur du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,5\ mM}$ au cours du temps de stockage (3 – 48 h) 144
Figure 50 : Effet d'ajouts de concentrations croissantes de différents inhibiteurs de l'activité PPO de pomme 146
Figure 51: Profil d'élution sur une colonne SPE C18 des réactifs et du pouvoir inhibiteur issus d'un mélange (50 mM) cystéine chauffée / HMF élué par des mélanges eau / méthanol (0 / 100 à 100 / 0 par palier de 20 %) 147
Figure 52 : Distribution du PI de l'activité PPO de pomme lors d'un fractionnement en phase inverse (colonne SPE C18) de différents mélanges (50 mM) : cystéine chauffée / HMF ; sulfure d'ammonium / HMF ; sulfure d'ammonium / furfural 150
Figure 53 : Spectre de transmittance infrarouge de la fraction inhibitrice $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ 151
Figure 54 : Spectre d'absorbance UV-VIS de la fraction inhibitrice 100 % méthanolique $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ 151
Figure 55 : Chromatogrammes à 350 nm des fractions 100 % méthanoliques inhibitrices issues du fractionnement sur colonne SPE C18 de mélanges de sulfure d'ammonium / HMF ($F3_{AS\text{-}HMF}$; —) et de sulfure d'ammonium / furfural ($F4_{AS\text{-}FF}$; - - -) sur une colonne HPLC C18 (Y.M.C ODS-AQ AIT. ; 5 µm, 250 mm × 4.6 mm) en élution isocratique (0,8 $mL.min^{-1}$) avec comme phase mobile : eau / acn – 70 / 30 pour $F3_{AS\text{-}HMF}$ et 60 / 40 pour $F4_{AS\text{-}FF}$ 152
Figure 56 : Pouvoir inhibiteur (PI) des fractions collectées en sortie du système HPLC-DAD après injection de 50 µL de $F3_{AS\text{-}HMF}$ et $F4_{AS\text{-}FF}$ élués (d = 0,8 $mL.min^{-1}$) isocratiquement par un mélange eau / acn 70 / 30 et 60 / 40 respectivement. 153
Figure 57 : Spectre d'absorbance UV-VIS des pics présents dans les fractions $F3_{AS\text{-}HMF}$ (—), $F4_{AS\text{-}FF}$ (- - -) et $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ (—) et du PRM C (xxx) 154
Figure 58 : Relation entre le PI, l'absorbance à 350 nm et la concentration du mélange $cys_{\Delta\text{-}HMF}$ lyophilisé repris dans le méthanol (■) ou dans l'eau (●) 155
Figure 59 : Chromatogramme CPG-FID de la fraction SPE $F3_{AS\text{-}HMF}$ 156
Figure 60 : Chromatogramme à 350 nm (A), fragments m/z présents à tr = 15,6 min (B), chromatogramme de l'abondance du fragment précurseur m/z = 143 (C), fragmentation du fragment précurseur (D) 158
Figure 61 : Structures du 5-(hydroxyméthylfuran)-2-carbothialdéhyde (A) et du 4-mercapto-5-méthyl-2-furaldéhyde (B) 160
Figure 62 : Evolution au cours du temps de stockage à deux températures (- 20 et + 20 °C) de l'activité PPO résiduelle de pomme (% du témoin, avec 1 µL en cuve) et de l'aire du pic à 350 nm

de lyophilisats de PRM C (A) et de $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,\ 5\ mM}$ (B) aliquotés et repris extemporanément dans un volume équivalent de méthanol..... 161
Figure 63 : Inhibition de l'activité PPO d'aubergine par un mélange cystéine chauffée (115 °C - 200 min) / HMF à différentes concentrations : 0,07 (■) ; 0,7 (●) et 1,1 (▲) µM en cuve, en faisant varier la concentration en 4-MC (pH 4,5)..... 164
Figure 64 : Effet de la cystéine chauffée (115 °C – 200 min ; 20 mM ; □), du PRM (glucose-cystéine : 1 / 0,25 M – pH 2 – 115 °C ; 200 min ; ●), de mélanges (20 mM) cystéine chauffée / HMF (x) ou cystéine chauffée / furfural (▲), du furfural et du HMF (20 mM ; ○) sur l'activité PPO de pomme de terre (90 / 10 v/v) au cours du temps d'incubation à 0 °C..... 166
Figure 65 : Réversibilité de l'inhibition de l'activité PPO de pomme de terre après dialyse des incubats (3 h à 0 °C) constitués de 90 % de PPO et 10 % de PRM, de cystéine chauffée, du mélange cystéine chauffée - HMF, ou du mélange cystéine chauffée – furfural..... 167
Figure 66 : Gel d'électrophorèse (polyacrylamide 8-25 %) d'échantillons traités en condition non dénaturante (Native Page) – révélation par le nitrate d'argent 168
Figure 67 : Temps d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique en présence d'AAPH° et des différents composés antioxydants testés en fonction de leurs concentrations 170
Figure 68 : Pourcentage de DPPH° résiduel au temps final (t_f - plateau) en fonction de la concentration en différents composés antioxydants testés..... 170
Figure 69 : Effet chélatant vis-à-vis du $CuSO_4$ (50 µM) en présence de TMM (1 mM) du PRM C comparé aux effets de la cysteine (non chauffée ou chauffée 115 °C – 200 min), du HMF, du mélange cystéine chauffée - HMF et de fractions de ce mélange. 172
Figure 70 : Réaction d'oxydation de la cystéine en cystine en présence de peroxyde d'hydrogène (d'après Luo *et al.*, 2005)..... 179
Figure 71 : Effet de différents additifs sur l'évolution de la luminance (ΔL^* - 1) et de l'écart sur l'axe vert→rouge (Δa^* - 2) de broyats de pomme de terre (A – additifs à 1 mM) et de pomme (B – additifs à 2 mM)..... 182
Figures 72 : Effet de différents additifs sur l'évolution de la luminance (ΔL^* - 1) et de l'écart sur l'axe vert→rouge (Δa^* - 2) de broyats de pomme (A – additifs à 1 $g.L^{-1}$) et de pomme de terre (B – additifs à 0,5 $g.L^{-1}$). 184
Figure 73 : Evolution du PI de PRM à base de glucose (0,25 M) vis-à-vis de la LOX de fève (2,5 nkat) en fonction de l'acide aminé (0,25 M) et du temps de chauffage à 103 °C 189
Figure 74 : Evolution du PI de PRM à base de glucose (0,25 M) vis-à-vis de la LOX de soja (2,5 nkat) en fonction de l'acide aminé (0,25 M) et du temps de chauffage à 103 °C 190

Figure 75 : Graphique des interactions temps de chauffage x nature du sucre réducteur sur le PI vis-à-vis de la LOX de farine de fève lors du chauffage de systèmes modèles à base de lysine et d'arginine à 103 °C 191
Figure 76 : Effet de la concentration en glucose sur le PI de PRM (103 °C - 14 h) à base de lysine ... 192
Figure 77 : Graphiques de Pareto standardisés représentant les effets des variables du plan d'expériences sur l'absorbance à 350 (A), 420 (B) et 450 nm (C) 193
Figure 78 : Graphiques de Pareto standardisés représentant les effets standardisés des variables du plan d'expériences sur le pH final des PRM 194
Figure 79 : Graphique de Pareto standardisé pour l'activité résiduelle de LOX de fève (%) en fonction du pHi, de la durée de chauffage (h) et de la concentration (M) en lysine et en glucose. 195
Figure 80 : Représentation graphique en surface de réponse de l'activité résiduelle de LOX de farine de fève (%) estimée d'après le modèle en fonction de la concentration en lysine et en glucose (M) lorsque le pH est fixé à 10,0 et la durée de chauffage à 18,5 h 196
Figure 81 : Graphique de Pareto standardisé pour l'activité résiduelle de LOX de fève (%) en fonction de la température et de la durée de chauffage (h) 199
Figure 82 : Absence d'effet significatif ($p < 0,05$) de la nature du sucre réducteur sur le PI des PRM_{opt2} (20 µL) vis-à-vis de la LOX de farine de fève (2,8 nkat) 201
Figure 83 : Activité résiduelle de la LOX de fève (%) en fonction de différents volumes de PRM_{opt2} incorporé dans le milieu réactionnel 202
Figure 84 : Cinétique d'inhibition de la LOX de fève par le PRM_{opt2} 203
Figure 85 : Effet du temps d'incubation à 0 °C de la LOX de fève avec le PRM_{opt2}, et de la lysine (0,08 M) chauffée seule (15 h à 120 °C) sur l'activité résiduelle de LOX de fève 205
Figure 86 : Détermination des constantes d'inactivation de l'activité de LOX de fève par le PRM_{opt2} - Effet de la concentration du PRM_{opt2}. 206
Figure 87 : Effet de la dialyse à 4 °C sur la LOX de fève partiellement inactivée par le PRM_{opt2} 207
Figure 88 : Stabilité du pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité LOX de fève du PRM_{opt2} stocké 99 jours à – 20, 4 et 25 °C 208

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Vue d'ensemble de quelques classes de composés aromatiques issus de la réaction de Maillard (van Boekel, 2006). 21
Tableau 2 : Effets antioxydants (Mesures polarographiques – colonne A) de PRM issus de différentes combinaisons acide aminé / ose réducteur et leur influence sur la formation de composés volatils et des dienes conjugués (Mesures chromatographiques – colonnes B) issus de l'acide linoléique après 25 h (Adapté de Lingnert et Eriksson, 1980). 23
Tableau 3 : Mutagénicité des PRM issus de systèmes modèles acide aminé – glucose chauffés (adapté de Spingarn *et al.*, 1983). 30
Tableau 4 : Substrats phénoliques de PPO de différentes origines végétales 43
Tableau 5 : Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily *et al.*, 1992) 47
Tableau 6 : Quantités maximales de sulfites autorisées dans les aliments à base de fruits et de légumes (Dehove *et al.*, 1998) 50
Tableau 7 : Variables indépendantes et leurs valeurs codées utilisées pour déterminer les rapports des concentrations en réactants (cystéine chauffée et HMF) 74
Tableau 8 : Variables réelles et codées pour le premier plan d'expériences pour l'optimisation de l'inhibition de la LOX de fève par les PRM 76
Tableau 9 : Domaine du plan expérimental (valeurs codées et réelles) utilisé pour l'optimisation du traitement thermique afin d'inhiber l'activité LOX de fève 77
Tableau 10 : Conditions éléctrophorétiques de séparation des protéines en conditions non dénaturantes (natives). Le système est thermostaté à 15 °C 83
Tableau 11 : Méthode de coloration par le nitrate d'argent 83
Tableau 12 : Génotypes des souches de Salmonelles utilisées dans le test d'Ames (TA98, TA102) .. 104
Tableau 13 : Echantillons et conditions du test d'Ames 106
Tableau 14 : Rendement et taux de purification de l'activité PPO de pomme de terre 114
Tableau 15 : Valeurs des constantes cinétiques (V_m et K_m) apparentes et efficacité de différents composés phénoliques vis-à-vis de la PPO de pomme de terre (fraction purifiée) 119
Tableau 16 : Valeurs des constantes d'inhibition des acides carboxyliques et du 4-hexylresorciniol sur la PPO de pomme de terre à pH 4,5 120

Tableau 17 : Taux de purification et rendement l'extraction de LOX de farine de fève 121
Tableau 18 : Pouvoir inhibiteur (PI) des différents PRM utilisés sur des PPO de différentes sources végétales en présence de 1 µL de PRM 125
Tableau 19 : Concentrations en glucose résiduel (M) des différents PRM et des solutions de glucose chauffées dans les mêmes conditions (pH et barèmes de chauffage) 127
Tableau 20 : Concentrations en réactif thiol (glutathion dans le PRM A / cystéine dans les PRM B et C) comparées à celles des solutions de réactifs thiols chauffés seuls dans les mêmes conditions 127
Tableau 21 : Concentrations en HMF (mM) dans les PRM comparées à celles des solutions de glucose chauffé seul dans les mêmes conditions 128
Tableau 22 : Comparaison des activités PPO résiduelles de pomme de terre en présence de 1 µL de différentes solutions ajustées à pH 3 non chauffées ou chauffées (103 °C, 14 h) 130
Tableau 23 : Inhibition de la PPO de pomme par différents composés carbonylés (4 mM) mélangés à une solution de cystéine chauffée (115 °C – 200 min - 10 mM) Partie A – et par mélanges HMF (4 mM) / dérivés chauffés (115 °C pendant 200 min) de la cystéine (10 mM) Partie B ; après 180 min de réaction à 0 °C entre les solutions de réactants. 10 µL de mélange sont ajoutés en cuve avant l'addition de l'extrait enzymatique 134
Tableau 24 : Valeurs des constantes « k », des activités PPO résiduelle finales calculées et du taux d'ajustement du modèle du premier ordre 138
Tableau 25 : Valeurs réelles et codées du plan d'expériences à deux variables (concentrations en HMF et en cystéine chauffée) et cinq niveaux 139
Tableau 26 : Comparaison du pouvoir inhibiteur du PRM C [A] et du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,5\ mM}$ vis-à-vis de l'activité PPO (9 nkat) de pomme, d'aubergine, de champignon et de pomme de terre. . 145
Tableau 27 : Rendement de purification sur colonne SPE C18 du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,50\ mM}$ ayant réagi 2 h à 0 °C 148
Tableau 28 : Effets de la lyophilisation du PRM C et du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,\ 5\ mM}$ et de la nature du solvant de reprise des lyophilisats sur l'activité PPO résiduelle de pomme (1 µL en cuve) et l'aire du pic (350 nm) 160
Tableau 29 : Temps d'inhibition (test AAPH°) et CE 50 (test DPPH°) des différents composés antioxydants testés 169
Tableau 30 : Nombres de colonies his^+-révertantes (moyenne ± écart-type) avec les souches TA 98 et TA 102, en absence ($S9^-$) et en présence ($S9^+$) d'activateur métabolique 175
Tableau 31 : Nombres de colonies his^+-révertantes (moyenne ± écart-type) avec la souche TA 102 en présence H_2O_2, en absence ($S9^-$) et en présence ($S9^+$) d'activateur métabolique 177

Tableau 32 : Tests des étendues multiples pour le PI vis-à-vis de la LOX de farine de fève (2,5 nkat) par acides aminés (A) et temps de chauffage (B)..... 188
Tableau 33 : Analyse de la variance du PI de PRM glucose ou fructose / arginine ou lysine (10 µL) vis-à-vis de l'activité LOX de fève (2,5 nkat) en fonction du sucre réducteur, de l'acide aminé et du temps de chauffage à 103 °C 191
Tableau 34 : Comparaison de l'efficacité de PRM dilués sur l'activité LOX de fève..... 196
Tableau 35 : Effets estimés des variables sur les valeurs d'absorbance (294, 320, 350 et 420 nm) – Couple temps*température entraînant une absorbance maximale à ces longueurs d'onde 198
Tableau 36 : Validation du modèle par comparaison des valeurs d'activités résiduelles de LOX de fève calculées et réelles..... 199
Tableau 37 : Comparaison de l'activité résiduelle de LOX de farine de fève purifiée en présence du PRM_{opt1} et du PRM_{opt2} 200

LISTE DES EQUATIONS

Équation 1 : Modèle à effet quadratique utilisant une régression polynomiale d'ordre 2 utilisé pour les plans d'expériences à quatre facteurs 76
Équation 2 : Expression du pouvoir inhibiteur 78
Équation 3 : Expression du Kav des protéines 82
Équation 4 : Expression du logarithme du poids moléculaire en fonction du K_{av} : 82
Équation 5 : Expression du % de DPPH° résiduel en fin de cinétique 98
Équation 6 : Constante de dissociation (Kd) du complexe TMM-Cu 101
Équation 7 : Loi de Beer-Lambert pour le TMM libre et le TMM complexé 101
Équation 8 : Expressions de l'absorbance à 530 et 480 nm en fonction de la teneur en TMM libre et complexé d'après la loi de Beer-Lambert 101
Équations 9 : Concentrations en TMM libre et complexé 102
Équation 10 : Modèle du premier ordre pour l'activité PPO résiduelle en présence de mélange cystéine chauffée / HMF, en fonction du temps de chauffage de la cystéine 137
Équation 11 : Expression de la pente de la droite Ln (k) = f (1/T) en fonction de l'énergie d'activation 138
Équation 12 : Modèle de régression du second degré de l'activité résiduelle de LOX de fève en fonction du pH initial (pHi), de la concentration (M) en lysine et en glucose et de la durée de chauffage (t en h) 195
Équation 13 : Modèle de régression du second degré de l'activité résiduelle de LOX de fève en fonction de la température (T en °C) et de la durée de chauffage (t, en h) 199

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Les résultats obtenus lors de mes travaux de thèse et de DEA au laboratoire de biochimie industrielle et agro-alimentaire ont été présentés lors de congrès européens et internationaux et ont fait l'objet de publications dont la liste est dressée ci-après. Les résumés des articles publiés sont présentés à la fin de ce document.

Participations à des congrès

9 th international symposium on the Maillard reaction – 1-5 September 2007, Munich - Germany
Comparison of antioxidant effects between Maillard reaction products from cysteine/glucose model system and neoformed products from thiol derivatives and 5-hydroxymethylfurfural
(Cheriot S., Billaud C., Wagner K.-H., Nicolas, J.) – Présentation affichée.

Synthetic and natural compounds in cancer therapy – March 2007, Bratislava – Slovakia
Maillard reaction products used as "natural antibrowning" agents and their mutagenic and oxidative effects in the Ames test.
(Koschutnig K., Reichhold S., Cheriot S., Wagner K.-H., Billaud C., Nicolas, J.) – Présentation affichée.

COST 927 - IMARS Action workshop – May 2006, Napoli - Italy
Antioxidant effect of neoformed products from heated cysteine and aldehydes on polyphenoloxidase activity from different vegetal sources.
(Cheriot S., Billaud C., Nicolas J.) – Communication orale.

European Symposium on apple processing – March 2005, Rennes - France
Maillard reaction products: a possible alternative to sulphites use in the prevention of enzymatic browning in raw and minimally processed apples?
(Billaud C., Chériot S., Maraschin C., Peyrat-Maillard M-N. and Nicolas J.) – Présentation affichée.

Publications

S. CHERIOT, C. BILLAUD, S. POCHTRAGER, K.-H. WAGNER J. NICOLAS (2008)
A comparative study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine-glucose derived Maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural. ***Proposé à publication dans Food Chemistry le 31 octobre 2007***

K.-H. WAGNER, S. REICHHOLD, K. KOSCHUTNIG, S. CHERIOT, C. BILLAUD. (2007).
The potential antimutagenic and antioxidant effects of Maillard reaction products used as natural antibrowning agents. Molecular Nutrition and Food Research, 51, 496-504

S. CHERIOT, C. BILLAUD, M.-N. MAILLARD, J. NICOLAS (2007)
Inhibition of polyphenoloxidase activity by mixtures of heated cysteine derivatives with carbonyl compounds. Molecular Nutrition and Food Research, 51, 395-403

S. CHERIOT, C. BILLAUD, J. NICOLAS (2006).
Use of experimental design methodology to prepare Maillard reaction products from glucose and cysteine inhibitors of polyphenol oxidase from eggplant (*Solanum melongena*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54; 5120-5126

C. BILLAUD, C. MARASCHIN, Y-N. CHOW, S. CHERIOT, M-N. MAILLARD, J. NICOLAS. (2005).
Maillard reaction products as « natural antibrowning » agents in fruits and vegetables technology. Molecular Nutrition and Food Research, 49, 656-662.

C. GERIN, J. MARION, P. MORAS, S. CHERIOT, C. BILLAUD, J. NICOLAS (2005).
Le brunissement enzymatique des végétaux découpés : étude sur l'aubergine. 2ème partie : approche technologique. Revue CTIFL, Mai 2005, 211, 43-47

S. CHERIOT, C. GERIN, C. BILLAUD, J. NICOLAS, P. MORAS (2005).
Le brunissement enzymatique des végétaux découpés : étude sur l'aubergine. 1ère partie : approche biochimique. Revue CTIFL, Avril 2005, 210, 35-39.

LISTE DES ABREVIATIONS

4-MC	4-méthylcatéchol
AAPH°	2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochlorure
acn	acétonitrile
ala	L-alanine
APCI	"*atmospheric pressure chemical ionization*" / ionisation chimique à pression atmosphérique
APMT	aromatisant produit par la méthode thermique
Ar	activité enzymatique (PPO ou LOX) résiduelle en présence d'inhibiteur (% du témoin sans inhibiteur)
arg	L-arginine
AS	sulfure d'ammonium
AT	arôme de transformation
BHA	di-tertio-butylhydroxyanisol
BHT	di-tertio-butyl-hydroxytoluène
C_{10-70}	culot obtenu après double précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (10 puis 70 % de saturation)
C_{50}	culot obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium (50 % de saturation)
C_{50d}	culot obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium (50 % de saturation) puis dialysé
CE 50	concentration (mM) nécessaire pour faire disparaître 50 % de DPPH° initial
HPLC	chromatographie liquide haute performance
CIE	commission internationale de l'éclairage
COST	coopération scientifique et technique
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
cys	L-cystéine
DAD	"*diode array detector*" / détecteur à barette de diodes
DDL	détecteur à diffusion de lumière
ddl	degré de liberté

DEC	détecteur électrochimique
DJA	Dose journalière admissible
DPPH°	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
Ea	énergie d'activation
Eq.	équation
EDTA	éthylène-diamine-tétraacétique
$F3_{AS\text{-}HMF}$	fraction SPE n°3 issue de l'élution du mélange sulfure d'ammonium / HMF
$F3_{cys\Delta\text{-}HMF}$	fraction SPE n°3 issue de l'élution du mélange cystéine chauffée (115 °C - 200 min) / HMF
$F4_{AS\text{-}FF}$	fraction SPE n°4 issue de l'élution du mélange sulfure d'ammonium / furfural
FDA	*Food and Drug Administration*
FID	"*flame ionization detector*" / détecteur à ionisation de flamme
FPLC	"*fast protein liquid chromatography*" / chromatographie liquide rapide pour les protéines
gly	L-glycine
GRAS	Generally Recognized As Safe
GSH	glutathion
his	L-histidine
HMF	5-hydroxyméthylfurfural
HMW	"*high molecular weigh*" / haut poids moléculaire
IR	infra-rouge
JECFA	"*Joint Expert Committee on Food Additives*"
k	constante de vitesse de réaction
K_{av}	fraction de diffusion entre une phase solide et une phase liquide
K_d	constante de dissociation (mM)
K_{iapp}	constante d'inhibition apparente (mM)
K_m	constante de Michaelis (mM)
L^*	luminance (paramètre colorimétrique)
LOX	lipoxygénase - peut désigner l'enzyme ou son activité catalytique
lys	L-lysine
$Mel_{AS\text{-}FF}$	mélange sulfure d'ammonium / furfural
$Mel_{AS\text{-}HMF}$	mélange sulfure d'ammonium / HMF
$Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF}$	mélange cystéine chauffée (115 °C - 200 min) / HMF
moy	moyenne

MS	"*mass spectrometry*" / spectrométrie de masse
ONC	"*overnight culture*" / suspension cellulaire utilisée dans les tests d'Ames
PI	pouvoir inhibiteur : $PI = \frac{100}{\text{activité résiduelle (\%)}} - 1$
PM	poids moléculaire
PPO	polyphénoloxydase
PRM	produits de la réaction de Maillard
PRM C	PRM issus du chauffage (115 °C - 200 min) d'un mélange glucose / cystéine (1 / 0,25 M) dont le pH a été ajusté à 2
PRM_{opt1}	PRM issus du chauffage (103 °C - 18,5 h) d'un mélange glucose / lysine (0,70 / 0,85 M) dont le pH a été ajusté à 10,35
PRM_{opt2}	PRM issus du chauffage (120 °C - 15 h) d'un mélange glucose / lysine (0,8 M) à pH ~10
pro	L-proline
PTFE	polytétrafluoroéthylène
PVPP	polyvinylpolypyrrolidone
R	constante universelle des gaz parfaits R = 8,314 472 $J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$
RPE	résonance paramagnétique électronique / ESR : "*electron-spin resonance*"
σ	écart-type
S9	système d'activation métabolique - fraction microsomale d'extrait de foie de rats traités à l'aroclor 1254
S_{10}	surnageant obtenu après précipitation par sulfate d'ammonium (10 % saturation)
SDS	"*sodium dodecyl sulfate*" / dodécylsulfate de sodium
SPE	"*solid phase extraction*" / extraction en phase solide
Tampon A	solution de tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,5
Tampon B	solution de tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5
T_{inh}	temps d'inhibition (min)
TMM	tétraméthylmurexide
TOF	"*time of flight*" / temps de vol
tr	temps de rétention
UV	ultra-violet
VIS	visible

INTRODUCTION

Les réactions d'oxydation observées dans les produits alimentaires, qu'elles soient catalysées ou non par des enzymes, nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles. Par exemple, l'oxydation enzymatique des phénols, catalysée par les polyphénoloxydases (PPO) et autrement appelée « brunissement enzymatique » fait suite à l'altération des fruits ou légumes lors de traitements mécaniques (récolte, manutention lors du transport et du stockage, pelage, découpe) ou technologiques (conservation au froid, congélation-décongélation, irradiation) ou encore naturels (infection fongique). Non seulement ce phénomène entraîne des pertes économiques pour tous les acteurs de cette filière, mais c'est également un frein au développement de fruits et légumes pré-découpés prêts-à-consommer qui pourraient encourager la consommation de fruits et légumes et faciliter l'application du Programme National Nutrition Santé (2001 – 2005). D'autres phénomènes oxydatifs ont également des effets délétères sur la qualité des produits, et notamment l'oxydation des lipides des aliments riches en acides gras polyinsaturés. Ce phénomène est alors responsable de l'apparition de flaveurs désagréables (rancidité), de perte de couleur et une diminution de la teneur en acide gras essentiels. Cette oxydation des lipides peut être catalysée par voie enzymatique. La lipoxygénase est, par exemple, responsable de l'apparition de flaveurs désagréables lors du maltage et du stockage de la bière.

Actuellement, en plus des procédés technologiques traditionnels (décoloration, congélation, emballage offrant une protection vis-à-vis de la lumière) ou innovant (champ électrique pulsé, emballage sous atmosphère contrôlée), des antioxydants synthétiques sont utilisés pour prévenir ces altérations : les sulfites dans le cas du brunissement enzymatique, le BHA ou le BHT (composés phénoliques ; BHA : di-tertio-butylhydroxyanisol ; BHT : di-tertio-butyl-hydroxytoluène) dans le cas de l'oxydation lipidique. Cependant, bien que ces additifs soient efficaces, leur innocuité est remise en cause par les autorités sanitaires (**Madhavi et Salukhe, 1996**). Par ailleurs, ils ne répondent pas à la demande actuelle des consommateurs qui se tournent de plus en plus vers une alimentation naturelle dépourvue d'additifs synthétiques. Des additifs naturels tels que la vitamine C, l'acide citrique contre le brunissement enzymatique ou des tocophérols contre l'oxydation des lipides peuvent également être mis en œuvre mais les quantités à utiliser pour prévenir efficacement ces phénomènes d'oxydation et le coût de ces

composés en font des traitements onéreux pour des produits à faible valeur ajoutée. C'est pourquoi, de nombreuses recherches actuelles visent à découvrir ou inventer des moyens de prévention de ces oxydations, qui seraient efficaces, faciles à mettre en œuvre, nécessitant peu d'investissement et peu chers à l'utilisation tout en étant dépourvus d'effets préjudiciables sur les propriétés organoleptiques des produits alimentaires et sains.

Récemment, le laboratoire de biochimie industrielle et agro-alimentaire du Cnam a montré que les produits de la réaction de Maillard (PRM) à base de composés thiolés (cystéine et glutathion) sont efficaces pour inhiber l'activité polyphénoloxydase (**Billaud *et al.*, 2003 ; Roux *et al.*, 2003 ; Billaud *et al.*, 2004 ; Brun-Mérimée *et al.*, 2004**). La réaction de Maillard est un ensemble complexe de réactions se produisant lors du chauffage et initiée par l'addition d'une fonction amine sur une fonction carbonyle. Cet ensemble de réactions, appelé encore « brunissement non-enzymatique », conduit à la formation d'une multitude de composés aux propriétés aromatiques et colorantes. Ce phénomène, influencé par la teneur en eau, le pH, la concentration des réactifs, la température et le temps de chauffage peut avoir des effets néfastes comme par exemple le brunissement et la perte des qualités nutritionnelles des laits infantiles au cours de leur stockage (**Henry *et al.*, 1946**). Cette réaction peut également être recherchée dans le cadre de la formation de composés aromatiques et colorés au cours de la cuisson des aliments ou lors des procédés de transformation comme lors de la torréfaction des grains de café. D'autres effets bénéfiques des produits de la réaction de Maillard résident aussi dans leurs propriétés antioxydantes mises en évidence dès les années 1980 (**Lingnert et Eriksson, 1980 ; Lingnert et Waller, 1983 ; Kahn, 1985**) et encore actuellement à l'étude (**Maillard *et al.*, 2007**).

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette volonté de trouver des composés antioxydants pouvant être spontanément formés au cours du traitement thermique des aliments, en vue du remplacement des additifs synthétiques utilisés actuellement. Le travail envisagé se propose d'atteindre ces objectifs :

- la purification et la caractérisation des systèmes enzymatiques catalysant les processus oxydatifs des lipides et des phénols
- la détermination des conditions optimales de synthèse des produits de la réaction de Maillard inhibiteurs des systèmes enzymatiques étudiés
- le fractionnement et la détermination des familles de PRM actives (pouvoir inhibiteur vis à vis de la polyphénoloxydase et de la lipoxygénase),
- l'étude des mécanismes et du mode d'action des familles de PRM
- l'application technologique dans la lutte contre le brunissement enzymatique de préparations de fruits et légumes faiblement transformés (tranches, broyats et jus).

Dans une première partie bibliographique, après une synthèse sur la réaction de Maillard, les oxydations enzymatiques des phénols et celle des lipides sont présentées. Cette première partie s'attache à passer en revue les propriétés des PRM, l'intérêt de leur éventuelle utilisation pour prévenir les problèmes d'oxydation rencontrés dans l'industrie agro-alimentaire restant, à l'heure actuelle encore à prouver.

Après les matériels et méthodes objet de la deuxième partie, l'exposé des résultats débute par la caractérisation des enzymes (polyphénoloxydase et lipoxygénase). Il se poursuit par la détermination de conditions physico-chimiques optimales de la réaction de Maillard pour inhiber le brunissement enzymatique. Les produits de la réaction de Maillard (PRM) ainsi que leurs propriétés inhibitrices sont caractérisés. Le système modèle ayant le plus fort pouvoir inhibiteur est progressivement simplifié afin de faciliter son analyse. Par la suite, tout en tentant d'élucider le mécanisme d'inhibition de ces produits, leur pouvoir antioxydant et mutagène est évalué. Par ailleurs, l'efficacité des différents systèmes modèles est testée dans des conditions proches des applications technologiques de transformation des fruits et légumes. La troisième partie des résultats porte sur l'analyse de l'inhibition de l'oxydation enzymatique des lipides par les produits de la réaction de Maillard. Celle-ci est menée avec un plan comparable au précédent : détermination des conditions de formation des produits de la réaction de Maillard entraînant le plus fort pouvoir inhibiteur, puis études des cinétiques et mécanismes d'inhibition.

Pour terminer, un bilan des résultats issus des différentes études menées au cours de cette thèse et les perspectives amenées par ce travail sont présentés.

TRAVAUX ANTERIEURS

1. LA REACTION DE MAILLARD

La réaction de Maillard se manifeste dès lors que des sucres réducteurs (fonction carbonyle libre) sont en présence de protéines, peptides ou acides aminés (fonction amine libre), et d'autant plus facilement à température élevée, basse activité de l'eau et sur des temps longs. Cette réaction a pour conséquences :

- l'apparition de pigments bruns, appelés mélanoïdines qui contiennent des taux variables d'azote et ont des masses moléculaires et des propriétés de solubilités dans l'eau variables. La structure de ces composés bruns est peu connue,
- la formation de composés volatils qui sont souvent des composés d'arômes. La réaction de Maillard a un impact fort sur la formation des arômes agréables lors de la cuisson, du rôtissage ou de la friture des aliments, mais peut également altérer la flaveur des aliments au cours de leur conservation (lait, bière…),
- la génération de composés très réactifs (réductones) qui peuvent participer à la stabilisation des aliments contre les oxydations,
- la perte en acides aminés essentiels (lysine, arginine, méthionine) et en vitamines C et K,
- la formation de composés potentiellement mutagènes ou anti-mutagènes,
- l'apparition de molécules susceptibles de modifier la structure des protéines conduisant à une altération de leurs propriétés biologiques.

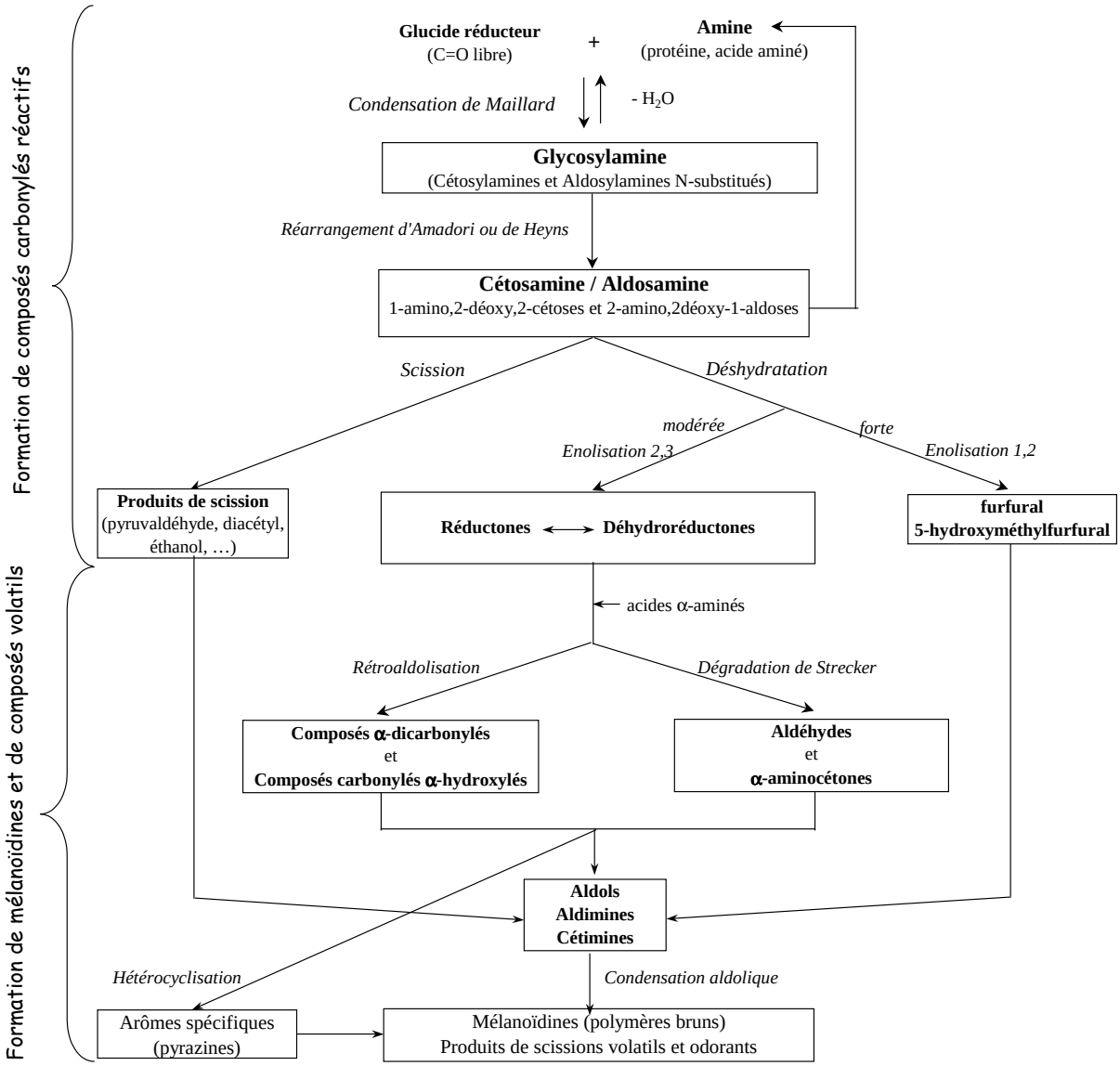


Figure 1 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard (adapté de Hodge, 1953)

1.1. Découverte et redécouverte de la réaction de Maillard

C'est en travaillant sur la synthèse des protéines que Louis Camille Maillard fut amené à chauffer des acides aminés libres avec du glycérol puis à travailler sur les interactions entre les acides aminés et d'autres poly-alcools possédant une fonction carbonyle (**Maillard, 1912**). Il fournit des détails, confirmés par la suite, sur les mécanismes réactionnels (décarboxylation de l'acide aminé, formation de doubles liaisons et peut-être de cycles par déshydratation des sucres), la formation de pigments bruns (substances polycycliques pouvant contenir de l'azote), le degré de réactivité des sucres et des acides aminés (les pentoses sont plus réactifs

que les hexoses, les monosaccharides plus que les disaccharides ; l'alanine est plus réactive que les autres acides aminés). Il émit également l'hypothèse que ces réactions puissent avoir lieu à 37 °C. Ce n'est que beaucoup plus tard que la réaction de Maillard fut évoquée dans des applications alimentaires (**Weast et Mackinney, 1941 ; Patron, 1950)** et plus spécialement dans les produits laitiers (**Greaves *et al.*, 1938 ; Doob *et al.*, 1942 ; Henry *et al.*, 1946**)

Hodge (1953) propose dans une revue sur les réactions de brunissement non enzymatiques un schéma des voies réactionnelles impliquées dans la réaction de Maillard. Depuis, de nombreux chimistes, aromaticiens, technologues, physiologistes, toxicologues mènent des recherches sur cet ensemble complexe de réactions pour en déterminer les voies de synthèses et les structures des multiples produits de la réaction de Maillard (PRM) en fonction des conditions de réaction, des propriétés antioxydantes, des effets sur les organismes, de leurs voies métaboliques etc.

1.2. Chimie de la réaction de Maillard

Le schéma de la réaction de Maillard (**figure 1**) proposé par **Hodge** (**1953**) reste encore très utilisé. Cependant, compte tenu de la complexité des réactions, certains auteurs (**Yaylayan, 1997 ; Jousse *et al.*, 2002**) ont développé une approche conceptuelle de la réaction où les PRM sont formés en groupes pouvant interagir comme le présente la **figure 2.** Dans cette représentation, les auteurs ont souhaité mettre en évidence les groupes interessants de produits issus de la réaction de Maillard et leurs interactions.

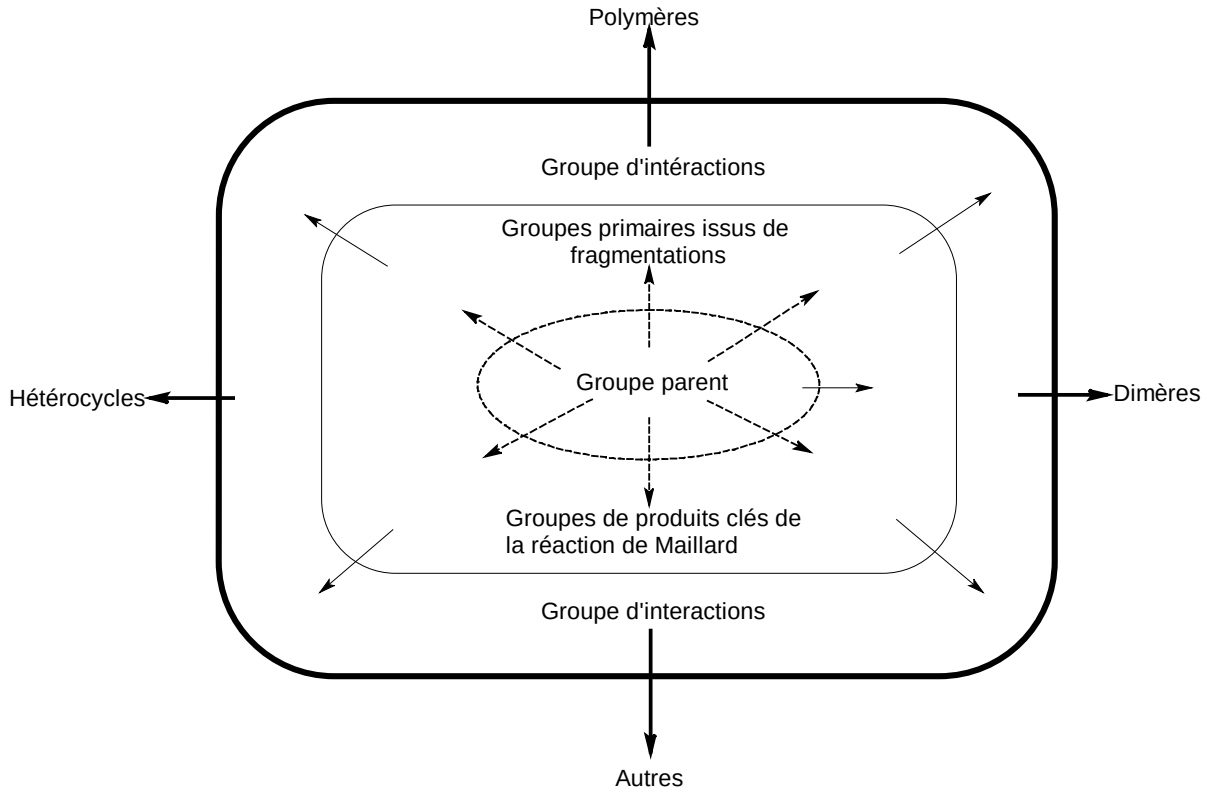


Figure 2 : Représentation conceptuelle de la réaction de Maillard : formation et interaction des « groupes » chimiques (adapté de Yaylayan, 1997)

1.2.1. Les étapes de la réaction de Maillard

La condensation de Maillard

La première réaction du processus correspond principalement à l'addition nucléophile d'une fonction amine libre (ex : acide aminé, protéine, peptide) sur la fonction carbonylée d'un glucide réducteur (ou autre composé à fonction carbonyle libre) (**figure 3**). La base de Schiff, s'isomérise rapidement en glycosylamine N-substituée (aldosylamine ou cétosylamine) ou peut également aboutir à la formation d'un oxoacide et d'une osamine non réductrice par transamination. Les glycosylamines issues d'amines et de protéines sont relativement stables, tandis que celles issues d'acides aminés subissent rapidement un réarrangement dit d'Amadori. La formation de glycosylamine est réversible : le glucide réducteur et l'acide aminé peuvent être régénérés intégralement en milieu acide par exemple.

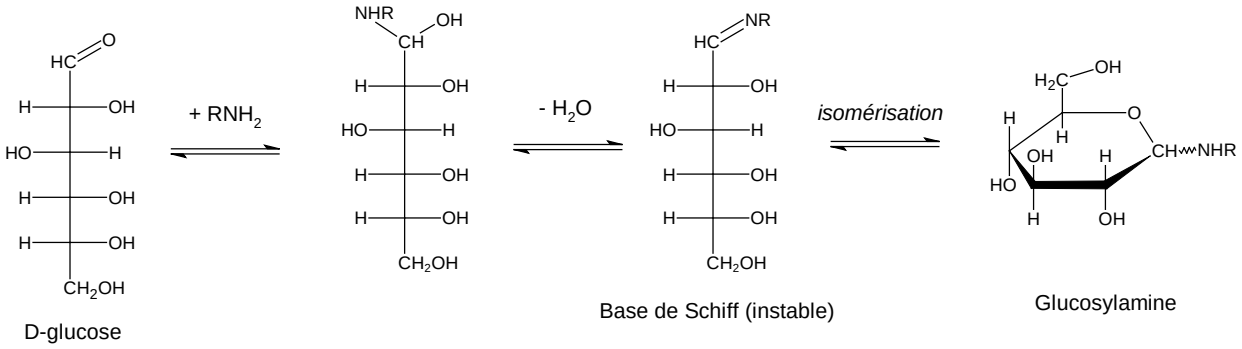


Figure 3 : Addition nucléophile d'une fonction amine sur la fonction carbonyle d'un sucre réducteur (D-glucose) lors de la première étape de la réaction de Maillard

Le réarrangement d'Amadori

Les aldosylamines formés précédemment donnent en milieu acide, des cétosamines en équilibre céto-énolique : c'est le réarrangement d'Amadori (**figure 4**). Les cétosylamines donnent quant à elles des aldosamines par le réarrangement de Heyns. Ces réactions sont catalysées par la fonction carbonyle des acides aminés et produisent des molécules spécifiques de la réaction de Maillard (**Chuyen *et al.*, 1998**). On note par ailleurs que l'acidité du milieu n'est pas modifiée par ce réarrangement.

L'analyse de PRM issus de systèmes modèles à partir d'aldose d'une part et de cétose d'autre part, a montré l'existence de composés communs. Les phénomènes évoqués sont la transformation de cétose (fructose) en aldose (glucose) (**Shibamoto et Bernhard, 1977**), et des interconversions entre les composés de Heyns et d'Amadori (**Nishibori et Kawakishi, 1994**).

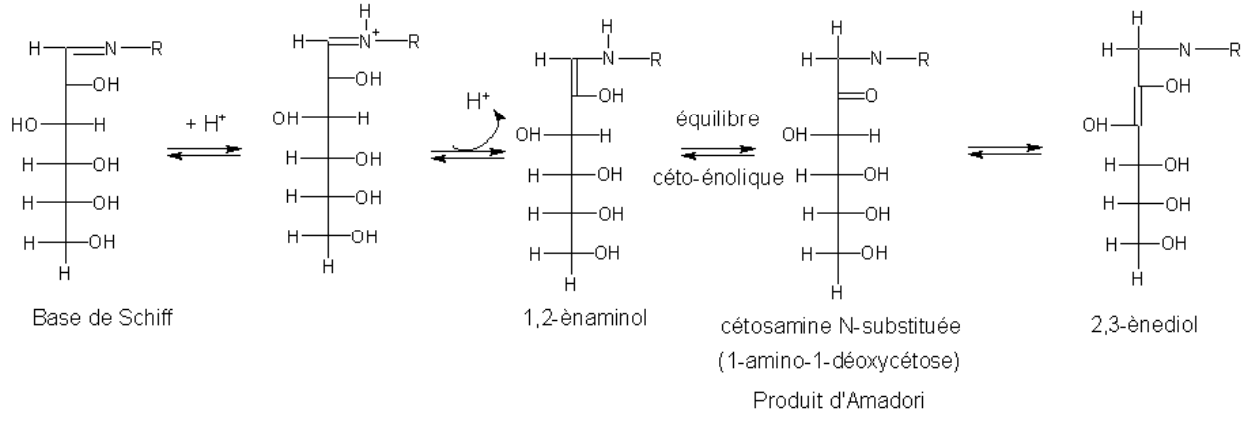


Figure 4 : Schéma de la formation du composé d'Amadori dans la réaction de Maillard entre le glucose et un composé aminé (d'après Chuyen *et al.*, 1998)

Les réactions de déshydratation

Les réactions de déshydratation se déroulent plus ou moins simultanément et engendrent des molécules réductrices :

- furfural et ses dérivés en cas de déshydratation forte,
- réductones, ayant une structure dicétonique (R-CO-CO-R') lors de déshydratation modérée. Ces molécules déclenchent un mécanisme propre à la réaction de Maillard, nécessitant des acides aminés intacts : la dégradation de Strecker.

Déshydratation forte

Lors du chauffage en milieu acide, par énolisation 1,2 et libération de l'acide aminé, il y a formation de 3-déoxyosone puis de composés α-dicarbonylés insaturés (**figure 5**). Ainsi les cétosamines, par chauffage poussé en milieu acide, peuvent générer des substances de type furaldéhyde ou déshydrofuraldéhyde, en particulier le 5-hydroxyméthylfurfural qui absorbe dans l'UV à 285 nm (**Ames *et al.*, 1999**)

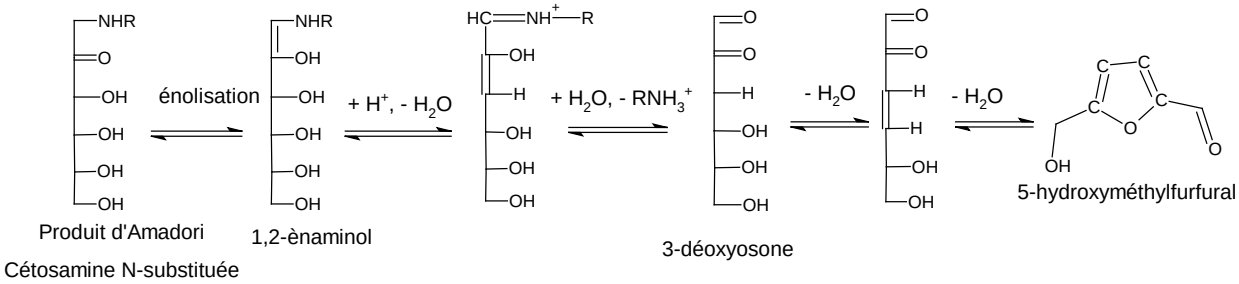


Figure 5 : Schéma de la réaction de déshydratation forte conduisant à la formation de composés α–dicarbonylés.

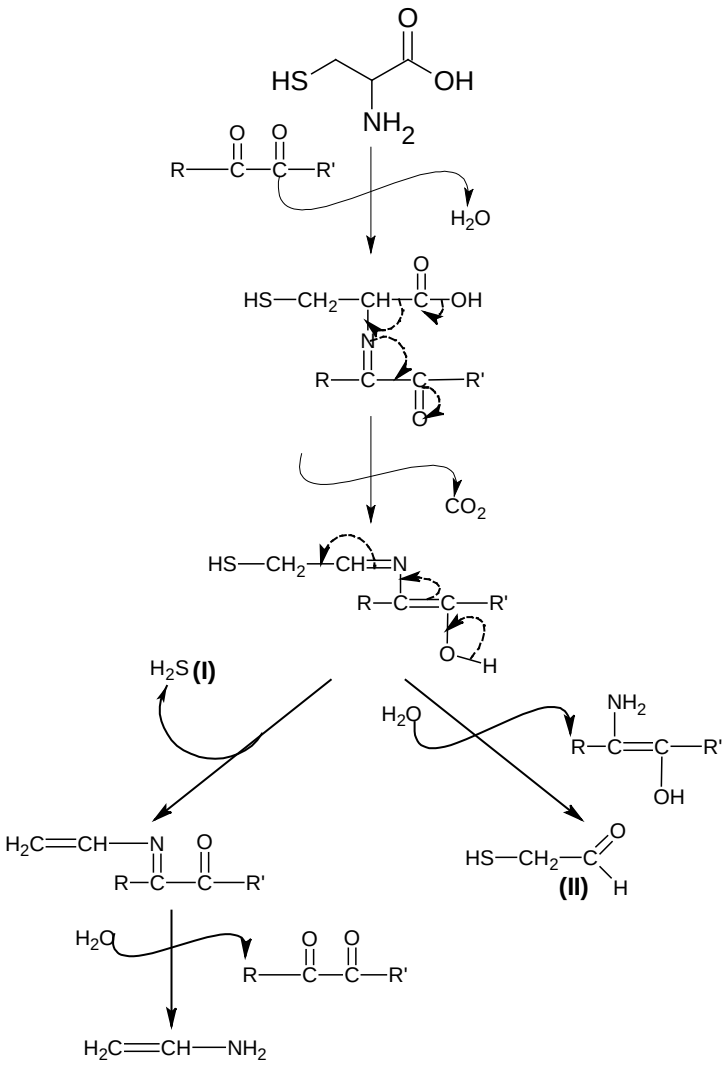
Déshydratation modérée

Lors de cette déshydratation, les composés d'Amadori ou de Heyns sont dégradés par énolisation 2,3 : il y a libération de l'acide aminé et formation de 1-déoxyosone et 4-déoxyosone instables. Ces composés α-dicarbonylés résultant de la décomposition des cétosamines sont capables de réagir de nouveau, avec un acide aminé et entraîner sa dégradation (dégradation de Strecker). Cette réaction se manifeste concrètement par un dégagement d'anhydride carbonique et par l'apparition d'un aldéhyde correspondant à l'acide aminé

ayant subi cette décarboxylation oxydative. Elle se caractérise également par une intensification du brunissement sans acidification du milieu.

On peut souligner le caractère auto-catalytique de la dégradation de Strecker. En effet, les aldéhydes formés lors de cette réaction peuvent s'additionner par condensation de Maillard à d'autres acides aminés. Les réductones ou déshydroréductones produites lors de la déshydratation peuvent être régénérées et provoquer une nouvelle dégradation de Strecker.

Les composés aminés porteurs d'un groupement thiol (cystéine, homocystéine, glutathion) voient une augmentation de leur réactivité avec les composés intermédiaires (3-déoxyhexosulose par exemple). D'après **Edwards et Wedzicha (1992)**, il y aurait d'abord une réaction initiale rapide entre le composé thiol et le 3-déoxyhexosulose, puis une libération progressive d'un composé thiol, probablement une thiazolidine. Dans le cas de la cystéine et de l'homocystéine, les auteurs suggèrent que l'étape suivante est une réaction lente de dégradation de Strecker **(figure 6)**. Ceci n'est pas le cas pour le glutathion : d'après **Zheng *et al*. (1997)**, le groupe aminé du résidu cystéinyl du glutathion (γ-glu-cys-gly) étant impliqué dans la liaison peptidique, il ne peut pas participer à la réaction de Strecker avec un composé dicarbonylé. Ainsi, selon ces auteurs, les mécanismes réactionnels du brunissement non enzymatique seraient différents pour la cystéine et le glutathion.



<u>Figure 6</u> : Décomposition de la cystéine par le mécanisme de la dégradation de Strecker : formation du sulfure d'hydrogène (I) et du 2-mercaptoéthanal (II) (d'après Belitz *et al*., 2004)

Les réactions de scission

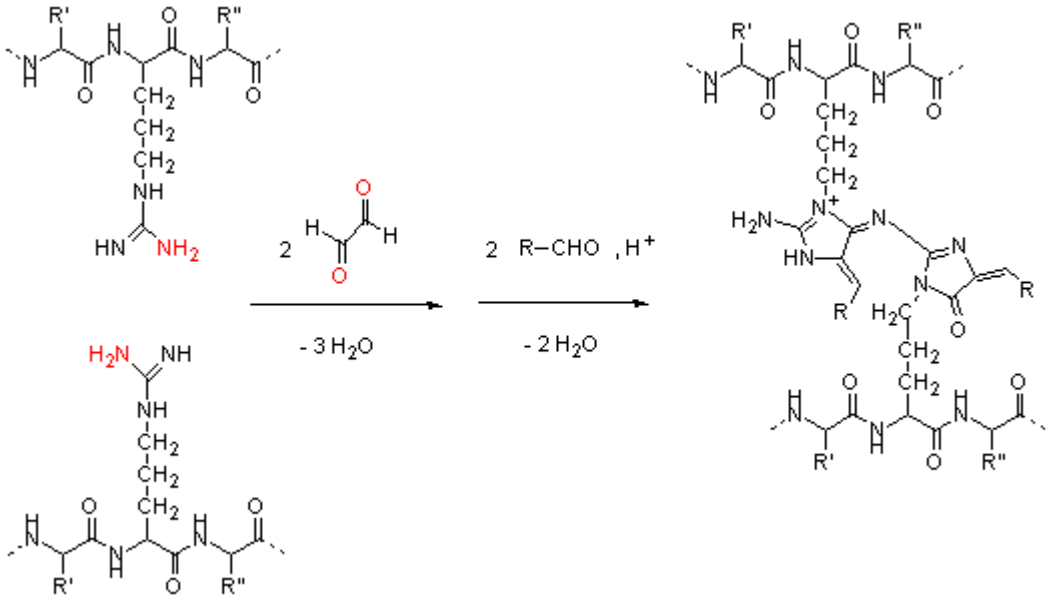
Une coupure des cétosamines et des aldosamines obtenus lors du réarrangement d'Amadori ou de Heyns, peut conduire à la formation de molécules carbonylées ou acides de plus faibles poids moléculaires, qui, par condensation aldolique, donnent les polymères et composés d'arômes qui ne relèvent pas spécifiquement de la réaction de Maillard puisqu'ils apparaissent également dans les réactions de caramélisation.

Les réactions de polymérisation

Les réactions de polymérisation font principalement intervenir des condensations aldoliques entre les produits intermédiaires issus des réactions précédentes et aboutissent à la formation de composés colorés de masse moléculaire élevée : entre 5 000 et 50 000 Daltons. La structure et les mécanismes de formation des

mélanoïdines ne sont pas encore très bien connus. Il y a trois principales propositions de structures des mélanoïdines. Il a été d'abord pensé que les mélanoïdines étaient exclusivement obtenues par polycondensations de molécules de faible masse moléculaire et consistaient en la condensation d'unités répétitives de dérivés pyrroles et / ou furannes formés lors des premières étapes de la réaction de Maillard (**Tressl *et al.*, 1998**). Cette dernière proposition est contredite par **Cämmerer *et al.* (2002)** qui ont identifié des structures glucidiques intactes par hydrolyse acide de mélanoïdines. Ceci indique que les glucides peuvent ne pas être dégradés en hétérocycles (furannes et pyrroles) et former des mélanoïdines. La condensation de deux aminocétones, produits secondaires de la réaction de Strecker, donne des pyrazines, composés d'arômes très actifs. Elles sont très présentes dans les produits alimentaires auxquels elles donnent des arômes particuliers plus ou moins désirables. D'après **Bailey *et al.* (2000)**, les réductones donnent également, par réaction avec des acides α-aminés puis de multiples réactions intramoléculaires, des composés très colorés.

Hofmann (1998), en chauffant des solutions aqueuses de glucose et d'acides aminés, a détecté la présence de composés de masse moléculaire inférieure à 3 000 Daltons capable de se lier aux protéines via les groupes ε-aminés de la lysine ou de l'arginine et produire ainsi des mélanoïdines de masse moléculaire élevée (supérieure à 100 000 Daltons) (**figure 7**).



<u>Figure 7</u> : Schéma de synthèse de mélanoïdines à partir de réductones et de résidus d'arginine (d'après Hofmann, 1998)

Yaylayan et Kaminsky (1998) identifient deux types de polymères dont la masse molaire est comprise entre 10 000 et 20 000 Daltons, issus de la réaction de mélanges équimolaires de glycine et de glucose :

- des polymères azotés linéaires de formule brute $(C_7H_{11}N_1O_4)_n$ dont la pyrolyse génère des composés typiques des produits du réarrangement d'Amadori et de ses dérivés (pyrazines, pyrroles…),
- des polymères branchés non azotés de formule brute $(C_1H_2O_1)_n$ qui pourraient dériver par plusieurs glycosylations successives du glucosone et / ou du 3- ou 1-déoxyglucosone.

Ainsi, pour ces auteurs, les mélanoïdines peuvent aussi être formées à partir des produits de dégradation des glucides formés lors des premières étapes de la réaction de Maillard, polymérisés par des condensations de type aldol, et qui peuvent être ou non, reliés à des composés aminés tels que les acides aminés.

L'importance accordée à la structure de ces composés colorés est due au fait que l'intensité et la cinétique de la réaction de Maillard peuvent être suivies par la coloration du milieu réactionnel (absorbance à 420 nm, couleur complémentaire de l'orange-brun, caractéristique des PRM : plus cette coloration est importante, plus la réaction est avancée). Pour mieux définir le lien entre la coloration du milieu et l'avancement de la réaction, **Martins et Van Boekel (2003)** ont mesuré le coefficient d'extinction molaire de ces composés bruns à 470 nm. Ainsi les mélanoïdines obtenues par chauffage de système modèles glucose / glycine montrent des coefficients d'extinction molaire de 0,65, 0,66 et 0,62 (± 0,02) $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$ à 120 °C pH 6,8, 100 °C pH 6,8 et 100 °C pH 5,5 respectivement.

L'avancement de la réaction de Maillard peut également être mesurée en dosant les réactants encore présents en fin de réaction (glucides réducteurs, acides aminés résiduels). Grâce à ces paramètres, permettant de caractériser l'avancement et l'intensité de la réaction de Maillard, des études ont montré l'influence de certains facteurs sur la cinétique de la réaction de Maillard (**Renn et Sathe, 1997 ; Ajandouz et Puigserver, 1999**). En effet, en faisant varier le pH, la durée et la température de chauffage, ainsi que les réactants mis en œuvre, l'intensité de la réaction et les produits formés ne sont pas les mêmes.

1.2.2. Les facteurs influençant la réaction de Maillard

Les facteurs réactionnels

L'activité de l'eau

La réaction de brunissement non enzymatique se développe de façon intense lorsque la teneur en eau est faible avec un maximum pour des activités de l'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 faibles teneurs en eau, les milieux réactionnels sont pâteux et la solubilité des réactants est réduite.

La température et la durée de chauffage

La température de chauffage est un paramètre qui influence la cinétique de réaction et le type de produits formés. Les énergies d'activation des différentes étapes du brunissement non enzymatique varient selon les auteurs en fonction des gammes de températures mises en œuvre et la façon de mesurer l'intensité de la réaction de Maillard. Ainsi, pour **Barbenti *et al.* (1990)** la vitesse de réaction est multipliée par deux et par cinq lorsque la température d'un mélange équimolaire de glucose / glycine est augmentée de 10 et 20 °C respectivement dans une plage de température comprise entre 70 et 90 °C. **Alais et Linden (1987)** indiquent que la vitesse de disparition de l'azote est multipliée par 20 000 lorsque la température passe de 0 à 70 °C. **Anese *et al.* (1998)**, en mesurant le dégagement de CO_2 et l'absorbance (294 nm et à 420 nm) ont confirmé que la réaction de Maillard s'intensifie lorsque la température et la durée de chauffage augmentent.

Des mesures de l'intensité de la réaction de Maillard (mesures spectrophotométriques ou dosages d'acides aminés résiduels) ont montré que la réaction de Maillard n'est pas totalement stoppée aux basses températures (inférieures à 40 °C) et se produit *in vivo.* Les recherches actuelles sur la réaction de Maillard *in vivo* tendent à comprendre les pathologies liées au vieillissement (**Gerrard, 2006**).

Le pH du milieu réactionnel

Plusieurs études montrent une acidification au cours de la réaction de Maillard. Ceci s'explique par la formation de composés aminés de pKa plus faibles et par la transformation d'oses en dérivés acides au cours du brunissement non enzymatique (**Apriyantono et Ames, 1990 ; Renn et Sathe, 1997**).

La réaction de Maillard est favorisée par des milieux alcalins, avec un optimum à pH 10 (**Ajandouz et Puigserver, 1999**). L'étude de **Renn et Sathe (1997)** montre que le taux de réaction du glucose augmente 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 des autres paramètres réactionnels (**Clotet *et al.*, 1994**).

En plus de modifier la vitesse de réaction, le pH modifie également le profil des composés formés. Par exemple, 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**). En effet, les milieux alcalins favorisent l'énolisation 2,3 formant des pyrazines après condensation des aminocétones issues de la réaction de Strecker alors que les pH acides favorisent l'énolisation 1,2 et la formation de composés tels que le furfural et ses dérivés.

Les réactants

Nature des sucres réducteurs

Buera *et al.* (1987) ont établi une première classification des oses selon leur réactivité dans la réaction de Maillard. En chauffant des systèmes équimolaires ose / glycine à 55 °C et en mesurant l'absorbance à 420 nm des différents systèmes modèles après chauffage, il apparaît que les pentoses sont plus réactifs que les hexoses, eux-mêmes plus réactifs que les diholosides. 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.

Si cette classification de réactivité des oses est généralement admise et vérifiée, d'autres paramètres peuvent influencer ce classement comme notamment le pH et la température (**Lievonen *et al.*, 2002**)

Nature de l'acide aminé

Lorsque la source aminée est de nature protidique, les glucides réducteurs ne peuvent réagir que sur les fonctions aminées libres, c'est-à-dire l'acide aminé N-terminal et / ou les fonctions amines latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine). Cependant, les fonctions ε-aminés sont moins réactives que les α-aminés (**Adrian, 1999**).

Ashoor et Zent (1984) classent les acides aminés en trois groupes selon l'intensité du brunissement de modèles systèmes équimolaires glucose / acide aminé. Le groupe d'acide aminé provocant un brunissement intense lors de la réaction de Maillard est celui des acides aminés basiques auxquels s'ajoute la tyrosine. Les systèmes modèles à base de thréonine, d'acide aspartique et glutamique, et de cystéine sont ceux qui montrent la plus faible intensité de brunissement. **Ajandouz et Puigserver (1999)** en utilisant huit acides aminés essentiels ont montré que la lysine et le tryptophane entraînent un brunissement très intense.

Il paraît difficile de dresser une relation structure / réactivité des acides aminés : des acides aminés basiques peuvent avoir des réactivités très différentes. 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.

Influence du ratio ose / acide aminé

Barbenti *et al.* (1990) ont déterminé par colorimétrie, les valeurs des constantes de vitesse de réaction de systèmes glucose / glycine chauffés à 70, 80 et 90 °C. En faisant varier la concentration totale en réactants (20, 30, 40 %) et le ratio molaire glucose / glycine (1:1 ; 2:1 ; 5:1), ces auteurs montrent que la constante de vitesse de la réaction augmente lorsque la concentration totale augmente mais diminue lorsque l'excès de glucose augmente. De même, **Renn et Sathe (1997)** ont observé un brunissement plus rapide des PRM lorsque les systèmes modèles présentaient un excès d'acide aminé.

1.3. Les produits de chauffage du glucose seul et de la cystéine seule

Lors de la réaction de Maillard, les réactifs initiaux, composés aminés et sucres réducteurs interagissent pour former des composés spécifiques du brunissement non enzymatique. Mais, on observe également, au cours de la réaction de Maillard, la formation de produits issus directement de la dégradation thermique des composés aminés ou des sucres seuls.

1.3.1. La caramélisation : les produits formés et leurs propriétés

La caramélisation est un terme qui englobe toutes les réactions de dégradations thermiques des sucres, en particulier le mono- et disaccharides réducteurs. On peut distinguer plusieurs étapes dans les réactions de caramélisation (**Kroh, 1994**). La première étape de la plupart des réactions de caramélisation comporte des réarrangements internes des sucres (énolisations). La deuxième étape consiste en la perte d'une molécule d'eau et est suivie de différentes réactions selon le type de sucre, les conditions de pH et de température. C'est dans ces étapes intermédiaires que sont formés les composés volatils associés au goût du caramel. L'apparition de la couleur du caramel est due à des réactions de polymérisations radicalaires et constitue l'étape finale de la caramélisation. Les produits de la caramélisation ont des propriétés aromatisantes et colorantes qui en font des additifs très utilisés en agro-alimentaire.

En milieu alcalin, la dégradation thermique des oses conduit à la formation de pyruvaldéhyde et d'acide lactique et est utilisée pour la formation des caramels colorants (E 150) dont la dose journalière admissible a été fixée à 200 mg / kg de masse corporelle pour les caramels dont les promoteurs de caramélisation sont le sulfite de sodium (E 150 b), l'ammoniaque (E 150 c) et le sulfite d'ammonium (E 150 d). Le caramel E 150 a, dont le promoteur de caramélisation est la soude n'est quant à lui pas soumis à une dose journalière admissible (DJA). En milieu acide, les réactions d'énolisation et de déshydratation sont suivies de cyclisation conduisant à des produits intermédiaires tels que le HMF, le 2(-2-hydroxyacétyl)-furanne et le maltol. Les caramels utilisés pour les arômes sont produits par chauffage de sucres en milieu acide (acides carboxyliques) (**Belitz *et al.*, 2004**).

Cependant des études anciennes et récentes discutent toujours actuellement de la possible toxicité de ces produits. **Kitts *et al.* (2006)** ont récemment montré que les composés de bas poids moléculaires non volatils issus du chauffage acide de solutions de saccharose peuvent être mutagènes et clastogènes (modification de

la structure des chromosomes). Le HMF est au cœur de ce débat : sa toxicité, sa mutagénicité et sa carcinogénicité sont toujours controversées (**Michail *et al.*, 2007**). **Ulbricht *et al.* (1984)** déterminent une dose létale 50 (DL50) à 3,1 $g.kg^{-1}$ de masse corporelle chez les chiens et les rats et notent que des doses supérieures à 75 $mg.\ kg^{-1}$ entraînent une augmentation des activités détoxifiantes du foie. Ceci s'oppose clairement aux travaux de **Kim *et al*.** (**1987**) qui montrent au contraire un effet dismutagène du HMF. De façon plus surprenante, l'utilisation du HMF pour inhiber l'expression du facteur de nécrose des tumeurs (TNF.alpha) et de l'interleukine-1.béta – dont la surexpression serait liée à de multiples pathologies : maladie de Crohn, SIDA, cancer, asthme, psoriasis… – fait l'objet d'un brevet (**Ying *et al.*, 2005**).

1.3.2. Les produits de chauffage de la cystéine seule

Il existe peu d'articles traitant des composés formés au cours du chauffage de la cystéine. De plus, ces articles parus depuis au moins 20 ans, traitent uniquement de la fraction volatile des produits de chauffage de la cystéine avec comme intérêt la formation de composés aromatiques lors du chauffage des produits carnés. **Mecchi *et al.* (1964)** montrèrent que la cystéine des protéines de muscle est un précurseur du sulfure d'hydrogène lors du chauffage de la viande pendant des temps longs.

En procédant à une photolyse de la cystéine en milieu aqueux, **Obata *et al.* (1965)** ont identifié les composés volatils primaires de la dégradation de la cystéine : H_2S, NH_3, CO_2 et acétaldéhyde. C'est à partir de ces composés que **Shu *et al.* (1985)** puis **Zhang *et al.* (1988)** émettent des hypothèses sur les voies réactionnelles de formation de composé plus complexes.

D'après les travaux de **Shu *et al.* (1985)** le pH de la solution de cystéine, influence la quantité et la nature des composés volatils formés. Ainsi en milieu acide (pH = 2,2), le rendement de formation des composés volatils au cours du chauffage est de 7,7 ‰ (masse de composés volatils / masse de cystéine introduite). Les composés formés présentent des formes cyclisées telles que celles du 1,2,3-trithia-5-cycloheptène. Le composé majoritairement formé à pH acide lors du chauffage de la cystéine est le 2-thiophènethiol représentant 14 % de la masse totale des composés volatils collectés. Lorsque la cystéine est chauffée à un pH voisin de son point isoélectrique (pI = 5,1) le rendement massique de formation des composés volatils s'élève à 32,5 ‰ indiquant une forte dégradation de la cystéine lors d'un chauffage proche de son point isoélectrique. De façon surprenante, le composé volatil majeur issu de cette dégradation est l'acétone. Le 3,5-diméthyl-1,2,4-trithiolane est également formé en quantité significative. A un pH supérieur au pI de la cystéine, le taux de production de composés volatils redescend à 2,9 ‰. Ce faible rendement témoigne de la

dégradation douce de la cystéine qui se produit à pH 7,1. Les composés formés dans ces conditions sont tous cyclisés sauf la méthyléthylcétone, les composés majoritaires étant le 3,5-diméthyl-1,2,4-trithiolane, le 2-thiazolyl-éthyl-cétone et le 3-méthyl-1,2-trithiane.

Zhang *et al.* (1988) en chauffant à 180 °C pendant 1 h des solutions aqueuses de cystéine dont le pH est ajusté à 7,5 mettent également en évidence la présence d'hétérocycles soufrés complexes parmi les composés volatils formés. Ces auteurs notent que la dégradation de la cystéine conduit à la formation d'une grande quantité de produits d'interaction entre l'H_2S et le NH_3 tels que 2,4,6-trimethylperhydro-1,3,5-thiadiazine et 2,4,6-trimethylperhydro-1,3,5-dithiazine. Ces deux composés représentant 71 % des composés volatils totaux issus du chauffage de la cystéine dans ces conditions, sont des produits typiques de la réaction de l'acétaldéhyde, de l'hydrogène sulfureux et de l'ammoniac.

1.4. Formation d'arômes par la réaction de Maillard

Bien que ces aspects de la réaction de Maillard semblent éloignés de ce travail de thèse, il nous semble utile d'aborder ce sujet compte tenu de leur importance, au niveau historique de la réaction de Maillard mais surtout d'un point de vue technologique. En effet, la réaction de Maillard est de la plus haute importance pour la qualité des aliments et plus particulièrement pour les aliments chauffés. Elle induit de nombreuses transformations des propriétés organoleptiques en modifiant la couleur et la texture des aliments. Elle a également un effet sur leur valeur nutritionnelle et entraine une grande variété de composés d'arômes. La dégradation de Strecker notamment, permet la formation de molécules spécifiques aromatiques (aldéhyde dérivé de l'acide aminé) qui valorisent grandement la valeur organoleptique des produits grillés (croûte du pain, biscotte, biscuit, arachide, cacao etc.)

La formation d'arôme par la réaction de Maillard est en partie décrite par la directive 88/388/CEE du Conseil européen du 22 juin 1988, relative au rapprochement des législations des Etats membres dans le domaine des arômes destinés à être employés dans les denrées alimentaires et des matériaux de base pour leur production, appliquée en France par le Décret 91-366. Selon cette directive, peut être appelé « arômes » : tout produit ou substance qui, étant destiné à être ajouté à des denrées alimentaires pour leur donner une odeur, un goût ou une odeur et un goût, entre dans l'une des six catégories suivantes à l'exception des substances ayant exclusivement un goût sucré, acide ou salé :

1) Substances aromatisantes naturelles
2) Substances aromatisantes identiques aux substances aromatisantes naturelles
3) Substances aromatisantes artificielles
4) Préparations aromatisantes
5) Arômes de transformation
6) Arôme de fumée

La cinquième catégorie est définie de façon précise : un arôme de transformation AT, ou APMT (aromatisants produits par la méthode thermique) est « un produit obtenu dans le respect des bonnes pratiques de fabrication par un chauffage à une température non supérieure à 180 °C, pendant une période n'excédant pas 15 minutes, d'un mélange d'ingrédients qui ne possèdent pas nécessairement eux-mêmes des propriétés aromatisantes et dont au moins un contient de l'azote (aminé) et un autre est un sucre réducteur ». Cette définition peut correspondre aux substances aromatisantes obtenues par la réaction de Maillard et peut, à

condition de respecter les barèmes de chauffage prévus par la réglementation, permettre leur introduction dans un aliment.

Pendant les trente dernières années, plusieurs centaines de brevets ont été accordées dans le monde entier, pour des procédés et des produits de réaction basés sur la technologie du brunissement non enzymatique. La majorité des brevets basés sur le principe de la réaction de Maillard pour produire notamment des arômes de viande, utilisent des solutions aqueuses de mélanges d'acides aminés et des pentoses réactifs tels que le xylose et le ribose (**Mottram *et al.*, 1998**). Cependant, la formation de composés aromatiques par la réaction de Maillard met en jeu un ensemble complexe de réactions et de paramètres physico-chimiques. Les voies réactionnelles menant à certaines catégories de composés sont plus ou moins connues mais on ne sait actuellement pas orienter spécifiquement la réaction de Maillard pour former les arômes agréables (**van Boekel, 2006**).

D'après **Jousse *et al.* (2002)**, la formation des composés d'arômes par la réaction de Maillard au cours du chauffage des aliments dépend :

- de leur teneur en eau et du barème temps-température appliqué ;
- du type de sucre, d'acide aminé et du pH de l'aliment chauffé.

Tandis que le premier type de paramètres affecte plutôt leur cinétique de formation, en général, le second influence le type d'arômes formés. Par exemple, les arômes de viande sont principalement des composés aromatiques soufrés issus du chauffage de la cystéine et du ribose, alors que la proline mène à la formation de composés à l'arôme typique de pain, de riz ou de pop-corn. Le **tableau 1** présente les arômes généralement associés à différentes classes de composés ainsi que les aliments dans lesquels ils peuvent être trouvés.

Tableau 1 : Vue d'ensemble de quelques classes de composés aromatiques issus de la réaction de Maillard (van Boekel, 2006).

Famille chimique	Arôme ou flaveur associé	Exemple d'aliment
Pyrazines	cuit, rôti, toasté, céréales cuites	aliments chauffés en général
Alkylpyrazines	noix, rôti	café
Alkylpyridines	vert, amer, astringent, brûlé	café, orge, malte
Acylpyridines	cracker	produits céréaliers
Pyrroles	céréales	céréales, café
Furannes, furanones, pyranones	sucré-doux, brûlé, âcre, caramel	aliments chauffés en général
Oxazoles	vert, noix, sucré-doux	cacao, café, viande
Thiophènes	viande	viande cuite

Par ailleurs, il faut préciser que la plupart des travaux publiés portent sur des milieux modèles et non pas sur des aliments. Les effets des matrices alimentaires (milieux complexes) ainsi que ceux du pH, de la teneur en eau et de la présence les catalyseurs spécifiques restent à l'heure actuelle encore largement méconnus.

1.5. Propriétés anti-oxydantes des produits de la réaction de Maillard (PRM)

Les propriétés antioxydantes des PRM qui permettent de stabiliser les produits alimentaires sont reconnues à l'heure actuelle. Différentes réactions d'oxydation se trouvent ainsi inhibées par les propriétés réductrices, chélatrices ou piégeurs de radicaux libres de certains PRM. La peroxydation lipidique est une des causes principales d'altération des produits alimentaires au cours de leur stockage en présence d'oxygène. Cette oxydation peut être catalysée par des enzymes, des métaux ou être induite photo-chimiquement (**Morales et Jimenez-Perez, 2001**). Cette oxydation fait apparaître des radicaux libres (peroxyle, alkoxyle, hydroxyle) et forme des composés aldéhydiques affectant les propriétés organoleptiques des aliments. Des antioxydants synthétiques tels que le BHA et le BHT sont actuellement utilisés pour prévenir ce phénomène mais la remise en question de leur sécurité pour la santé humaine a favorisé la recherche d'antioxydants « naturels ».

1.5.1. Piégeage par les PRM des espèces réactives de l'oxygène (hydroxyles et peroxyles)

La plupart des études sur l'activité antioxydante des PRM ont été conduites en utilisant des systèmes modèles comprenant des PRM et des lipides sans toutefois parvenir à élucider la nature exacte des composés antioxydants utilisés. Les produits de haut poids moléculaire (HMW), comme les mélanoïdines, ont longtemps été considérés comme les composés antioxydants majeurs formés lors des réactions de brunissement non enzymatique. **Lingnert et Eriksson (1980)** étudièrent les paramètres physico-chimiques de la réaction de Maillard (durée et température de chauffage, pH, concentration et nature des réactants) et leur influence sur le pouvoir antioxydant des produits de réaction. Dans le cadre de cette étude, l'effet antioxydant (EA) de l'ajout de PRM vis-à-vis de l'oxydation enzymatique est mesuré respectivement par des méthodes polarographiques (consommation d'oxygène – **tableau 2, colonne A**) lorsque la catalyse est effectuée sous l'action d'un composé héminique et chromatographiques (production de composés volatils) lorsque l'oxydation est

catalysée par la peroxydase de raifort (**tableau 2, colonnes B**). D'après ces mesures, les mélanges réactionnels arginine / xylose et lysine / xylose sont les plus antioxydants lorsque l'effet est mesuré par chromatographie. De façon plus générale, les acides aminés basiques permettent d'obtenir des composés avec de meilleurs pouvoirs antioxydants que ceux issus de l'acide glutamique, de la valine et de la cystéine.

<u>Tableau 2</u> : Effets antioxydants (Mesures polarographiques – colonne A) de PRM issus de différentes combinaisons acide aminé / ose réducteur et leur influence sur la formation de composés volatils et des diènes conjugués (Mesures chromatographiques – colonnes B) issus de l'acide linoléique après 25 h (Adapté de Lingnert et Eriksson, 1980).

Réactifs			B			
Acide aminé	Ose	A	n-Pentanal (1)	n-Hexanal (ppb)	n-Hept-trans-2-énal (1)	$\Delta A_{234\ nm,\ 25\ h}$ (2)
Témoin (sans ajout)			46	1512	101	1,2
Arginine	Glucose	0,7	44	1303	102	1,2
	Fructose	0,4	39	1142	96	1,1
	Xylose	5,6	4	39	5	0,1
Cystéine	Glucose	0,2				
	Fructose	0,3	76	1349	151	1,4
	Xylose	0,2	28	848	78	1,2
Acide glutamique	Glucose	0	58	2542	117	0,9
	Fructose	0				
	Xylose	0,3				
Histidine	Glucose	0,9	2	29	6	0,2
	Fructose	0,7	2	25	4	0,1
	Xylose	0,9	2	21	3	0,1
Lysine	Glucose	1,3	7	85	13	0,3
	Fructose	0,8	16	19	22	0,5
	Xylose	3,9	10	72	13	0,2
Valine	Glucose	0,5	27	706	78	1,1
	Fructose	0,3	31	1172	94	1,1
	Xylose	0,4	38	1060	84	1,1

Les produits de la réaction de Maillard sont obtenus par chauffage à reflux de 5 mmol d'acide aminé et de 10 mmol d'ose dans 5 mL de solution tampon phosphate (0,1 M) à pH 7,0.

(A) Effet antioxydant EA = (Ta - Tc) / Tc, Ta et Tc étant les temps nécessaires à l'oxydation de 50 % de l'oxygène dissous dans l'émulsion d'acide linoléique en présence et en l'absence de PRM respectivement. L'oxydation de l'acide linoléique est alors catalysée par un composé héminique.

(B) Effet antioxydant mesuré par chromatographie lorsque l'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la peroxydase de raifort.

(1) Valeurs exprimées en unités arbitraires.

(2) $\Delta A_{234nm,\ 25h}$: Augmentation de l'absorbance à 234 nm après 25 heures d'oxydation de l'acide linoléique.

Lingnert et Waller (1983) étudièrent également la stabilité de ce pouvoir antioxydant au cours des procédés de purification visant à isoler les composés responsables des propriétés antioxydantes des PRM. Ils mirent alors en évidence le pouvoir piégeur des radicaux oxygènes libres par les PRM.

Hayase *et al.* (1989) attribuent aux mélanoïdines le pouvoir antiradicalaire des PRM. De même, **Monti *et al.* (1999)** montrent que ce sont les PRM de hautes masses moléculaires (> 10 kDa) de systèmes lactose-lysine qui sont principalement responsables du pouvoir piégeur de radicaux peroxyles libres. **Jing et Kitts (2004)**, ont montré que les PRM issus de systèmes modèles de lysine et trois sucres différents (ribose, glucose et fructose) ont des capacités antioxydantes très semblables (piégeage des radicaux libres issus de l' H_2O_2 et de AAPH°). De plus, ces auteurs indiquent que ce sont les PRM de hauts poids moléculaires qui sont responsables des propriétés antioxydantes de ces PRM.

Cependant, la distribution du pouvoir anti-radicalaire des PRM est largement discutée. **Morales et Babbel (2002)** observent que si les mélanoïdines issues de glycine et de cystéine ont un pouvoir antiradicalaire plus élevé que les PRM issus d'autres acides aminés, cette capacité reste faible comparée à celles du café ou de composés phénoliques. La même année, **Wagner *et al.* (2002)** ont montré que les PRM formés à partir de glucose-glycine à 120 °C ont d'excellentes capacités antioxydantes dans les matrices hydrophiles telles que des jus de fruits ou en milieu tamponné. Bien que la fraction insoluble des PRM montrent un pouvoir antioxydant, la fraction de bas poids moléculaire (< 12 400 Da) se montre la plus efficace pour piéger les radicaux peroxyles, propriété mesurée par la méthode ABTS°.

Plus récemment, **Yilmaz et Toledo (2005)** en utilisant le test $ORAC_{PE}$, ont montré le pouvoir piégeur de radicaux peroxyles libres par des PRM issus de mélange histidine-glucose. Les auteurs évoquent non plus les produits finaux de la réaction de Maillard (mélanoïdines) mais plutôt des composés issus des premières étapes de la réaction de Maillard : un chauffage des mélanges à 120 °C pendant plus de 30 minutes réduit les capacités de piégeages des radicaux peroxyles libres des PRM. Ceci confirme les propriétés antioxydantes attribuées aux produits primaires de la réaction de Maillard par **Murakami *et al.* (2002).**

1.5.2. Propriétés chélatrices

O'Brien et Morrissey (1997) par des expériences de potentiométrie ont étudié l'interaction entre des ions métalliques et des PRM (glucose-glutamate). Les déplacements de protons observés suggèrent qu'il se forme des complexes entre les PRM et les ions métalliques. Le classement de l'intensité des liaisons entre les PRM

et les ions métalliques est la suivante : $Mg^{2+} > Cu^{2+} = Ca^{2+} > Zn^{2+}$. Cet ordre diffère de ce qui est généralement attendu pour un système mononucléaire binaire et suggère la présence d'au moins deux ligands distincts dans les PRM.

L'année suivante, **Wijewickreme et Kitts (1998)** ont étudié l'effet des différents paramètres (temps et température de chauffage, activité de l'eau et pH initial) sur les propriétés antioxydantes – et notamment chélatrices du cuivre – de systèmes modèles glucose-lysine et fructose-lysine. Ces auteurs mettent en évidence le pouvoir chélateur du cuivre des PRM étudiés et déterminent que le nombre de moles de cuivre fixées par mg de PRM varie de 0,031 à 1,574 et de 0,016 à 2,267 pour les systèmes glucose-lysine et fructose-lysine respectivement selon les conditions réactionnelles.

Seifert *et al.* (2004) ont étudié plus spécifiquement les complexes de cuivre et de zinc pouvant se former entre la *N*-fructosylysine et la L-carboxyméthyllysine dont la fonction de coordination du groupe α-aminé a été bloquée par l'acide hippurique. Selon ces auteurs, la *N*-Hippuryl-*N*-fructosylysine forme des complexes modérés avec le Cu(II) ($\log_{10} K_1 = 5,8$; $\log_{10} K_2 = 4,0$) mais ne forme aucun complexe avec le Zn(II). La *N*-Hippuryl-*N*-carboxyméthyllysine forme des complexes plus forts avec le Cu(II) ($\log_{10} K_1 = 7,3$; $\log_{10} K_2 = 6,3$), mais là encore, aucune complexation avec le Zn(II) n'a été observée.

Plus récemment, **Morales *et al.* (2005)** ont étudié *in vitro* les capacités chélatrices du fer de fractions solubles de hauts poids moléculaires isolés de 22 PRM issus de systèmes modèles ou de matrices alimentaires. Les mélanoïdines ont été classées en trois groupes selon le nombre de sites de coordination pour le fer. Les mélanoïdines de café (torréfaction moyenne), de différentes bières et de vin moelleux (Pedro Ximenez) montrent un faible effet chélateur du fer en comparaison des mélanoïdines issues des systèmes modèles. Le type de sucre a un effet significatif sur la capacité des PRM à complexer le fer : les PRM préparés avec du glucose sont plus efficaces que ceux issus du lactose. Les auteurs ajoutent par ailleurs, qu'ils n'ont pas observé de relation entre l'intensité de coloration et les propriétés chélatrices des mélanoïdines issues des systèmes modèles : les résidus chromophores dans la structure des mélanoïdines ne seraient donc pas les principaux sites de co-ordination pour la complexation du fer.

Cependant, le mécanisme d'action antioxydante (antiradicalaire / chélation des métaux) des PRM n'est pas toujours clairement identifiable. Ainsi, **Yoshimura *et al.* (1997)**, en étudiant des PRM issus de mélanges glucose-glycine ont évoqué différents mécanismes pour expliquer le pouvoir antioxydant des PRM. Selon ces auteurs, les expériences de résonance paramagnétique électronique (RPE) montrent clairement que ces PRM piègent plus de 90 % des radicaux hydroperoxyles en captant directement les radicaux libres mais également

en chélatant les ions ferreux impliqués dans la réaction de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH°$). Il en résulte que les propriétés antioxydantes des PRM peuvent être attribuées à la combinaison de leurs effets réducteurs, donneurs d'atomes d'hydrogène, antiradicalaires et chélateurs.

1.5.3. Propriétés inhibitrices de systèmes enzymatiques

Les recherches sur les propriétés inhibitrices de systèmes enzymatiques par les composés issus de la réaction de Maillard portent sur des applications très variées. Par exemple, les recherches sur les effets de la réaction de Maillard *in vivo* sont multiples et mettent en évidence les effets des PRM sur le métabolisme ou sur le vieillissement. Par ailleurs, on peut noter que des applications pharmacologiques de l'inhibition d'enzymes par les produits de la réaction de Maillard ont été montrées (**Painter, 2003**). Cependant, nous ne traiterons ici que des applications liées à l'alimentation. **Bruins *et al.* (2003)** ont observé lors du chauffage du lactose à des températures de 60 et 80 °C pendant 0 à 50 heures, l'apparition de pigments bruns responsables de l'inactivation rapide de la β-galactosidase de *Pyrococcus furiosus* utilisée pour la production d'oligosaccharides en raison de sa thermostabilité.

Cependant, les PRM apportés par l'alimentation peuvent également, du fait de leur pouvoir inhibiteur d'activité enzymatique, avoir des effets bénéfiques. **del Castillo *et al.* (2007)** ont obtenu, en chauffant du gluten avec du glucose, des PRM issus de la croûte de pain dotés d'effets inhibiteurs sur l'enzyme convertissant l'angiotensine-I et impliquée dans la régulation de l'hypertension.

Les recherches sur les effets des PRM apportés par l'alimentation et notamment leur digestibilité sont actuellement en plein développement. Toutefois, les recherches sur l'utilisation des PRM en tant qu'additifs conservateurs (augmentation de la date limite de conservation) ou encore comme antioxydant (inhibiteur des oxydations responsables de la détérioration des qualités organoleptiques des produits) sont également en effervescence sous l'effet de la demande croissante des consommateurs de produits naturels et le rejet des conservateurs synthétiques.

Dès **1995**, **Tan et Harris,** ont évalué les effets des produits de la réaction de Maillard issus de différents systèmes modèles sur la polyphénoloxydase (PPO) de pomme par spectrophotométrie à 400 nm. Les effets inhibiteurs des PRM issus du chauffage pendant 7 h à 90 °C de mélange de différents acides aminés avec du glucose suit l'ordre suivant : arginine = histidine > cysteine > lysine. Par ailleurs, les PRM synthétisés aux pH acides sont des inhibiteurs plus efficaces de la PPO que les PRM formés à des pH plus élevés. Les auteurs

notent également, qu'il n'y pas de corrélation entre l'effet inhibiteur et l'intensité du brunissement des PRM, et émettent l'hypothèse que le groupement thiol de la cystéine et imidazole de l'histidine peuvent, en plus des mélanoïdines formées, jouer un rôle dans l'inhibition de l'activité polyphénoloxydasique. Compte tenu du pouvoir antioxydant des composés thiols, ces auteurs ont poursuivi l'étude des mélanges glucose-cystéine et ont montré que ces solutions chauffées, sont de meilleurs inhibiteurs du brunissement enzymatique que les solutions de cystéine-glucose non chauffées et que les solutions de cystéine seule, mais que ce pouvoir inhibiteur diminue après trois heures de chauffage. Ils ont montré également que le pouvoir inhibiteur des PRM synthétisés à pH 3 et 5 est supérieur à celui des PRM synthétisés à pH 11. Selon ces auteurs, l'effet du pH sur l'inhibition enzymatique peut être expliqué par une inhibition de l'enzyme dans des conditions acides (réduction du cuivre du site actif de la PPO et limitation de l'oxydation du substrat), mais aussi par la nature des produits formés en milieu acide favorisant l'énolisation 1,2 et conduisant à la formation de composés à structure pyrrolique dont le fort effet piégeur d'oxygène a été démontré.

Plus récemment, des études (**Roux *et al.*, 2003 ; Brun-Mérimée *et al.*, 2004**) mettant en œuvre différents systèmes ose (glucose ou fructose) / composé aminé (cystéine ou glutathion) ont montré des taux variables d'inhibition de la PPO de pomme dont l'activité est mesurée par la méthode polarographique (consommation en oxygène). **Billaud *et al.* (2003)** ont étudié les effets des PRM synthétisés à partir de mélange équimolaires glucose ou fructose / L-cystéine (1 M), en faisant varier la durée et la température de chauffage, sur l'activité de la PPO de pomme. Dans le cadre de cette étude, l'absorbance à 350 nm, utilisée comme indicateur du développement de la réaction de Maillard, apparaît linéairement liée au pouvoir inhibiteur pour les systèmes glucose/cystéine chauffés entre 80 et 120 °C et des temps de chauffage compris entre 0 et 48 heures (**figure 8**). Par ailleurs, la même équipe (**Billaud *et al.*, 2004**) a également établi que des préparations de PRM qui ont un pH initial acide montrent un plus fort pouvoir inhibiteur de la PPO, que l'inhibition est maximale pour un chauffage à 103 °C pendant 14 heures et que les systèmes issus de la réaction avec le glucose sont plus inhibiteurs que ceux issus de la réaction avec le fructose, toutes choses égales par ailleurs.

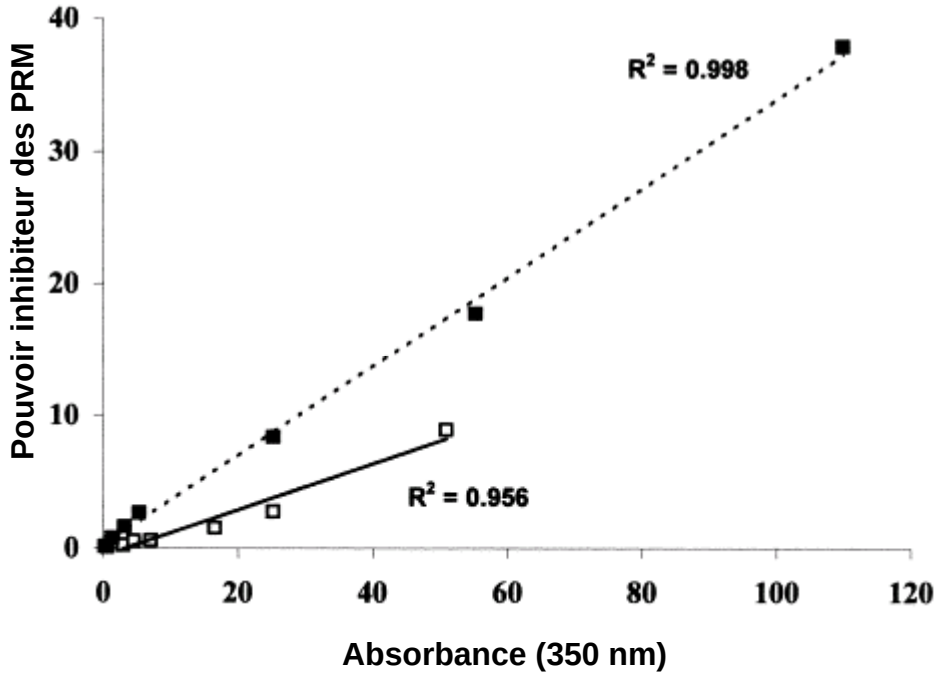


Figure 8 : Relation entre l'absorbance (350 nm) et le pouvoir inhibiteur de la PPO pomme de PRM dérivés de systèmes modèles fructose/cystéine (□) et de glucose/cystéine (■) au cours du temps de chauffage (0 – 48 h) à 90 °C (d'après Billaud *et al*. 2003)

Les recherches sur l'inhibition du brunissement enzymatique par des composés issus de brunissement non-enzymatique que ce soit dans les crevettes (**Matmaroh *et al.*, 2006**) ou dans les fruits et légumes (**Lee, 2007**) sont toujours en cours sans que ne soient élucidées les structures des composés impliqués. Concernant le mécanisme d'inhibition, les PPO étant des enzymes à cuivre, les propriétés chélatrices des PRM sont souvent évoquées pour expliquer, au moins en partie, leurs pouvoirs inhibiteurs (**Maillard *et al.*, 2007**).

1.6. Effets immunologiques et toxicologiques des produits de la réaction de Maillard (PRM)

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.

1.6.1. 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 le grillage augmente leurs caractères allergènes en conférant aux protéines allergisantes une plus grande résistance à la digestion (**Maleki *et al.*, 2000 ; Maleki et Yamaki, 2007**).

Cependant, l'effet inverse a également été constaté dès 1990 pour les protéines de soja par **Oste *et al.* (1990)** qui suggèrent que les sites responsables de réponses allergènes puissent être modifiés par des chauffages modérés en présence de sucres. Plus récemment, **Gruber *et al.* (2004)** ont montré que le chauffage de la protéine rPru av 1 – allergène majeur des cerises – avec du glucose ou du ribose, et de façon plus marquée avec du glycéraldéhyde ou du glyoxal induit une forte diminution de son pouvoir allergène en raison sans doute d'un changement de conformation de l'épitope par la réaction de Maillard. Plus précisément, **Hayase *et al.* (2006)** mettent cause des mélanoïdines issues du chauffage de mélange xylose-lysine pour expliquer la suppression de réactions allergiques. Cet effet anti-allergisant de la réaction de Maillard a également été étudié par **van de Lagemaat *et al.* (2007)** en glycatant des protéines de soja avec du fructose ou des fructo-oligosaccharides : jusqu'à 90 % de l'antigénicité des protéines est réduite du fait de leur glycation.

1.6.2. Effets mutagènes

Les études de la génotoxicité des PRM mettent en œuvre des tests utilisant des bactéries (*Salmonella thyphimurium, Escherichia coli*), des levures (*Saccharomyces cerevisiae*), des insectes (*Drosophila melanogaster*) et des cellules de mammifères *in vitro* (cellules ovariennes de Hamster chinois) et des

mammifères *in vivo* (souris). Les systèmes de test de la mutagénicité sont basés sur l'observation des altérations de l'ADN à plusieurs niveaux : les mutations ponctuelles, c'est-à-dire des changements au niveau de l'ADN touchant un à trois nucléotides, les effets chromosomiques (ruptures, délétions et translocations) et les transformations cellulaires (développement de tumeurs). Depuis le début des études sur la mutagénicité des composés, les chercheurs se sont tournés vers la réaction de Maillard avec des résultats aussi variés que peuvent l'être la nature des PRM et les conditions dans lesquelles se développe la réaction de Maillard.

L'étude de **Spingarn *et al.* (1983)**, utilisant la souche de salmonelles TA 98, porte sur la mutagénicité de PRM issus du chauffage sous reflux pendant 3 h de systèmes modèles ainsi que sur les produits de chauffage des acides aminés seuls. Les résultats obtenus montrent que le ratio acide aminé / glucose formant le plus de colonies revertantes varie beaucoup d'un acide aminé à l'autre (**tableau 3**). Ceci suggère que les acides aminés ne sont pas seulement des sources d'azote mais ont leur propre réactivité avec le glucose. De plus, les acides aminés chauffés sous reflux seuls sont également mutagènes. L'effet mutagène de la cystéine est confirmé sur la souche TA100 **(Glatt et Protic-Sabljic, 1983 ; Glatt et Oesch, 1985 ; Glatt *et al.*, 1990)**.

Tableau 3 : Mutagénicité des PRM issus de systèmes modèles acide aminé – glucose chauffés (adapté de Spingarn *et al.*, 1983).

		Mutagénicité [b] revertants / mmol			
Acide aminé	Stœchiométrie [a]	/ réactants	/ acide	/ glucose	Acide aminé
alanine	9 : 1	160	190	1300	0,0
arginine	1,5 : 1	30	60	70	0,3
cystéine	1 : 1	50	100	110	0,5
acide glutamique	6 : 1	50	60	440	0,4
glycine	6 : 1	650	810	4200	0,0
histidine	1 : 1	10	20	20	0,0
lysine	1,5 : 1	15	20	30	0,5
phénylalanine	4 : 1	170	250	1000	4,0
proline	6 : 1	120	150	900	0,5
sérine	3 : 1	360	500	1500	0,3
thréonine	3 : 1	750	1400	3800	0,1
tryptophane	9 : 1	20	20	200	2,0
valine	3 : 1	100	140	430	0,5

a : Ratio molaire acide aminé : glucose qui entraîne la plus haute mutagénicité par mole de réactant

b : Mutagénicité observée à la stœchiométrie optimale en présence de S9 exprimée en nombre de colonies revertantes par mmol de réactants (acide aminé + glucose), d'acide aminé et de glucose

La concentration totale en réactants est fixée à 2,0 M. Les mélanges sont ajustés à pH 10,5 (NH_4OH) avant leur dilution dans un volume final de 100 mL et le chauffage à reflux pendant 3 h.

c : chauffage à reflux de 0,2 mol d'acide aminé dans 100 mL de NH_4OH, pH 10,5, pendant 3 h.

Cette propriété mutagène est discutée par **Powrie *et al.* (1986)** : les produits primaires de la réaction de Maillard et de la caramélisation ont des effets mutagènes alors que la fraction insoluble des cafés lyophilisés ou les mélanoïdines des systèmes modèles auraient des propriétés antimutagènes en inhibant la mutagénicité de composés mutagènes reconnus (aflatoxines, nitrosoguanidine et benzo(a)pyrène). En **1993**, **Kitts *et al.*,** ont étudié plus particulièrement la mutagénicité sur des cellules bactériennes et mammaliennes de différentes fractions de PRM issus du chauffage d'un mélange glucose-lysine. Les fractions acides et neutres de bas poids moléculaires ainsi que les mélanoïdines, donnent des réponses positives dans les deux types de tests. Les auteurs notent également que l'induction de la mutagénicité et des aberrations chromosomiques par les différentes fractions de PRM est largement réduite après incubation en présence d'un système d'oxydation métabolique composé d'extrait de foie de rat et de cofacteurs.

Yen *et al.* (1992) ont observé des effets contradictoires des PRM. Ces auteurs étudient le pouvoir anti-mutagène par le test d'Ames de PRM préparés par chauffage de trois oses (fructose, glucose ou xylose) avec quatre acides aminés (arginine, glycine, lysine et tryptophane) à 100 °C pendant 10 h. Aucun effet mutagène ou toxique des différents PRM n'a été observé sur la souche TA98 en présence de S9. Certains PRM (fructose-glycine ou fructose-arginine) augmentent la mutagénicité de certains composés. Au contraire, les PRM issus du tryptophane ou ceux issus du xylose inhibent fortement la mutagénicité de différents composés mutagènes en présence de d'activation métabolique (S9). Les auteurs notent par ailleurs une corrélation entre l'effet antimutagène et le pouvoir antioxydant et réducteur des PRM. Ces recherches confèrent aux PRM des propriétés co-mutagènes ou antimutagènes selon les conditions de la réaction de Maillard.

Les études récentes modulent également les propriétés anti-/pro- mutagènes des PRM en considérant les concentrations pour lesquelles apparaît un pouvoir mutagène. Ainsi une étude sur des PRM issus du chauffage de glutathion ou de cystéine avec du fructose ou du glucose montre qu'aucun effet mutagène n'a été observé pour la souche TA98 et que seuls les PRM chauffés pendant des temps courts et aux plus fortes concentrations (> 5 %) ont montré un pouvoir mutagène chez la souche TA102 (**Wagner *et al.*, 2007**).

Les furannes 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. Le furfural, 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) et le 5-méthylfurfural sont mutagènes chez *S. typhimurium* TA100 et possèdent la capacité de rompre l'ADN en présence de cuivre (II) (**Yamashita *et al.*, 1998**). Ces composés font actuellement l'objet d'observations par l'***US Food and Drug Administration* (2006)**. Cependant, bien qu'ayant des activités cytotoxiques, génotoxiques et tumorigènes, le HMF, utilisé comme agent aromatisant, ne semble pas poser de problèmes de santé même si les concentrations élevées

en HMF (1000 ppm) de certains aliments (fruits secs, caramels…) approchent les concentrations pour lesquelles il a été observé des effets biologiques dans les systèmes cellulaires (**Janzowski *et al.*, 2000**).

Dès sa découverte en 1912, Louis Camille Maillard comprit la complexité de cette réaction et en imagina toutes les implications en physiologie humaine, en physiologie des plantes, en agronomie et en chimie analytique. Les publications récentes montrent que l'histoire de la réaction de Maillard est loin d'être terminée, mais les travaux de recherche s'orientent désormais plutôt sur les implications de la réaction de Maillard *in vivo*. En effet, comme le démontrent les travaux présentés lors du huitième symposium international sur la réaction de Maillard (**Baynes *et al.*, 2004**), l'étendue du rôle de cette réaction dans les pathologies liées au vieillissement (l'arthrite, l'athérosclérose, les diabètes et les maladies neuro-dégénératives) est devenue un axe majeur de la recherche médicale.

Beaucoup de recherches devront donc être menées pour savoir quels sont les risques et les bénéfices associés à la consommation de PRM, pour connaître les voies métaboliques des PRM exogènes au niveau cellulaire puis au niveau de l'organisme tout en étudiant les voies de formation et les effets des PRM *in vivo*. La réaction de Maillard, que ce soit en sciences alimentaires ou en sciences médicales restera donc certainement un domaine de recherche très actif et riche de découvertes dans les années à venir.

2. LE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE DES FRUITS ET LEGUMES

Parmi les caractéristiques organoleptiques des aliments, la couleur est l'une des propriétés principales pour évaluer la qualité des aliments par les consommateurs. Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte le plus la couleur des fruits et des légumes. Mais ce phénomène peut également se produire lors de la transformation et le stockage de certains fruits de mer. Il ne sera ici question que du brunissement enzymatique des fruits et légumes catalysé par la polyphénoloxydase (1,2 benzènediol ; oxygène oxydoréductase, EC.1.10.3.1) notée PPO. Cette appellation regroupe également les termes de phénoloxydase, phénolase, monophénoloxydase, diphénoloxydase et tyrosinase.

2.1. Aspects économiques du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut parfois être très bénéfique à l'acceptabilité du produit par le consommateur. En effet, que ce soit pour le thé noir, oolong ou vert, le brunissement enzymatique est nécessaire au développement de leur couleur et flaveur au cours du procédé de fabrication. De même, l'apparition de la couleur du cacao est facilitée par le brunissement enzymatique lors de la fermentation et le séchage des fèves. Les polyphénoloxydases sont par ailleurs responsables de la couleur dorée caractéristique des fruits secs (raisins, prunes, dates et figues). Or, le thé, le café et le chocolat sont des marchandises essentielles à l'économie de certains pays émergeants tels que l'Inde, la Chine, le Sri Lanka ou le Kenya (**Ensminger *et al.*, 1995**).

Cependant, le brunissement enzymatique est aussi une réaction très néfaste pour le marché des fruits et légumes. Mal contrôlé, ce phénomène est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans ce secteur (**Whitaker et Lee, 1995**). Ces lourdes pertes ont suscité un intérêt considérable dans la compréhension et le contrôle de l'activité polyphénoloxydase dans les aliments. Les salades et autres légumes feuillus, les pommes de terres et autres tubercules riches en amidon tels que les patates douces, l'igname, de même que les champignons, les pommes, les bananes, les pêches et encore beaucoup d'autres

fruits ou légumes sont sensibles au brunissement enzymatique. Ils peuvent donc être l'objet de pertes économiques pour tous les acteurs du secteur de la transformation des fruits et légumes. Ces pertes sont d'autant plus grandes que la détérioration des produits a lieu en fin de chaîne de production, peu de temps avant l'achat par le consommateur alors que des coûts (stockage, manutention, de transport) ont déjà été engendrés. Il est donc primordial de contrôler le brunissement enzymatique depuis la récolte jusqu'à l'achat par le consommateur afin de minimiser les pertes et maintenir la valeur économique du produit.

2.2. Rôle physiologique des polyphénoloxydases (PPO)

Les PPO ont été découvertes dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles sont majoritairement présentes dans les plastides des plantes, mais il y en a également abondamment dans le cytoplasme des fruits murs (**Vaughn et Duke, 1984**). Selon **Walker et Ferrar (1995)**, la localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et / ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (**Kuwabara et Katoh, 1999**). En support à cette hypothèse, **Lax et Vaughn (1991)** ont montré que la PPO était structuralement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (**Martinez et Whitaker, 1995**). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement controversés (**Vaughn *et al.*, 1988 ; Mayer et Harel, 1991 ; Walker et Ferrar, 1998**) et plusieurs hypothèses sont émises. Les polyphénols, ont des propriétés anti-fongiques (**Friedman, 1997**). La polyphénoloxydase catalyse l'oxydation de ces composés phénoliques en quinones, elles-mêmes bactéricides et fongicides (**Zinkernagel, 1986**), qui se polymérisent ensuite pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière, et grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, limitent la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante (**Zawistowski *et al.*, 1991**). Selon **Craft et Audia (1962)**, ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

2.3. Caractéristiques réactionnelles et structurales des polyphénoloxydases

La classe des polyphénoloxydases est divisée en deux sous-groupes en fonction du substrat dont elles catalysent l'oxydation :

- hydroxylation en position ortho d'un substrat monophénolique (activité monophénoloxydase, crésolase ou tyrosinase)
- oxydation d'un diphénol en benzoquinone (activité diphénoloxydase, également appelée laccase, et spécifiquement catécholase lorsqu'il s'agit *o*-diphénol).

Ces deux réactions utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat. Lorsque ces deux activités enzymatiques sont simultanément observées dans les plantes, le ratio activité monophénoloxydase sur diphénoloxydase est généralement de 1/10 et peut aller jusqu'à 1/40 (**Nicolas *et al.*, 1994**). Les différentes affinités relatives pour les substrats mono- et di- phénoliques observées pour une même enzyme est attribué à l'existence de sous-unités dont les propriétés chimiques, physiques et cinétiques varient et peuvent ainsi conférer à une même enzyme des activités mono- et diphénoloxydase.

2.3.1. Les différents sous-groupes de PPO

2.3.1.1. Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monoxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (**Varoquaux, 1978**), et un peu plus récemment dans la pomme (**Nicolas *et al.*, 1994**).

2.3.1.2. Activité catécholoxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoïdines comme le montrent les **figures 9 et 10**. La **figure 10** montre plus spécifiquement comment l'activité tyrosinase, évoquée précédemment, englobe l'activité monophénoloxydase et catécholoxydase.

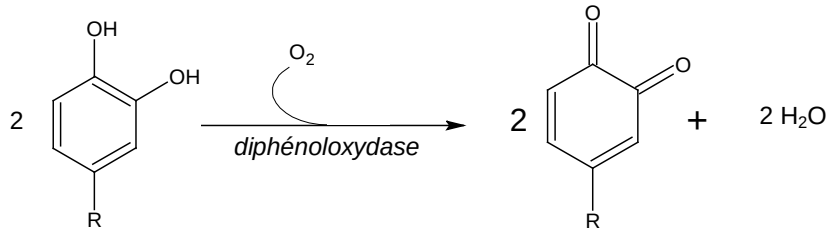


Figure 9 : Formation des quinones catalysée par la diphénoloxydase en présence d'oxygène.

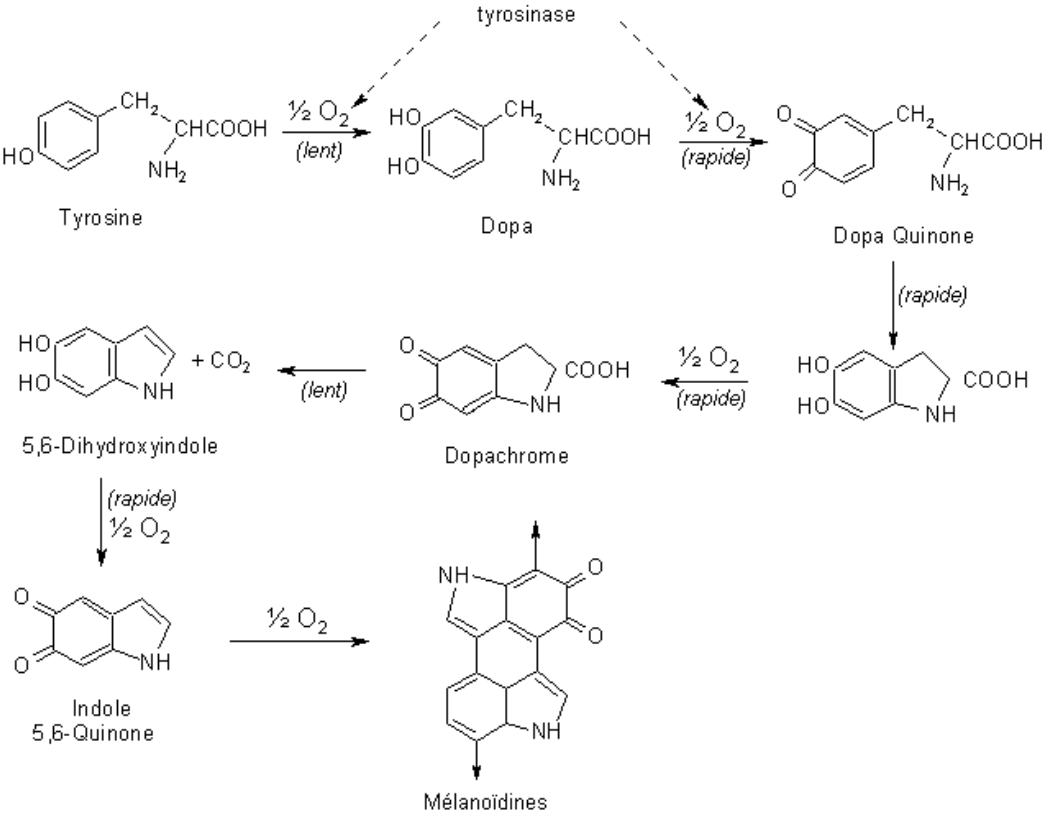


Figure 10 : Formation des mélanoidines à partir de la tyrosine (adapté de Lerner, 1953).

2.3.1.3. Activité laccase (E.C. 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité *p*-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité *o*-diphénoloxydase. L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme ping-pong (**Reinhammar et Malmström, 1981**). Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phyto-pathogènes et dans certaines plantes mais on ne trouve pas de laccase dans les fruits et légumes à part dans les pêches (**Harel *et al.*, 1970**) et les abricots (**Dijkstra et Walker, 1991**).

On peut distinguer les *o*- des *p*- diphénoloxydases en fonction de leurs spécificités de substrats et d'inhibiteurs. Un taux d'oxydation différent pour le cuivre du site actif ainsi que les différences des mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique peuvent en partie expliquer les taux différents d'inhibition de ces deux enzymes pour un même inhibiteur. Par exemple, la laccase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone, la phénylhydrazine ou le 2,3-naphtalènediol qui sont de puissants inhibiteurs de la catécholoxydase (**Keilin et Mann, 1940**).

Un résumé de ces différentes activités PPO est présenté en **figure 11**. Dans un souci de simplification, le terme PPO sera utilisé pour toutes les activités enzymatiques décrites ci-dessus.

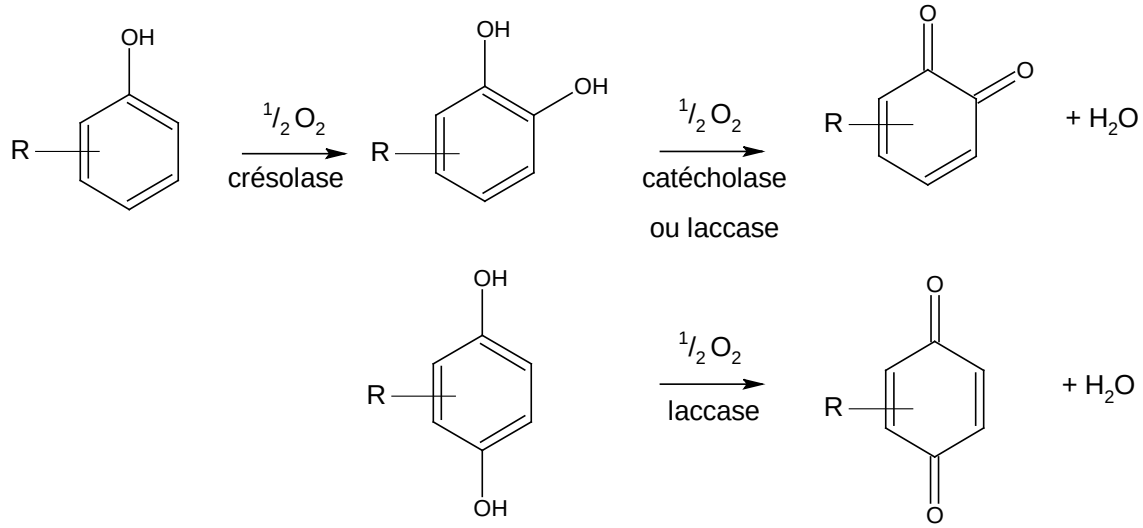


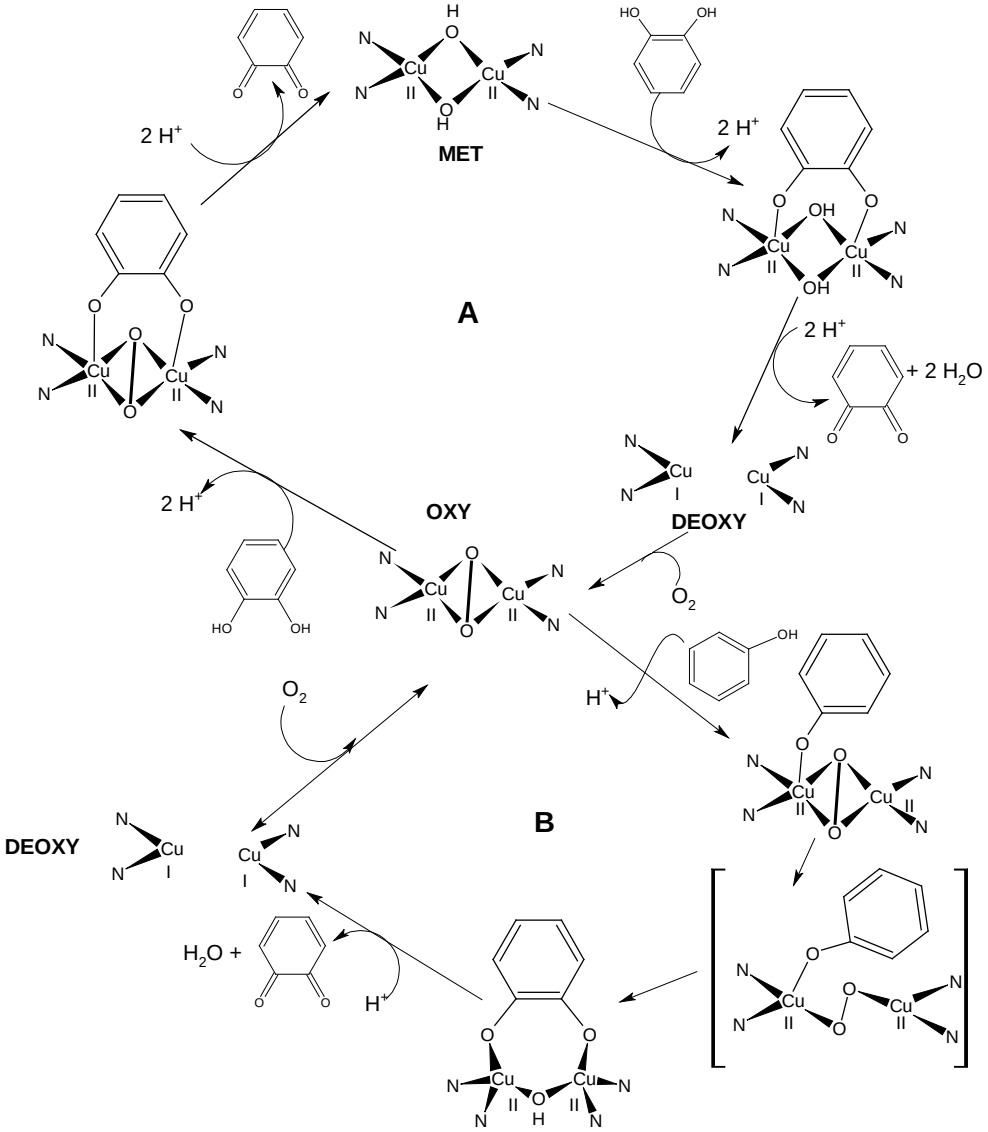
Figure 11 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases

2.3.2. Mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les tyrosinases d'origines fongiques. D'après **Sanchez-Ferrer *et al.* (1995)**, le site actif des tyrosinases peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (Cu^{I}-Cu^{I}), *oxy* (Cu^{II}-O_2-Cu^{II}) et *met* (Cu^{II}-Cu^{II}). La forme *met* est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (**figure 12**). *In vivo*, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme *met*, incapable de fixer l'oxygène moléculaire (**Lerch, 1981**). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par **Cabanes *et al.* (2002)**. Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les tyrosinases soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols catalysée par les tyrosinases suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence (**Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995**). Cette phase de latence peut être supprimée par un faible ajout d'*o*-diphénols (**Espin et Wichers, 1999**)

Le modèle des mécanismes réactionnels des tyrosinases incluant l'activité catécholase (**figure 12, cycle A**) et crésolase **(figure 12, cycle B**) est basé sur des informations quant à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre binucléaire et sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (**Lerch, 1995**). Les formes *oxy* peuvent réagir avec les mono- et les di- phénols tandis que la forme *met* ne peut réagir qu'avec les diphénols. Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des *o*-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (**Rodriguez-Lopez *et al.*, 1992**)

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme *oxy* semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des PPO pour les mono-phénols (**Eicken *et al.*, 1999**). L'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (**Janovitz-Klapp *et al.*, 1989**). Pour les laccases, le mécanisme est différent puisqu'il s'agit d'un mécanisme ping-pong avec formation de radicaux semi-quinones et d'eau. Par la suite, il y a dimérisation de deux semi-quinones pour donner une quinone et le phénol d'origine ou un dimère phénolique.



<u>Figure 12</u> : Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la tyrosinase (d'après Lerch, 1995)

2.3.3. Caractéristiques du site actif

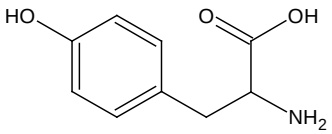
La structure cristallographique des PPO n'a pas été élucidée. Cependant, on peut supposer que les tyrosinases, les hémocyanines (protéine oligomérique servant au transport de l'oxygène chez les invertébrés, dont le site actif contient du cuivre) et les catécholoxydases possèdent des sites actifs de structures comparables. En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (**Della Longa *et al.*, 1996**). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (**Himmelwright *et al.*, 1980**), et des similitudes de séquence primaires (**Van Gelder *et al.*, 1997**). Par ailleurs, les hémocyanines montrent une activité catécholoxydase après traitement au SDS ou par une protéase (**Jaenicke et Decker, 2004**).

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la tyrosinase comme une sphère hydrophile délimitée par 4 hélices α contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile est située dans une poche hydrophobe formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des tyrosinases est maintenue par des forces électrostatiques ou par des interactions ioniques.

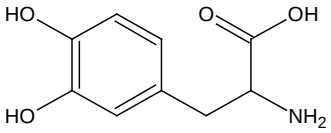
Une autre caractéristique du site actif des tyrosinases est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (**Lerch, 1982)**. Une telle liaison covalente cystéine-histidine est également raportée dans la catécholoxydase de patate douce (*Ipomea batatas* - **Klabunde *et al.*, 1998**). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des *o*-diphénols et permet ainsi un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox.

2.3.4. Substrats phénoliques et spécificité enzymatique

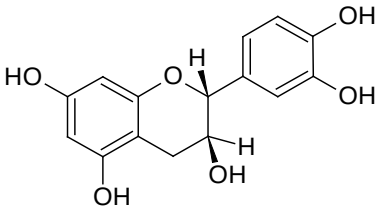
Les substrats phénoliques qui participent à la couleur, l'astringence, l'amertume et au goût des fruits et légumes, comportent un noyau aromatique porteur d'un ou plusieurs groupe(s) hydroxyle. La composition en polyphénols dans les végétaux varie selon l'espèce, le cultivar, la maturité, les conditions de culture et de stockage. La **figure 13** présente les structures des composés phénoliques substrats les plus courants des PPO. Les dérivés de l'acide caféique, tels que l'acide chlorogénique, sont souvent cités comme étant les composés *o*-diphénols majoritaires dans les végétaux où ils sont présents sous forme glycosylés. Il faut alors noté que les monophénols tels que l'acide sinapique ou l'acide syringique forment alors des semi-quinones.



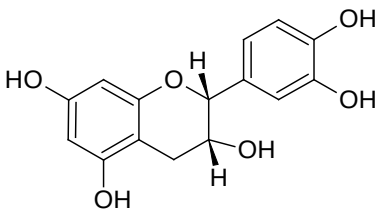
tyrosine



Dopa (3,4 dihydroxyphénylalanine)



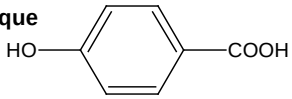
(+) catéchine



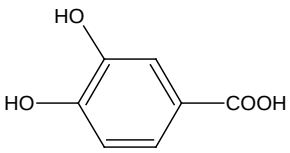
(-) épicatéchine

Série des acides benzoïques

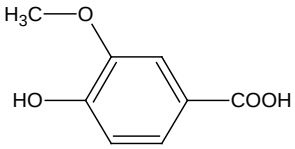
acide *p*-hydroxybenzoïque



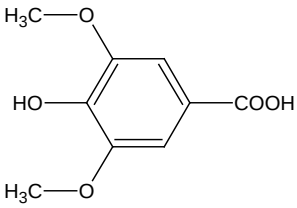
acide protocatéchique



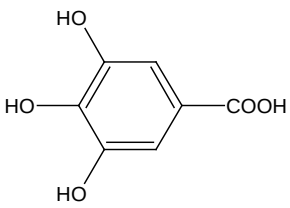
acide vanillique



acide syringique

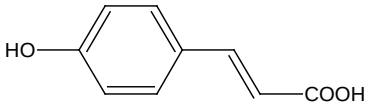


acide gallique

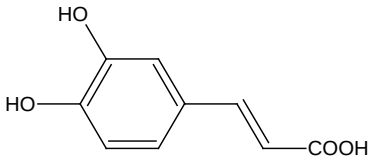


Série des acides cinnamiques

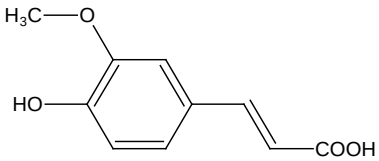
acide *p*-coumarique



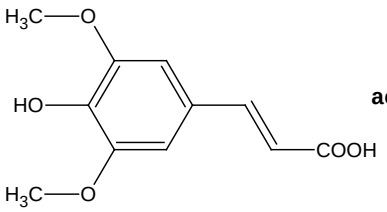
acide caféique



acide férulique



acide sinapique



acide chlorogénique

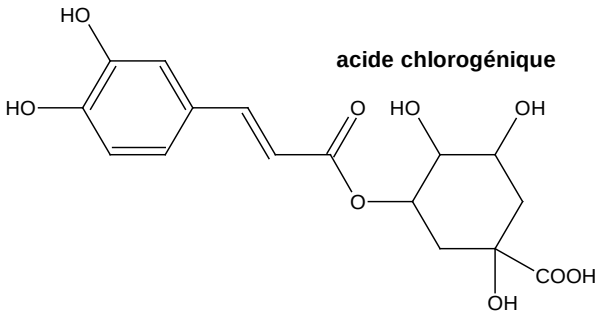


Figure 13 : Structures de composés phénoliques substrats des polyphénoloxydases

L'acide chlorogénique, dont la biosynthèse est effectuée à partir de la phénylalanine (**Villegas et Kojima, 1986**) représente environ 90 % de la teneur en phénols des tubercules de pomme de terre. D'après le schéma de la coupe longitudinale d'un tubercule de pomme de terre selon **Reeve *et al.*** (**1969**) les composés phénoliques sont majoritairement distribués entre le cortex et la peau (**figure 14**). Environ 50 % des composés phénoliques sont localisés dans la peau et les tissus proches tandis que leur concentration décroît depuis l'extérieur vers l'intérieur des tubercules de pomme de terre (**Hasegawa *et al.*, 1966**).

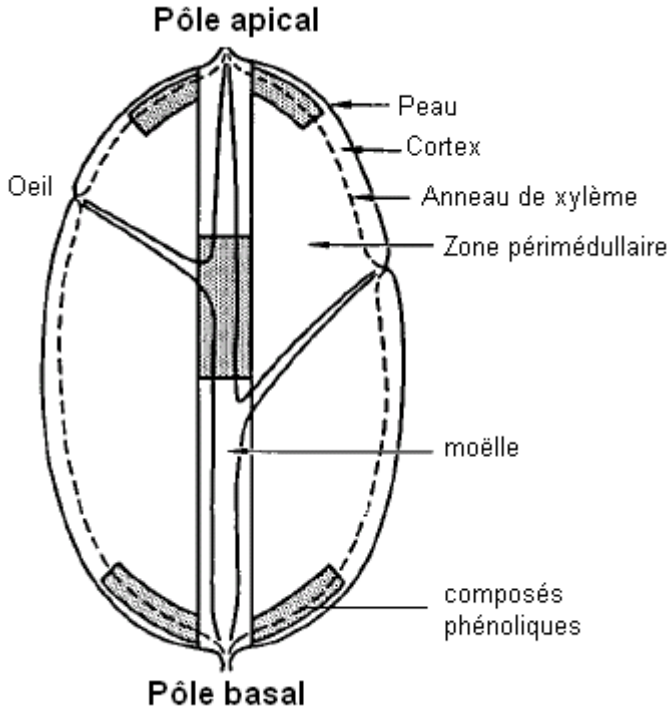


Figure 14 : Coupe longitudinale de tubercule de pomme de terre (adapté de Reeve *et al.*, 1969)

La spécificité de substrat des PPO varie selon la source végétale de la PPO. Les composés phénoliques endogènes sont responsables des réactions de brunissement enzymatique des fruits et légumes lors de leurs transformations. La relation entre le brunissement et la teneur en composés phénoliques et l'activité PPO a été établie dans différents fruits tels que les pommes (**Coseteng et Lee, 1987**), les raisins (**Lee et Jaworski, 1988**) et les pèches (**Lee *et al.*, 1990**). Le **tableau 4** présente les substrats phénoliques de quelques PPO de différentes origines végétales.

Tableau 4 : Substrats phénoliques de PPO de différentes origines végétales

Source	Substrats phénoliques
Aubergine	Acides chlorogénique, caféique, coumarique et dérivés de l'acide cinnamique
Pomme	Acide chlorogénique, catéchol, catéchine, acide caféique, DOPA, acide 3,4-dihydroxybenzoïque, *p*-crésol, acide *p*-coumarique
Pomme de terre	Acides chlorogénique et caféique, catéchol, DOPA, *p*-crésol, acides *p*-hydroxyphénylpropionique et *p*-hydroxyphénylpyruvique, *m*-crésol
Champignon	Tyrosine, catéchol, DOPA, dopamine, adrénaline, noradrénaline
Salade	Tyrosine, acide caféique et dérivés de l'acide chlorogénique
Café	Acides chlorogénique et caféique

Si certains composés phénoliques sont des substrats de la PPO, d'autres peuvent être des inhibiteurs de cette même enzyme. Différents acides cinnamiques sont des analogues de substrats et ainsi de bons inhibiteurs compétitifs de la PPO de pomme. Leur pouvoir inhibiteur décroît dans le sens suivant : acide cinnamique > acide *p*-coumarique > acide férulique > acide benzoïque (**Janovitz-Klapp *et al.*, 1990 ; Walker et Ferrar, 1995**).

2.4. Prévention du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique ne se produit que lorsque les tissus sont endommagés par la coupe, le tranchage ou le broyage : les vacuoles contenant les substrats phénoliques sont rompues et ces derniers sont ainsi mis en contact avec la PPO cytoplasmique. Le taux de brunissement enzymatique dépend de la quantité de PPO active dans les tissus, de la teneur en polyphénols, du pH, de la température et de la disponibilité en oxygène.

Beaucoup d'études ont eu pour but d'inhiber le brunissement enzymatique et plusieurs techniques essayant d'éliminer les composés responsables de ce brunissement (oxygène, enzyme, cuivre, substrat), ont été développées :

- L'élimination de l'oxygène à la surface des fruits et légumes retarde le brunissement enzymatique. Cependant, le brunissement reprend rapidement au moment de l'exposition à l'oxygène. L'exclusion de l'oxygène est possible par immersion dans l'eau, du sirop, ou par traitement sous –vide.
- Le groupe prosthétique des PPO est indispensable à la catalyse enzymatique. Certains agents chélateurs sont efficaces pour piéger le cuivre et le rendre inutilisable pour la catalyse.
- L'inactivation de la PPO par des traitements thermiques (tel que la décoloration) est effectivement appliquée pour contrôler le brunissement des fruits et légumes de conserves ou surgelés. Cependant, les traitements thermiques ne peuvent être utilisés pour la commercialisation des fruits et légumes frais.
- La modification des substrats phénoliques de la PPO peut également empêcher le brunissement enzymatique.

D'autres techniques plus récentes comme par exemple les « killer enzymes » ou les radiations ionisantes ont été proposées comme traitement alternatif aux traitements thermiques et aux traitements chimiques (**Nicolas et Billaud, 2006**).

2.4.1. Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique

2.4.1.1. Le chauffage

Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais.

Les températures appliquées lors du blanchiment varient considérablement en fonction du végétal à traiter et des enzymes à inactiver. En général, une exposition des PPO à des températures de l'ordre de 70-90 °C entraîne la destruction de leur activité catalytique (**Vámos-Vigyázó, 1981**). Les profils d'inactivation thermique d'enzymes importantes des fruits et légumes suivent une cinétique d'ordre un. Un exemple de ces profils est

présenté en **figure 15** pour la fraction thermostable d'enzymes de pomme de terre. De cette figure, il apparaît qu'à des températures faibles, des temps longs sont nécessaires pour réduire de 90 % les activités enzymatiques. Le temps nécessaire à l'inactivation complète de PPO varient considérablement selon le végétal à traiter, mais souvent un blanchiment à 100 °C pendant 3 min ou à 94 °C pendant 5 min apparaît suffisant pour limiter le brunissement enzymatique des végétaux (**Ma *et al.*, 1992**).

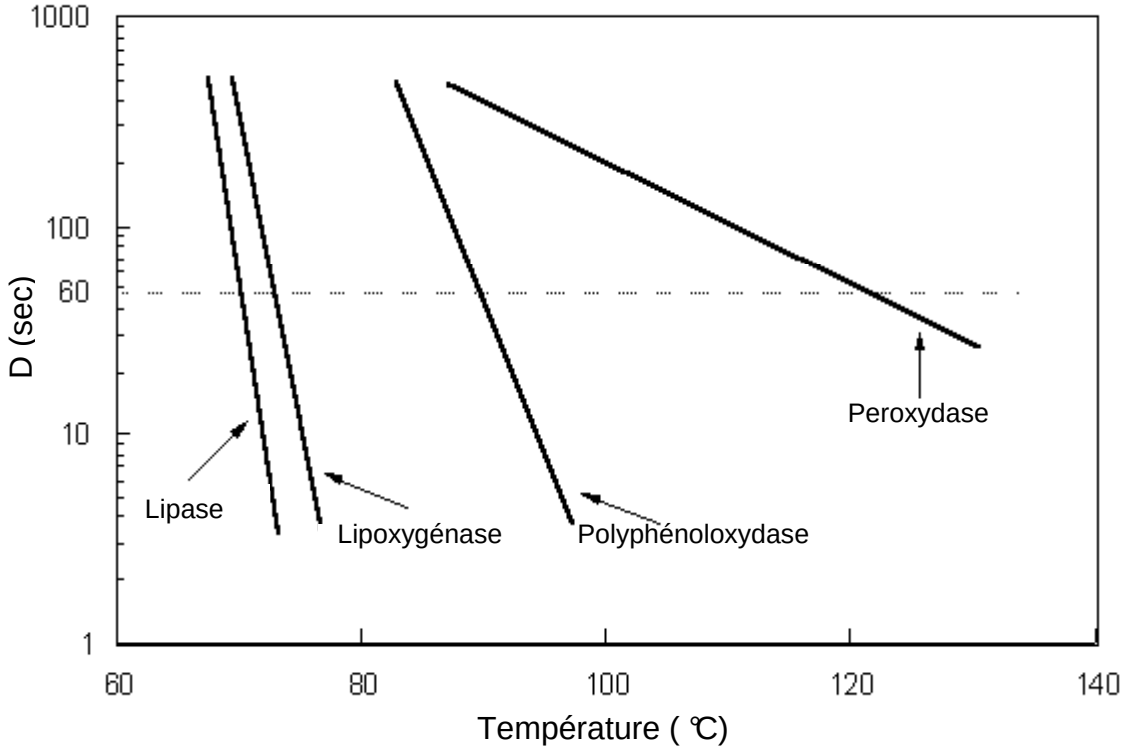


Figure 15 : Inactivation thermique de la fraction thermostable de la lipase, lipoxygénase, polyphénoloxydase et peroxydase de pomme de terre (d'après Svensson, 1977)

Bien que très efficaces, le blanchiment nuit à la qualité des produits en provoquant des pertes en vitamines, arômes, couleurs, texture, sucres et autres composés hydrosolubles.

2.4.1.2. La congélation

Des températures inférieures à – 18 °C sont utilisées pour la conservation longue durée des aliments. Les mécanismes d'inactivation des enzymes par la congélation peuvent être expliqués par différentes hypothèses : augmentation de la concentration en inhibiteurs du fait de la diminution de la quantité d'eau disponible à l'état liquide (**Tappel, 1966**), de modifications du pH ou encore des groupements thiols (**Fennema, 1975**). De la même façon que pour l'inactivation des enzymes par chauffage, ce procédé présente

des inconvénients et provoque notamment des changements de texture. De plus, la congélation fragilise les structures membranaires des cellules et facilite ainsi le brunissement enzymatique lors de la décongélation des produits.

2.4.1.3. La déshydratation

La teneur en eau influence très fortement les activités enzymatiques : celles-ci diminuent généralement avec un abaissement de l'activité de l'eau. La déshydratation a des effets variés sur les enzymes en raison des réponses différentes en fonction de la concentration des solutés. Les sucres et les protéines ont en général un effet protecteur contre l'inactivation enzymatique.

La lyophilisation permet d'éliminer l'eau d'un produit congelé. Ainsi, ce procédé inhibe les réactions chimiques et biochimiques indésirables tout en minimisant la perte en composés aromatiques. La congélation rapide minimise le brunissement enzymatique et produit des aliments de bonne qualité (**Fang et Chiang, 1975**).

2.4.1.4. Autres traitements utilisés pour contrôler le brunissement enzymatique

L'irradiation est de plus en plus reconnue comme une méthode pour diminuer les pertes après récolte tout en assurant une bonne qualité hygiénique des aliments et facilitant leur commercialisation à large échelle. Le brunissement des tubercules de pomme de terre et de fruits tropicaux après irradiation aux rayons gamma a été largement étudié par **Thomas** (**1984** ; **1986**). Ces rayons inhibent la germination des tubercules de pomme de terre et ont un effet sur les substrats phénoliques (**Pendharkar et Nair, 1987**). Cependant une irradiation trop forte des produits peut entraîner la rupture des membranes et la libération de PPO. Par ailleurs, les radicaux libres produits par des radiations ionisantes peuvent réagir avec d'autres composés alimentaires et entraîner des effets secondaires tels que le brunissement des tissus, l'oxydation des lipides et des pertes vitaminiques.

Les traitements par hautes pressions peuvent induire des inactivations réversibles ou irréversibles des activités enzymatiques. La perte en activité catalytique du fait des hautes pressions varie selon l'enzyme, la nature des hautes pressions, la température et la durée du traitement (**Cheftel, 1992**). Cependant, la PPO est relativement résistante aux traitements par les hautes pressions : des pressions de 5 et 7 kbar sont nécessaires à l'inactivation de la PPO de pomme à pH 4,5 et 5,4 respectivement (**Nicoli *et al.*, 1994**).

Les traitements au dioxyde de carbone supercritique se sont montrés efficaces pour inactiver les PPO. Par exemple, la PPO de pomme de terre présente une perte d'activité dépendante du temps de traitement à 43 °C avec du dioxyde de carbone à 58 atm (**Chen *et al.*, 1992**).

L'ultrafiltration pour contrôler le brunissement enzymatique en remplacement des sulfites a été étudiée plus particulièrement en vinification par les équipes de **Sims** (**1989 ; 1990**) et de **Goodwin et Morris** (**1991**).

La combinaison des traitements thermiques avec des ultrasons peut également contribuer à l'inactivation enzymatique. Lorsqu'il est appliqué en milieu liquide, le traitement par ultrasons entraîne la formation de bulles dont les interfaces changent continuellement de forme et de taille. Les ondes acoustiques peuvent affecter les structures enzymatiques et ainsi promouvoir la dénaturation des enzymes (**El'piner *et al.*, 1965**).

2.4.2. Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut être inhibé en ciblant l'enzyme, les substrats (oxygène et polyphénols) ou les produits de la réaction. L'utilisation d'inhibiteurs du brunissement enzymatique ne peut se concevoir que s'ils n'ont aucun effet toxique et ne modifient pas le goût ni la couleur des produits, et évidemment si le surcoût économique est supportable. **Mc Evily *et al.* (1992)** classent les inhibiteurs de la PPO en six catégories (**tableau 5**) : les agents réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexants, les inhibiteurs d'enzyme, les traitements enzymatiques.

Tableau 5 : Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily *et al.*, 1992)

Agents réducteurs	sulfites et dérivés acide ascorbique et analogues cystéine et glutathion
Agents chélateurs	phosphates EDTA acides organiques
Acidifiants	acide citrique acide phosphorique
Inhibiteurs d'enzyme	acides carboxyliques aromatiques alcools aliphatiques anions peptides résorcinols substitués
Traitements enzymatiques	oxygénases *o*-méthyltransférase protéases
Agents complexants	cyclodextrines

2.4.2.1. Inhibition ciblant l'enzyme

Mayer et Harrel (1979) ont classé les inhibiteurs qui agissent directement sur la PPO en deux groupes. Le premier groupe est celui des agents chélateurs de métaux, tels que les ions azoture, cyanure, halogénés et la tropolone. Le chlore (Cl^-) est un inhibiteur non compétitif de la PPO de pomme alors que d'autres composés halogénés ont montré une inhibition compétitive. Le second groupe d'inhibiteurs consiste en analogues de substrats : ces acides carboxyliques de la série des acides benzoïque et cinnamique sont des inhibiteurs compétitifs de la PPO (**Janovitz-Klapp *et al.*, 1990**).

2.4.2.2. Inhibition ciblant les substrats

L'élimination de l'oxygène est sans doute le moyen le plus efficace pour prévenir l'oxydation des polyphénols par la PPO. Cependant, la suppression totale de l'oxygène favorise le métabolisme anaérobie entraînant l'apparition d'arrière-goût (**Ballantyne *et al.*, 1988**). L'emballage sous vide d'air de pommes de terre pelées augmente leur date limite de consommation. Cependant, le brunissement enzymatique se produit rapidement dès l'exposition à l'oxygène lors de l'ouverture de l'emballage (**Langdon, 1987**).

Certains adsorbants, qui se complexent avec les substrats phénoliques peuvent également être utilisés pour l'élimination des substrats phénoliques des aliments. L'utilisation des cyclodextrines à cet effet fait l'objet d'un brevet (**Hicks *et al.*, 1990**) : les cyclodextrines possèdent une cavité hydrophobe capable de complexer les polyphénols (**Sapers *et al.*, 1989**). Cependant, la capacité de piégeage des cyclodextrines dépend de la nature des cyclodextrines et de celle des polyphénols (**Fayad *et al.*, 1997**)

Les modifications enzymatiques des substrats peuvent également servir pour inhiber le brunissement enzymatique. Par exemple, l'*o*-méthyltransférase convertit les *o*-dihydroxyphénols en leurs dérivés méthoxy correspondants qui ne peuvent être utilisés comme substrats par la PPO (**Finkle et Nelson, 1963**). De la même façon, la protocatéchuate-3,4-dioxygénase purifiée de *Pseudomonas aeruginosa* empêche le brunissement enzymatique du jus de pomme en modifiant le substrat phénolique (**Kelly et Finkle, 1969**). Cependant, l'utilisation de ces enzymes n'est pas envisageable au niveau industriel en raison de leur coût.

2.4.2.3. Inhibition ciblant les produits de réaction.

Les produits d'oxydation des diphénols, les quinones, réagissent entre eux et forment des dimères phénoliques. Ces dimères s'oxydent à nouveau et forment des polymères plus ou moins bruns. L'acide ascorbique (**Hsu *et al.*, 1988**), les composés thiolés (**Henze, 1956**), les sulfites (**Sayavedra-Soto et Montgomery, 1986**) et les acides aminés (**Kahn, 1985**) sont capables d'inhiber la formation de ces dimères en réduisant les quinones en phénols ou en formant des produits d'addition incolores par exemple.

Les sulfites

Les sulfites (E 220 à 228) sont les inhibiteurs de brunissement enzymatique les plus utilisés. Le terme « sulfites » comprend l'oxyde de soufre (SO) et différentes formes inorganiques libérant de l'anhydride sulfureux ou dioxyde de soufre (SO_2 – E 220) : sulfite (SO_3^{2-}), bisulfite (HSO_3^-), métabisulfite ($S_2O_5^{2-}$). D'après **Madero et Finne (1982)**, les sulfites ont un effet inhibiteur compétitif sur la PPO en se liant à un groupement sulfhydryl du site actif. Par ailleurs, **Ferrer *et al.* (1989)** suggèrent que l'inhibition du brunissement enzymatique par les sulfites est due à la réaction des sulfites sur les quinones, formant ainsi des sulfoquinones, inhibiteurs irréversibles de la PPO et provoquant ainsi son inactivation.

Bien que les sulfites soient très efficaces, ils sont soumis à des restrictions d'utilisation en raison de leur effet toxique. Plusieurs rapports (**Prenner et Stevens, 1976** ; **Maria *et al.*, 1989** ; **Papazian, 1996**) décrivent des réactions allergiques chez des personnes asthmatiques suite à la consommation de produits traités avec des sulfites. Le JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) de la WHO (*World Health Organization*) et de la FAO (*Food and Agriculture Organization*) ainsi que la réglementation européenne recommandent une dose journalière admissible ne devant pas dépasser 0,7 mg / kg de masse corporelle de sulfite (équivalent dioxyde de soufre, SO_2). Les sulfites, actuellement utilisés sur les pommes de terre, les champignons, les pommes et autres fruits et légumes, ne sont plus dans la liste des additifs « GRAS » (*Generally Recognized As Safe*) depuis 1986, et sont soumis à étiquetage si la concentration dans le produit final excède 10 $mg.kg^{-1}$ ou 10 mg/L^{-1}. Depuis 1996, les traitements aux sulfites sont interdits sur les fruits et légumes vendus frais aux consommateurs. Les produits pouvant être sulfités font l'objet d'une liste positive où est précisée la teneur maximale en équivalent SO_2 dans le produit finit. Le **tableau 6** présente les quantités maximales de sulfites autorisées dans les aliments à base de fruits et de légumes.

<u>Tableau 6</u> : Quantités maximales de sulfites autorisées dans les aliments à base de fruits et de légumes (Dehove *et al.*, 1998)

	Quantité maximale ($mg.kg^{-1}$ ou $mg.L^{-1}$) exprimée en SO_2
Pommes de terre pelées	50
Pommes de terre transformées (y compris les pommes de terre congelées et surgelées)	100
Légumes blancs séchés	400
Légumes blancs transformés (y compris les légumes blancs congelés et surgelés)	50
Champignons transformés (y compris les champignons congelés)	50
Champignons séchés	100
Fruits séchés :	
- abricots, pêches, raisins, prunes et figues	2000
- bananes	1000
- pommes et poires	600
- autres (y compris fruits à coque)	500
Jus d'orange, de pamplemousse, de pomme et d'ananas	50
Jus de limette et de citron	350
Autres concentrés à base de jus de fruits ou de fruits broyés	250
Cidre, poiré, boissons fermentées à base de fruits, pétillantes ou non	200

Depuis la limitation de leur utilisation et l'obligation d'étiquetage, de nombreuses recherches tendent à trouver un inhibiteur du brunissement enzymatique qui soit sain, aussi efficace et peu cher que les sulfites.

<u>L'acide ascorbique</u>

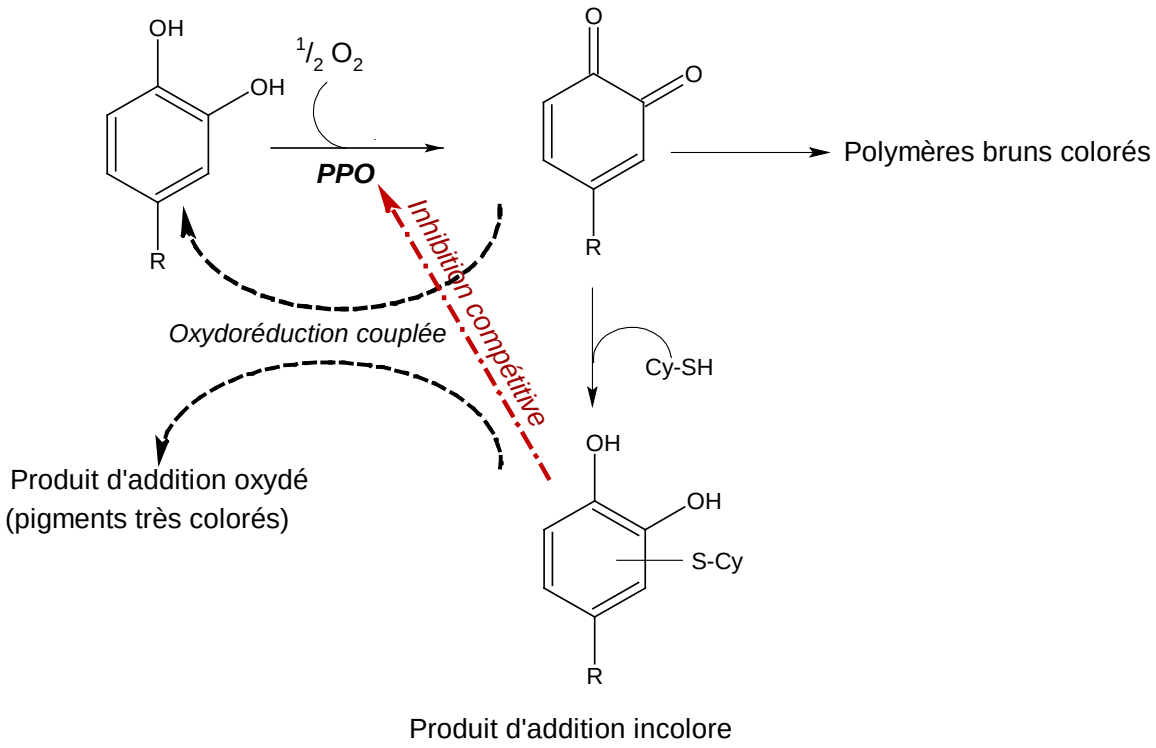
L'acide ascorbique est un agent réducteur, très hydrosoluble et dont les sels neutres sont également considérés comme sains pour inhiber le brunissement enzymatique ou d'autres réactions d'oxydation (**Bauernfeind et Pinkert, 1970**). L'acide ascorbique est également un piégeur d'oxygène libre. L'inhibition du brunissement enzymatique par l'acide ascorbique a été attribuée à la réduction des quinones en phénols initiaux. Cependant, l'acide ascorbique est alors irréversiblement transformé en acide déhydroxy-ascorbique : le brunissement enzymatique est bloqué jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'acide ascorbique. Par ailleurs, des propriétés de chélation de cuivre prosthétique de la PPO sont également attribuées à l'acide ascorbique (**Whitaker, 1972**). Ce dernier est en général utilisé en association avec l'acide citrique.

Les acides aminés, peptides et protéines

Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement l'enzyme, soit en réagissant avec les quinones (**McEvily *et al.*, 1992)**. Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu^{2+} du site actif de la PPO (**O'Sullivan, 1969**). **Kahn (1985)** compare les effets de protéines, d'hydrolysats protéiques et d'acides aminés sur l'activité *o*-dihydroxyphénolase de champignon, d'avocat et de banane par spectrophotométrie. La L-cystéine est l'acide aminé qui montre le plus fort pouvoir inhibiteur du brunissement enzymatique.

Le miel a également montré un pouvoir inhibiteur du brunissement enzymatique de tranches de pomme, de jus de raisins et de systèmes modèles (**Oszmianski et Lee, 1990**). Le brunissement des tranches de pomme est très largement inhibé par une solution à 10 % de miel. D'après les expériences de purification du composé du miel responsable de cette inhibition, il s'agit d'un peptide de 600 Da. Le mode d'action de ce peptide résiderait dans la formation de complexe stable avec le Cu^{2+} du site actif de la PPO. Le pouvoir inhibiteur du brunissement enzymatique du miel dépend largement du type de miel mais l'addition de différents miels à des broyats de pomme de terre entraîne jusqu'à 50 % de réduction de l'activité PPO et une diminution de l'indice de brunissement (**Chen *et al.*, 1998**).

La cystéine est un inhibiteur du brunissement enzymatique dont l'efficacité rivalise avec celle du métabisulfite de sodium (**Kahn, 1985**). Cependant, les concentrations en cystéine et autres composés thiolés pour lesquelles les produits sont acceptables d'un point de vue de leur couleur, sont inacceptables en raison de l'amertume de ces produits. L'inhibition du brunissement enzymatique par la cystéine est due à la formation de composés d'addition incolores dont **Richard-Forget *et al.* (1992)** ont proposé le mécanisme d'action (**figure 16**). Les adduits cystéine-quinone sont par ailleurs des inhibiteurs compétitifs de la PPO. Les composés thiolés tels que la N-acétyl-cystéine et le glutathion (sous forme réduite) sont également de bons inhibiteurs du brunissement enzymatique de la purée de pomme de terre (**Friedman *et al.*, 1992**).



<u>Figure 16</u> : Effets de la cystéine (Cy-SH) sur l'oxydation enzymatique d'*o*-diphénols (d'après Richard-Forget *et al.*, 1992)

Grâce aux nouvelles techniques de caractérisation des protéines, les connaissances des polyphénoloxydases, de leurs propriétés et des mécanismes de la catalyse enzymatique du brunissement enzymatique ont pu progresser. En revanche, malgré la multitude des traitements chimiques ou thermiques agissant contre le brunissement enzymatique, aucun substitut aux sulfites suffisamment efficace, peu cher, pratique et sans effet néfaste sur les propriétés organoleptiques du produit alimentaire n'a pu être trouvé pour servir d'alternative à ce produit dont l'innocuité est largement remise en question.

3. L'OXYDATION ENZYMATIQUE DES LIPIDES

L'oxydation des matières grasses est une réaction considérée comme néfaste à la qualité des aliments dans la majorité des cas. Elle se produit en présence d'oxygène, sans lumière (auto-oxydation), en présence de lumière (photo-oxydation) et peut être catalysée enzymatiquement (oxydation enzymatique). C'est ce dernier aspect qui a retenu notre attention.

Les lipides sont oxydés à la suite de multiples réactions enzymatiques avec tout d'abord la libération des acides gras par l'action de lipases, phospholipases, et lipide-acyl-hydrolases. Les acides gras libérés par la lipolyse peuvent ensuite être oxydés par la LOX et former des hydroperoxydes d'acide gras. Ces composés très réactifs sont ensuite transformés en aldéhydes, acides aldéhydiques et acides gras oxygénés. Un exemple de cette cascade de réactions enzymatiques est schématisé pour les acides linoléique et linolénique dans les céréales (**figure 17**, d'après **Gardner, 1988**)

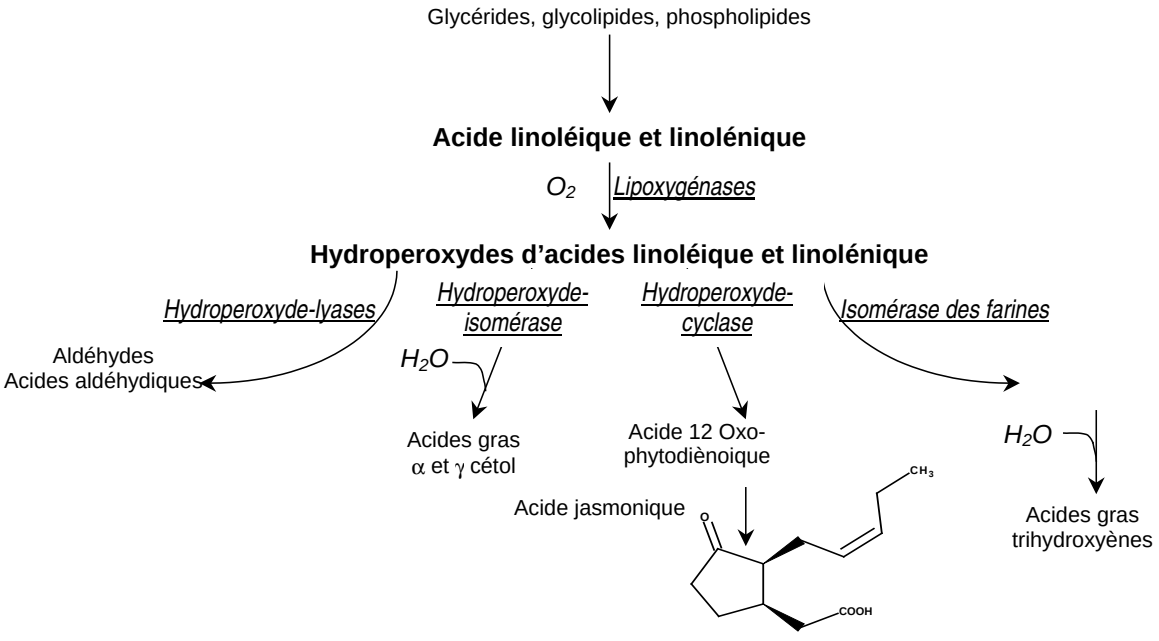


Figure 17 : Cascade de réactions enzymatiques impliquées dans l'oxydation des lipides (adapté de Gardner, 1988)

3.1. Les étapes de l'oxydation aérobie des lipides catalysée par la lipoxygénase (LOX)

La lipoxygénase (linoléate-oxygène oxydoréductase EC 1.13.11.12 - LOX) est présente dans beaucoup de plantes ainsi que chez les animaux mais c'est la LOX de soja qui a été particulièrement étudiée. La LOX catalyse l'oxydation par l'oxygène moléculaire des acides gras polyinsaturés (AGPI) porteurs de doubles liaisons non conjuguées *cis-cis*, 1-4 pentadiène avec le groupement méthylène en position ω 8, c'est-à-dire les acides gras essentiels dont les acides linoléique et linoléique sont les plus abondants. Les monohydroperoxydes ainsi formés ont la même structure que ceux obtenus lors de l'autoxydation de ces acides gras mais contrairement à la réaction d'autoxydation, les réactions catalysées par la LOX ont toutes les caractéristiques de la catalyse enzymatique : spécificité du substrat, peroxydation sélective, existence d'un pH optimum de réaction, sensibilité du processus oxydatif aux traitements thermiques et des taux de réaction élevés pour des températures comprises entre 0 et 50 °C. De plus, les énergies d'activation pour l'oxydation de l'acide linoléique sont réduites à 17-40 $kJ.mole^{-1}$ lors de la catalyse enzymatique (**Nicolas et Drapron, 1981**) par rapport à l'autoxydation (273 $kJ.mole^{-1}$)

Les voies catalytiques suivent les étapes suivantes représentées pour l'acide linolénique en **figure 18** :

- élimination stéréospécifique d'un atome d'hydrogène sur le groupe méthylène en position ω8 du substrat,
- réarrangement du radical pentadiènyl formé et lié à l'enzyme en système diène conjugué cis-trans,
- fixation d'un biradical oxygène sur le carbone ω 6 ou ω 10 (selon la spécificité de la LOX) et formation du radical peroxy,
- réduction du radical peroxy par l'enzyme et fixation d'un atome d'hydrogène.

L'hydroperoxyde ainsi formé est ensuite libéré par l'enzyme. Il est important de noter que la formation des hydroperoxydes et des radicaux libres au cours de l'oxydation enzymatique des lipides peuvent initier et favoriser l'auto-oxydation des lipides (**German et Kinsella, 1985**).

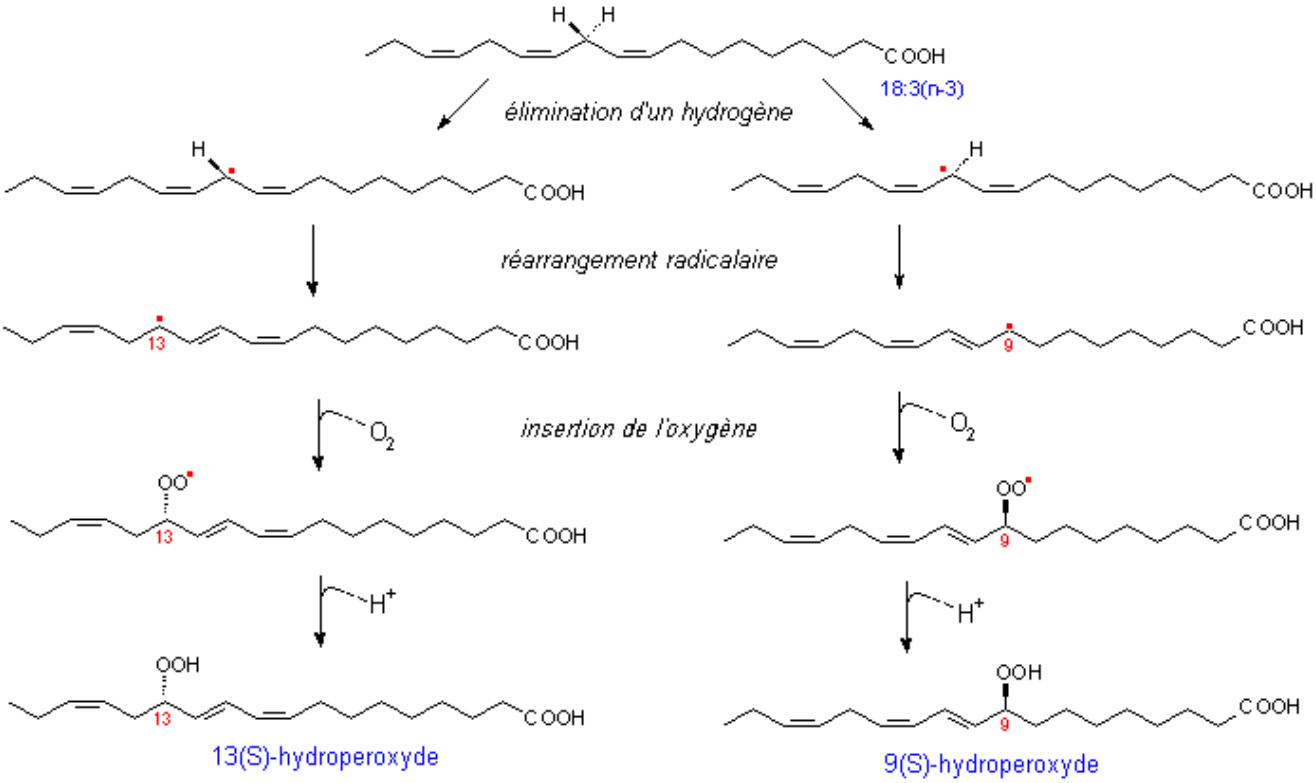


Figure 18 : Schéma des voies catalytiques de l'oxydation de l'acide linolénique en 13-hydroperoxyde et / ou 9-hydroperoxyde par la LOX

3.2. Le site actif et la spécificité d'oxydation de la LOX

3.2.1. La LOX : une enzyme à fer

Une molécule de LOX comporte un atome de fer non-hémique au site actif. Les études menées sur la LOX de soja ont permis de déterminer la structure et les caractéristiques du site actif (**figure 19**). Le fer est coordonné par le N^{ε} de trois résidus histidine et le groupe carboxyle de l'extrémité C-terminale de l'isoleucine. De plus, la chaîne latérale d'un résidu asparagine est liée faiblement au fer. Ainsi, le nombre de coordinations du fer est soit 5 soit 6 avec un ligand de type eau ou hydroxyle. Le rôle du fer dans le mécanisme de catalyse est discuté. La forme native de LOX, porte un atome de Fe(II) devant être oxydé en Fe(III) par les produits de réactions (hydroperoxydes lipidiques ou peroxyde d'hydrogène) pour permettre la catalyse de la réaction.

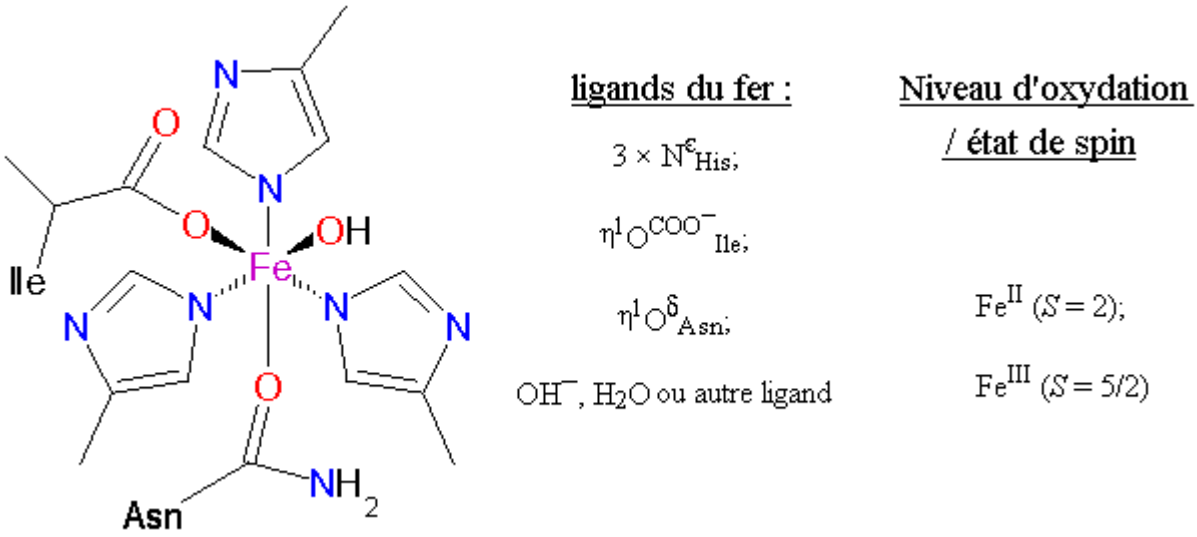


Figure 19 : Schéma et caractéristiques de la structure du groupement prosthétique de la LOX de soja (adapté de Skrzypczak-Jankun *et al*., 1997)

Selon **Gardner (1988)**, l'enzyme activée arrache l'hydrogène du groupe méthylène de l'AGPI avec réduction du fer. En milieu aérobie, suit alors l'étape d'oxydation par l'oxygène moléculaire, puis le transfert d'électron de Fe(II) pour former l'hydroperoxyde après dissociation de l'enzyme et protonation (**figure 20**). **Tejero *et al.*** (**2004**) décrivent le mécanisme d'arrachage de l'hydrogène comme un processus en une étape de transfert concerté d'électron et de proton entre le substrat et l'atome de fer **(figure 21)**.

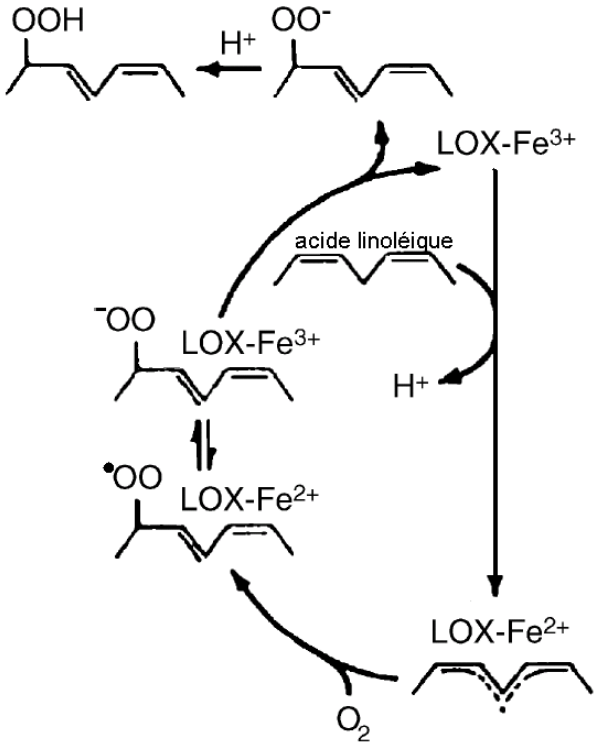
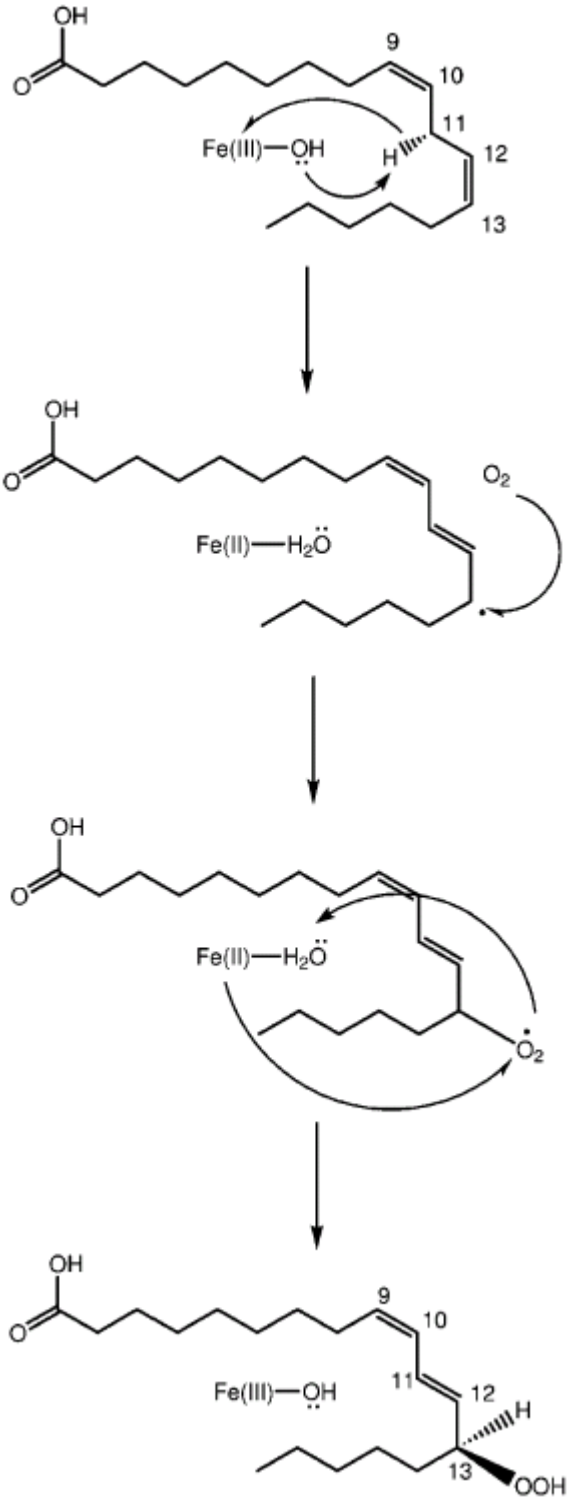


Figure 20 : Voies réactionnelles de l'oxydation des lipides catalysée par la LOX en milieu aérobie (adapté de Gardner, 1988)



<u>Figure 21</u> : Mécanisme de l'oxydation de l'acide linoléique par la LOX – Implication du fer du site actif (d'après Tejero *et al*., 2004)

3.2.2. Le site actif et la spécificité de la LOX

Les structures tridimensionnelles de différentes isoformes de la LOX de soja sont connues (**Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1997** ; **Minor *et al.*, 1996** ; **Youn *et al.*, 2006**). L' extrémité N-terminale porte un domaine de 8 chaînes peptidiques antiparallèles en feuillets β. L'extrémité C-terminale, contenant le site actif, consiste en hélices α et en deux feuillets β. Les deux hélices centrales se croisent au site actif et lui apportent les ligands histidine du fer. Deux cavités (cavités I et II) dans la LOX-1 de soja se prolongent à la surface du site actif. La cavité I, en forme d'entonnoir, pourrait jouer le rôle de piégeur de dioxygène tandis que la cavité II, plus longue, serait le lieu de fixation du substrat lipidique. Dans la LOX-3 de soja, il existe une troisième cavité allant du fer du site actif à l'interface entre les feuillets β et le domaine catalytique. La cavité III, le fer et la cavité II forment un passage continu à travers la protéine (**Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1997**)

Les deux étapes de la catalyse enzymatique sont indépendamment spécifiques (formation de 9 ou 13 hydroperoxydes à partir de l'acide linoléique par exemple). La suppression d'un hydrogène des AGPI se fait sélectivement, de même que l'insertion de l'oxygène sur le radical d'acide gras. Par conséquent, lors de l'arrachage de l'hydrogène en position C_{11} sur l'acide linoléique, l'oxygène moléculaire peut être introduit en position (+2) ou (-2) entraînant l'insertion du dioxygène en C_{13} ou C_9. L'orientation du substrat est une étape déterminante dans la position de l'insertion du dioxygène qui conduit à des régio-spécificités variables des différentes isoenzymes. D'après **Gardner (1991)**, dans le cas des 13-LOX, le substrat entre dans la cavité II par son extrémité méthylée, alors que le substrat est en position inverse dans la 9-LOX. A ce modèle s'ajoute l'hypothèse « spatiale » selon laquelle le positionnement spécifique de l'oxygène dépend de la profondeur de la poche du site actif. Ces deux modèles se complètent pour expliquer la régiospécificité de l'oxydation, l'orientation du substrat étant déterminée par l'espace disponible au site actif (**Liavonchanka et Feussner, 2006**).

Pour une meilleure compréhension du positionnement spécifique de l'oxydation de l'acide linoléique par les lipoxygénases végétales, des expériences de modélisation des sites actifs ont été réalisées plus particulièrement sur les LOX de soja (**Minor *et al.*, 1996** ; **Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1997** ; **Skrzypczak-Jankun *et al.*, 2001**). Ces études montrent que le résidu arginine situé au voisinage du site actif pourrait interagir avec le groupe carboxyle du substrat dans le cas d'une inversion du substrat dans le site actif (9-LOX). Par ailleurs dans les 13-LOX, des résidus phénylalanine et histidine pourraient faire écran à la charge positive de l'arginine et permettraient au substrat d'entrer dans le site actif par son extrémité méthylée. En résumé, l'espace au sein du site actif et l'orientation du substrat dans le site actif sont déterminants de la

position d'insertion de l'oxygène dans le cas des LOX végétales. Ces paramètres sont modifiés par des facteurs additionnels tels que la concentration en substrat lipidique (**Kühn *et al.*, 1990**), l'état physico-chimique du substrat (**Began *et al.*, 1999**), la concentration en oxygène, la température et le pH du milieu (**Nicolas et Drapron, 1981**).

3.3. La spécificité de substrat de la LOX et les réactions enzymatiques catalysées

En plus des AGPI contenant un système (1Z,4Z)-pentadiènyl, les LOX peuvent catalyser l'oxydation d'autres substrats tels que les cétones porteuses d'un groupe allyle. Par exemple, le dérivé cétonique de l'acide ricinoléique : le 12-(céto)-9Z-octadécénoate de méthyle, qui ne contient pas de système 1,4-pentadiène est un substrat de la LOX de soja pouvant aboutir à la formation d'acides gras insaturés dicétoniques ou à la formation d'acides gras C-13 ω-cétoniques correspondants (**Kühn *et al.*, 1991**).

Des études montrent également que, outre les acides gras libres, les LOX peuvent oxyder des esters d'acides gras tels que les phospholipides (**Brash *et al.*, 1987**), des triglycérides (**Holtman *et al.*, 1997**) et même des structures plus complexes contenues dans les membranes cellulaires (**Maccarrone *et al.*, 1994**)

3.4. Rôles physiologiques de l'oxydation lipidique catalysée par la LOX dans les végétaux

3.4.1. Rôle de l'oxydation des lipides lors de la germination des graines

La germination induite par des modifications des propriétés physico-chimiques des graines, accroît la valeur nutritionnelle et la disponibilité des substances alimentaires. Lors de la germination, les lipides de stockage, principalement sous forme de triacylglycérols, sont transportés vers les glyoxysomes, où ils sont dégradés par le système de β-oxydation pour former l'acétyl-CoA. Cependant, une alternative à ce métabolisme peut être proposée en impliquant la LOX (**Roshal, 1996**). Ces mécanismes ont été étudiés sur des glyoxysomes de cotylédon de tournesol et de concombre (**Gerhardt *et al.*, 2005**). Après la rupture des membranes de l'oléosome, la LOX exprimée au cours des premières étapes de la germination, catalyse l'oxydation des

acides linoléiques portés par les triglycérides. Par la suite, ces acides gras oxygénés sont libérés et peuvent ensuite être dégradés par β–oxydation dans les glyoxysomes. Cependant, la présence d'oxygène sur le carbone 13 de l'acide gras empêche l'oxydation d'être complète : la β-oxydation est réduite à deux cycles et entraîne la formation de 2 moles d'acétyl-CoA par mole d'acide gras oxygéné.

3.4.2. Rôle de l'oxydation des lipides dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes

Il y a plusieurs éléments montrant l'implication de la LOX dans les mécanismes de défense des végétaux. Par exemple, la suppression du gène codant pour la LOX de la feuille de tabac entraîne la perte de résistance de cette plante vis-à-vis du parasite *Phytophthora parasitica var. nicotiana* (**Rancé *et al.*, 1998**). Les composés issus de l'oxydation enzymatique des acides gras sont évoqués pour expliquer ces phénomènes de résistance aux pathogènes végétaux. Ainsi, les hydroperoxydes d'acides gras sont les précurseurs de diverses molécules telles que les cétodiènes observés dans des feuilles d'Arabidopsis infectées (**Vollenweider *et al.*, 2000**) ou d'aldéhydes produits lors de l'attaque de feuilles de haricot vert par *Pseudomonas* (**Croft *et al.*, 1993**). Ces composés, issus de l'oxydation enzymatique des lipides, sont suspectés d'agir comme des agents antipathogènes du fait de leur très haute réactivité (**Almeras *et al.*, 2003**) et auraient des activités proches des phytoalexines (**Weber *et al.*, 1999**).

3.4.3. L'oxydation des lipides, production d'acide jasmonique et la sénescence cellulaire

Si l'implication de la LOX dans la régulation de la sénescence cellulaire *via* la biosynthèse de l'acide jasmonique n'a pas encore été démontrée, plusieurs études (**Croft *et al.*, 1993** ; **He *et al.*, 2002**) montrent que ce produit ainsi que d'autres produits issus de l'oxydation enzymatique des lipides jouent un rôle dans l'induction de la sénescence cellulaire (**Op den Camp *et al.*, 2003**).

Une autre hypothèse suggère l'action directe de la LOX lors des étapes finales de la mort cellulaire par une action de la 13-LOX de type 2 sur les membranes plastidiques (**Feussner et Wasternack, 1998**). De plus, il a été démontré que le niveau d'expression de certaines LOX est plus élevé dans les feuilles sénescentes d'*Arabidopsis* (**He *et al.*, 2002**).

3.5. Effets de l'oxydation enzymatique des lipides dans les aliments

3.5.1. Production de composés d'arômes désagréables

Que ce soit dans des pains supplémentés en farine de fève ou de soja (**Gardner, 1988**), dans les fruits et légumes (**Perez-Gilabert *et al.*, , 2001**) ou lors du maltage et du stockage de la bière (**Billaud *et al.*, 1997**), l'oxydation des lipides entraîne la formation de composés d'arômes (hexanol, pentanol, hexanal, trans-2-octénal, trans-2-nonénal, 2,4-décadiénal) dont certains sont responsables du goût de « carton ».

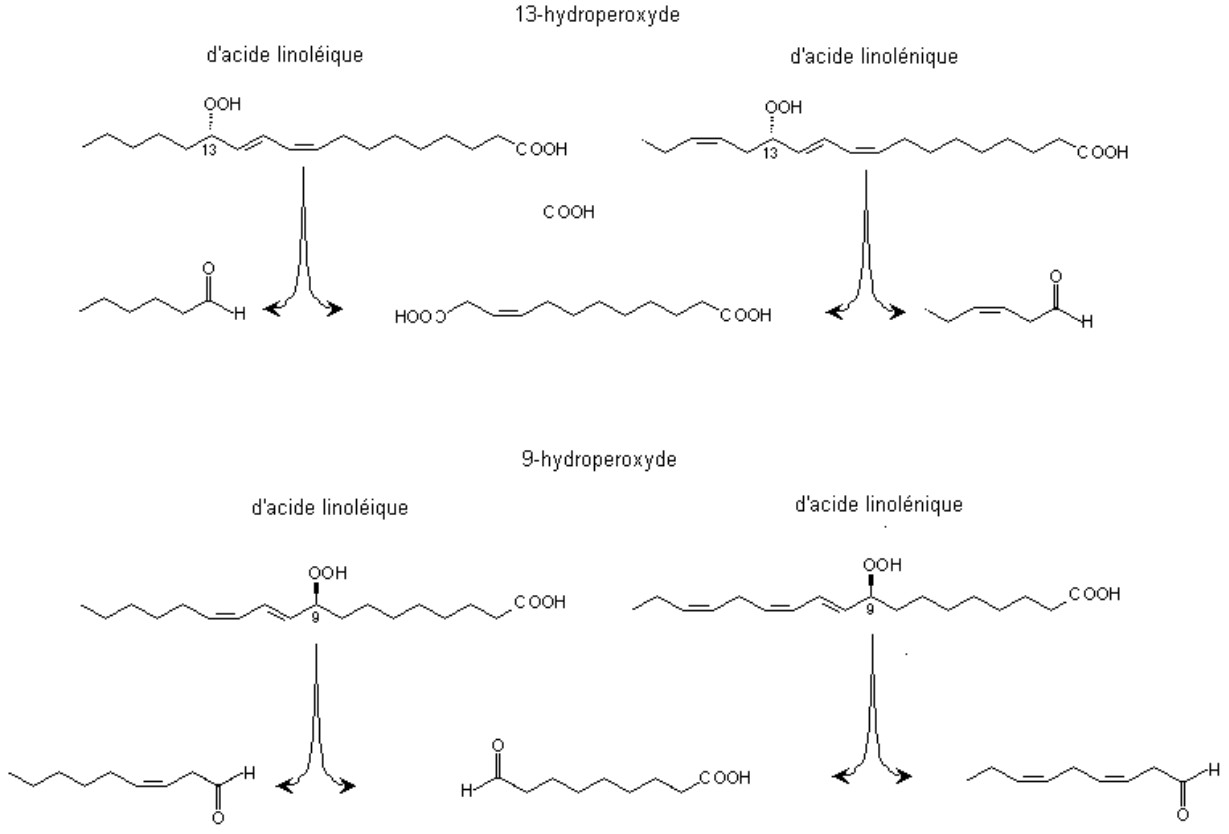


Figure 22 : Ruptures des chaînes des 13- et 9- hydroperoxydes d'acide linoléique et linolénique catalysées par l'hydroperoxyde-lyase

La formation de ces composés aldéhydiques peut être catalysée par l'hydroperoxyde-lyase qui coupe l'hydroperoxyde d'acide gras en aldéhyde et acide aldéhydique (**figure 22**). Les aldéhydes possédant une double liaison *cis*-3 sont ensuite isomérisés en aldéhydes avec une insaturation *trans*-2. Ces deux types d'aldéhydes peuvent ensuite être réduits par l'alcool deshydrogénase. Par exemple, l'hexanal ou l'hexenal

issus des 13-hydroperoxydes des acides linoléiques et linoléniques respectivement, possèdent une forte odeur d'herbe ou de pois. Le nonenal ou le nonadienal issus des 9-hydroperoxydes de l'acide linoléique et linolénique ont été décrits comme ayant une odeur fruitée ou de papier carton (*trans-2*-nonénal et acide trihydoxyoctadécanoïque) dans la bière (**Hirota *et al.*, 2006**).

L'altération aromatique d'aliments d'origine animale, tels que les poissons et notamment des poissons gras, peut également être liée à l'action de la LOX. Ces poissons, riches en lipides, contiennent des enzymes (LOX et cyclo-oxygénase) catalysant l'oxydation des lipides et dégradant ainsi la qualité organoleptique du produit en provoquant l'apparition de composés responsables de l'arôme rance (**Decker et Xu, 1998**).

3.5.2. Effets rhéologiques de l'activité de la lipoxygénase dans les pâtes lors de la fabrication du pain

L'oxydation enzymatique des lipides dans les pâtes entraîne la modification de leurs propriétés rhéologiques se traduisant par une augmentation du volume des pains et une amélioration de leur texture (**Grosch et Schwarz, 1980**). De plus, l'action de la LOX entraîne une résistance des pâtes au sur-pétrissage. Cette caractéristique correspond à la capacité des pâtes à supporter un pétrissage prolongé sans qu'il y ait des agrégations du réseau glutineux (« *dough break down* ») et se traduit par des pâtes plus fermes qui retiendront mieux les bulles de gaz carbonique lors de la fermentation des pâtons et lors de leur cuisson. Le mécanisme d'action de la LOX dans les pâtes impliquerait la co-oxydation des composés thiols du gluten et la formation de ponts disulfures (**Shidu *et al.*, 1980**) et une libération de lipides (**Frazier, 1979**).

3.5.3. Effets de l'activité LOX sur les pigments

La LOX en présence de substrat peut entraîner la co-oxydation de nombreux composés tels que les caroténoïdes ou les chlorophylles. Ce phénomène se traduit par un changement de couleur ou une décoloration des produits. Les co-oxydations seraient le résultat de la génération de composés radicalaires au cours de l'oxydation des acides gras (**Weber *et al.*, 1973**).

3.5.3.1. Cooxydation des caroténoïdes dans le pain et les pâtes

Bien que la LOX endogène à la farine de blé soit capable de dégrader partiellement les caroténoïdes dans les pâtes, la supplémentation avec de la farine de fève (*Vicia faba*) ou de soja (*Glycine max*) est plus efficace pour blanchir la mie des pains. Cette supplémentation est autorisée à hauteur de 2 % et 0,5 % respectivement dans les « pains de tradition française » (article 2 du Décret n° 93-1074 du 13 septembre 1993 pris pour l'application de la loi du 1er août 1905). Le pétrissage intensif entraîne une co-oxydation et un blanchiment des pigments plus intenses tandis que les antioxydants (BHT) et les inhibiteurs de la LOX (acide ascorbique, peroxyde d'hydrogène) diminuent la destruction des pigments (**Nicolas *et al.*, 1978**).

Alors que les effets de la LOX sur le blanchiment des pains sont recherchés, la co-oxydation des caroténoïdes dans les pâtes alimentaires est nuisible car la couleur jaune due aux caroténoïdes est un facteur de qualité des pâtes. **Barone *et al.* (1999)** ont montré que la LOX de blé (*Triticum turgidum* var. durum Desf) est responsable de la décoloration des pâtes alimentaires et des semoules de blé par l'oxydation de la lutéine.

3.5.3.2. Cooxydation des caroténoïdes dans les fruits et légumes

Si la LOX est un additif alimentaire dans les procédés de panification, son activité est préjudiciable à la qualité des fruits et légumes. En effet, l'activité lipoxygénase de tomate (**Cabibel et Nicolas, 1991**) ou d'aubergine (**Perez-Gilabert *et al.*, 2001**) par exemple, entraîne de la même façon que dans les pâtes et le pain, la co-oxydation des pigments caroténoïdes. Ce phénomène entraîne, d'une part la diminution de la qualité nutritionnelle des produits par la perte en précurseurs de la vitamine A, et une diminution des qualités organoleptiques visuelles (perte de couleur) et gustatives (apparition d'arrières goûts désagréables) d'autre part.

Ainsi, l'oxydation enzymatique des lipides peut avoir différents aspects néfastes sur les produits alimentaires, et notamment :

- des détériorations organoleptiques avec des modifications de la couleur et du goût ou de l'odeur,
- des pertes en valeur nutritionnelle du fait de l'oxydation des AGPI, des vitamines A et E,

La maîtrise de l'oxydation enzymatique des lipides est donc d'un intérêt majeur dans de nombreuses filières alimentaires : brasserie, fruits et légumes, viande et poisson. Les principaux moyens actuels de lutte contre

cette oxydation sont le contrôle des conditions physiques (emballages opaques, stockage au froid) et chimiques (inertage, atmosphère modifiée, absorbeur de dioxygène) des conditions de stockage, l'addition d'anti-oxydants et l'élimination des pro-oxydants (métaux et enzymes). Il n'existe pas de méthode universelle idéale pour prévenir ce phénomène dans des systèmes alimentaires complexes.

3.6. Prévention de l'oxydation enzymatique des lipides dans les aliments

Si le chauffage peut permettre l'inactivation de la LOX lors du blanchiment, ni la réfrigération ni même la congélation permettent la stabilisation du produit. Bien que très faible à l'état congelé, l'activité LOX reprend lors de la décongélation dès 0 – 4 °C (**Frankel, 2005**).

On distingue différents types de composés inhibiteurs de l'oxydation lipidique :

- Les antioxydants de type I piègent les radicaux libres. On peut citer parmi cette famille d'antioxydants les composés naturels phénoliques (tocophérols) et des composés synthétiques tels que BHT (**Kortenska *et al.*, 2002**).
- Les antioxydants de type II préviennent la formation des radicaux libres par différents mécanismes comme notamment la chélation des ions métalliques (ex. : acide citrique, EDTA).
- Les agents synergiques améliorent le pouvoir antioxydants d'autres composés. Il peut s'agir d'acides (ascorbique, lactiques, tartriques ou phosphoriques) ou de sels (de potassium, de sodium ou de calcium).

Ces antioxydants s'ajoutent aux produits réducteurs de l'oxygène (acide ascorbique) et aux composés responsables d'une inhibition de la LOX par différents mécanismes affectant sa structure tridimensionnelle et/ou l'activité catalytique du site actif de l'enzyme.

La revue bibliographique nous a permis de mettre en évidence les répercutions des réactions d'oxydation sur la qualité des aliments. Les radicaux lipidiques ou quinoléiques générés par l'action des lipoxygénases et polyphénoloxydases sont susceptibles d'entraîner la co-oxydation de nombreuses autres substances :

vitamines, peptides et protéines par exemple. Ce travail s'inscrit dans la recherche d'alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques actuellement mis en œuvre dans les aliments.

La réaction de Maillard se rencontre fréquemment lors des traitements technologiques appliqués aux aliments. Les produits formés affectent fortement la qualité nutritionnelle, organoleptique (flaveur et couleur en particulier), toxicologique et antioxydante des produits transformés. Par ailleurs les travaux antérieurs montrent que certains PRM inhibent l'activité polyphénoloxydase et limitent le brunissement enzymatique, tandis que d'autres systèmes modèles de PRM bloquent la chaîne de propagation des radicaux libres.

On cherche donc à mettre au point des conditions optimales (nature des acides aminés et des glucides réducteurs, concentrations des réactants, conditions physico-chimiques du développement de la réaction) de formation des composés inhibiteurs, puis à caractériser les familles de composés générés et à analyser leurs propriétés antiradicalaires et chélatantes, pour une application éventuelle en tant qu'antioxydants en agro-alimentaire.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les travaux antérieurs montrent l'impasse dans laquelle se trouvent actuellement les industriels agro-alimentaires : l'utilisation des antioxydants efficaces, pratiques et peu chers est actuellement remise en cause en raisons de l'allergénicité ou de la toxicité de ces additifs. Cependant, il existe à l'heure actuelle aucune alternative économiquement et/ou technologiquement satisfaisante pour prévenir les phénomènes oxydatifs qui altèrent la qualité des aliments.

L'**objectif** de cette étude est donc de proposer une alternative à l'utilisation des antioxydants actuels. Les produits de substitutions proposés sont constitués de systèmes modèles sucre / acide aminé chauffé, c'est à dire de produits de la réaction de Maillard dont la synthèse bibliographique a montré les propriétés antioxydantes. Une grande partie de ce travail vise à optimiser les conditions de la réaction de Maillard pour former les produits inhibiteurs de deux systèmes enzymatiques : la lipoxygénase et la polyphénoloxydase. Cette étude vise également à déterminer les structures et les mécanismes impliqués dans l'inhibition des enzymes tout en vérifiant leur applicabilité technologique d'une part et en abordant l'étude des propriétés mutagènes des composés inhibiteurs.

Pour aborder ces questions nous avons choisi comme première approche d'étudier les systèmes enzymatiques impliqués des réactions d'oxydation que l'on souhaite inhiber. La mise au point des conditions d'extraction et de purification de ces enzymes ainsi que la caractérisation des cinétiques catalytiques et des propriétés physico-chimiques des enzymes sont décrites dans la première partie des résultats.

Cette partie constitue un préambule aux études d'inhibition par les produits de la réaction de Maillard qui débute par l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols (deuxième partie des résultats). L'optimisation des conditions de la réaction de Maillard nous a permis de simplifier le système réactionnel. Afin de pouvoir identifier les structures responsables du pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité PPO, les conditions de formation des composés inhibiteurs ont été étudiées pour permettre ensuite la purification de ces composés. Puis, les propriétés antioxydantes des différents modèles

réactionnels ont été mesurées en vue d'établir éventuellement un lien entre ces propriétés antioxydantes et l'inhibition des systèmes enzymatiques. L'efficacité des produits de la réaction de Maillard et du système réactionnel simplifié a par ailleurs été étudiée dans des conditions proches des procédés de transformations en agro-alimentaires avant que ne soit aborder les mesures de pouvoir mutagène des différents produits étudiés.

Dans une dernière partie est présentée l'influence des conditions de la réaction de Maillard sur l'inhibition de l'oxydation enzymatique des lipides. Par un criblage des facteurs et deux plans d'expériences successifs, les conditions de la réaction de Maillard sont optimisées pour produire des composés dont l'efficacité inhibitrice (*in vitro*) et la stabilité en fonction de la durée et des conditions de stockage sont étudiées.

MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre a pour objet de présenter les matériels et les méthodes utilisés pour répondre aux objectifs que nous nous sommes fixés. Il s'attachera tout d'abord à donner les caractéristiques des matériels biologiques dont sont extraites les activités enzymatiques d'intérêts avant d'indiquer les produits chimiques utilisés. Les conditions de préparation des produits de la réaction de Maillard faisant appel à la méthodologie des plans d'expériences sont présentées dans le second paragraphe de ce chapitre.

Les méthodes utilisées pour caractériser et extraire les activités enzymatiques sont ensuite précisées, avant d'introduire les méthodes de caractérisation des composés inhibiteurs et les méthodes utilisées pour mesurer leur pouvoir antioxydant. Le principe et les modalités du test d'Ames pour aborder les études de mutagénicité précèdent les explications concernant les méthodes de mesures de couleur mises en œuvre pour vérifier l'efficacité technologique des produits inhibiteurs du brunissement enzymatique

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les aubergines (*Solanum melongena*), pommes (*Malus sylvestris* var Red Delicious) et pommes de terre (*Solanum tuberosum* var Charlotte, Mona Lisa, Roseval, Amandine, Bintje, Novita) sont achetées à maturité sur le marché local dans la semaine précédant leurs utilisations.

La lipoxygénase de soja (*Glycine max*) est préparée à partir d'une poudre commerciale (Fluka Sigma-Aldrich, St Louis, MO – USA ; 9,4 $U.mg^{-1}$) à 2 $mg.mL^{-1}$ d'eau ultrapure sans purification supplémentaire. La farine de fève (*Vicia faba*) est également utilisée comme source de lipoxygénase. Elle est gracieusement fournie par les Grands Moulins d'Aizenay (Aizenay, France).

2. PRODUITS CHIMIQUES ET PREPARATION DES PRODUITS INHIBITEURS

La liste des produits chimiques utilisés, leur pureté et le fournisseur sont présentés en **Annexe 1** par grandes catégories d'expériences**.**

2.1. Introduction à la méthodologie des plans d'expériences

Un plan d'expériences consiste à mettre en œuvre une stratégie de travail dans le but de réduire le nombre des essais tout en atteignant rapidement les meilleures estimations possibles des effets de facteurs sur une ou plusieurs réponses. Cette méthodologie, largement utilisée pour l'optimisation de la préparation des échantillons inhibiteurs, peut être divisée en trois parties :

- la construction du plan d'expériences,
- la réalisation des expériences,
- l'interprétation des résultats des expériences.

La dernière étape consiste à extraire les effets des différents facteurs étudiés sur la réponse mesurée. L'un des objectifs que l'on s'impose lors de la construction d'un plan d'expériences est de faciliter l'interprétation des résultats. La phase de construction du plan doit donc être réalisée avec soin et précaution et notamment permettre de préciser clairement les objectifs de l'étude, les facteurs qui peuvent modifier la réponse ainsi que le domaine de variation autorisé pour chaque facteur.

Le choix du nombre et l'emplacement des points d'expériences est le problème fondamental des plans d'expériences. Si l'on veut effectuer le moins d'essais possibles, le meilleur choix d'emplacement des expériences est de prendre les points dont les coordonnées sont les niveaux hauts et bas. A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine expérimental correspond un ensemble de réponses qui définit une surface appelée « surface de réponse » qui représente donc le comportement de la réponse lorsque les niveaux des facteurs varient.

De sa connaissance, on peut déduire les meilleurs ajustements des facteurs pour répondre à une question donnée, minimisation ou maximisation de la réponse par exemple. Les plans d'expériences permettent de trouver cette surface de réponse en effectuant un minimum d'essais et en obtenant une bonne précision sur sa localisation.

On peut représenter la fonction qui lie la réponse aux facteurs par une expression très générale de la forme : $y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$.
Mais cette fonction est trop générale et il est d'usage d'en prendre un développement limité de Taylor-Mac Laurin. Le développement précédent prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé. La résolution du système d'équation permettant d'obtenir les coefficients du modèle et donc l'équation du modèle lui-même utilise plusieurs techniques statistiques dont l'analyse de la variance classique permettant d'étudier l'influence d'un ou plusieurs facteurs sur une variable quantitative en se basant sur une comparaison multiple de moyennes de différents échantillons constitués par les différentes modalités des facteurs.

On utilise des unités codées qui proviennent de la transformation des unités d'origine en attribuant la valeur « - 1 » au niveau bas d'un facteur et la valeur « + 1 » au niveau. L'utilisation des valeurs codées a pour conséquences de permettre la standardisation des effets des facteurs facilitant ainsi leur comparaison.

2.2. Formation des produits inhibiteurs de l'activité PPO

2.2.1. Préparation des PRM

Des PRM à base de glucose, de cystéine ou de glutathion ont été étudiés au laboratoire pour leurs propriétés inhibitrices de l'activité PPO de champignon, de pomme, d'aubergine et de pomme de terre :

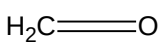
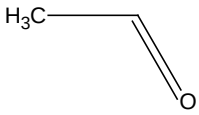
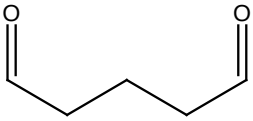
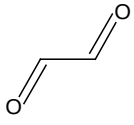
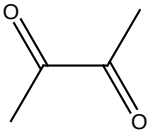
- PRM A : glucose (1 M) / glutathion (0,15 M) chauffés à 110 °C pendant 4 h (pH non ajusté ≈ 3)
- PRM B : glucose (0,8 M) / cystéine (0,5 M) chauffés à 103 °C pendant 14 h (pH ajusté à 3)
- PRM C : glucose (1 M) / cystéine (0,25 M) chauffés à 115°C pendant 3 h 20 (pH ajusté à 2).

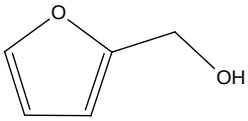
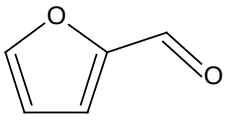
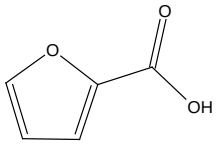
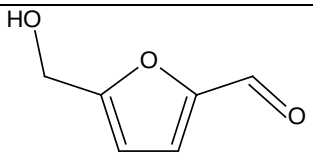
Les conditions réactionnelles de ces PRM ont été optimisés au cours d'études sur l'inhibition de différentes polyphénoloxydases par les PRM (**Billaud *et al.*, 2003 ; Roux *et al.*, 2003 ; Billaud *et al.*, 2004 ; Brun-Mérimée *et al.*, 2004 ; Cheriot *et al.*, 2006**).

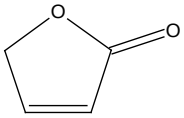
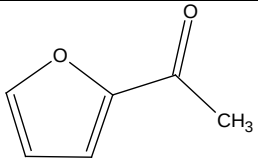
Les PRM sont obtenus par chauffage de ces solutions aqueuses dans une étuve ventilée (Memmert ULE 400). Un volume de 1,5 mL du mélange initial dont le pH est préalablement ajusté à l'aide d'acide phosphorique (0,5 M), est chauffé dans des flacons de 2 mL sertis par une capsule en aluminium munie d'un septum silicone / téflon.

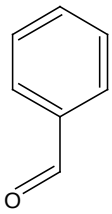
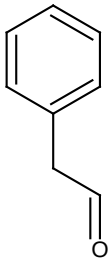
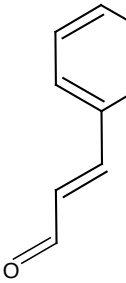
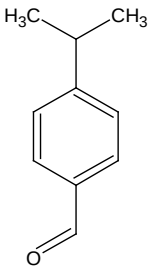
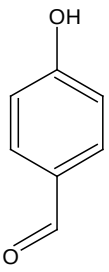
2.2.2. Préparation des produits inhibiteurs issus de mélanges

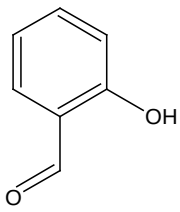
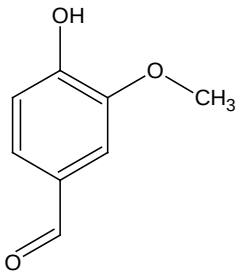
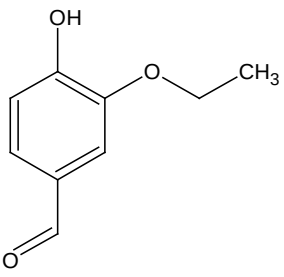
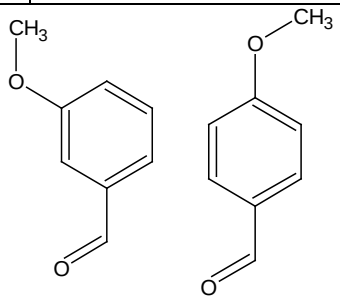
On entend par cette dénomination les « produit néoformés » issus du mélange entre un composé carbonylé et un composé soufré chauffé. Dans une première série d'expériences, une solution aqueuse de cystéine (10 mM) a été chauffée à 115 °C pendant 200 min. Après refroidissement, cette solution est mélangée à une série de composés carbonylés (4 mM – **figure 23**) et est conservée dans la glace pour pouvoir maîtriser la température de réaction. Dans une seconde série d'expériences, des solutions aqueuses de différents composés dérivés de la cystéine (10 mM – **figure 24**) sont chauffées à 115 °C pendant 200 min. Après refroidissement, chacune de ces solutions est ensuite mélangée à du HMF (4 mM). L'évolution du pouvoir inhibiteur (PI) vis-à-vis de la PPO de pomme de ces mélanges conservés à 0 °C est suivie pendant 3 h. Des volumes aliquotes (10 µL) de ces mélanges sont ajoutés au milieu réactionnel (1,4 à 1,5 mL) utilisé pour la mesure de l'activité PPO avant l'ajout de l'enzyme.

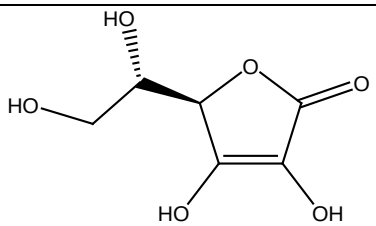
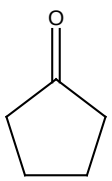
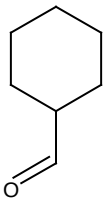
				
formaldéhyde	**acétaldéhyde**	**glutaraldéhyde**	**glyoxal** (éthanedial)	**2,3-butanedione** (diacétyle)

			
furfuryl alcool (2-furanméthanol)	**2-furaldehyde** (furfural)	**acide 2-furoïque**	**5-hydroxyméthylfurfural** (5-HMF)

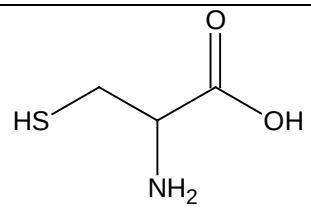
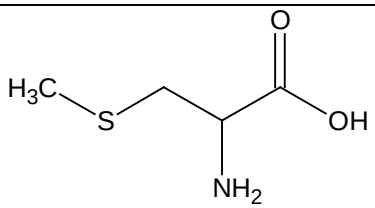
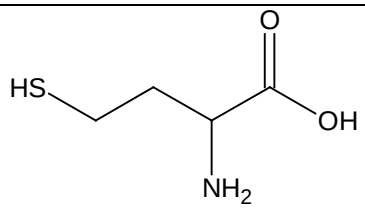
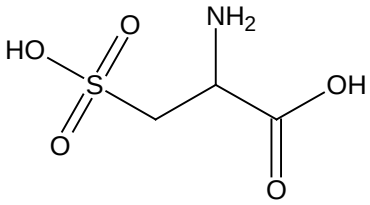
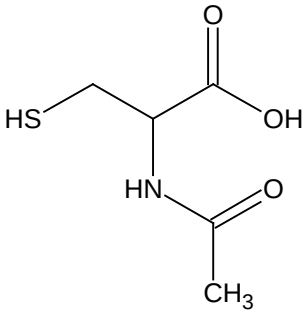
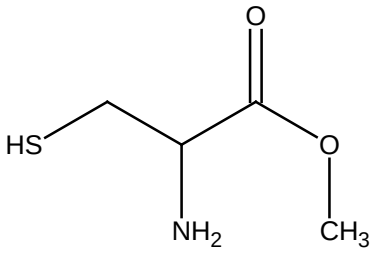
	
2-furanone (γ-crotonolactone)	**2-furylméthylcétone** (acétylfurane)

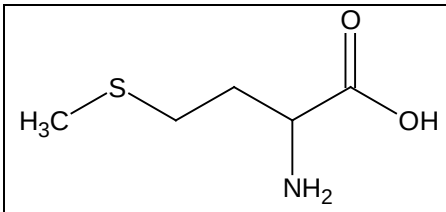
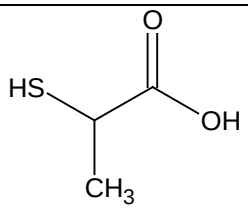
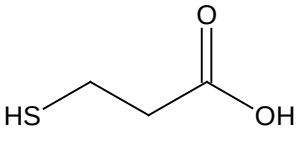
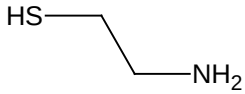
				
benzaldéhyde	**benzène acétaldéhyde** (phénylacétaldéhyde)	***t*-cinnamaldéhyde** (3-phényl-2-propènall)	**cuminaldéhyde** (4-isopropylbenzaldéhyde)	***p*-hydroxybenzaldéhyde** (4-hydroxybenzaldéhyde)

			
salicylaldéhyde (2-hydroxybenzaldéhyde)	**vanilline** (3-méthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde)	**éthylvanilline** (3-éthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde)	***m*- et *p*- anisaldéhyde**

		
acide ascorbique	**cyclopentanone** (cyclotène)	**cyclohexane carboxaldéhyde**

<u>Figure 23</u> : Structures des composés carbonylés mélangés (4 mM) à la cystéine chauffée (10 mM) à 115 °C pendant 200 min.

		
L-cysteine (acide L-2-amino-3-mercaptopropionique)	**S-méthylcystéine**	**DL-homocystéine**
		
acide cystéique	**N-acétylcystéine**	**L-cystéineméthylester**

			
méthionine	**acide thiolactique** (acide 2 mercaptopropanoïque)	**acide 3-mercaptopropanoïque**	**cystéamine**

$(NH_4)_2S$
sulfure d'ammonium*

(*) Le sulfure d'ammonium est utilisé non chauffé

<u>Figure 24</u> : Structures des composés soufrés (10 mM) chauffés à 115 ℃ pendant 200 min puis mélangés au HMF (4 mM) à 0 ℃ (3 h) pour produire les composés néofor més inhibiteurs.

Les effets des concentrations initiales (0,8 – 9,6 mM) de la cystéine (avant chauffage à 115 °C pendant 200 min) et du HMF sur la formation de composés inhibiteurs de l'activité PPO d'aubergine ont été étudiés selon un plan d'expériences centré-réduit à deux facteurs et cinq niveaux (**tableau 7**) et cinq répétitions du point au centre. L'activité résiduelle est mesurée après ajout de 10 µL de chacun des mélanges ayant réagi pendant 60 min à 0 °C sur la PPO d'aubergine (1,42 mL de volume réactionnel total).

Tableau 7 : Variables indépendantes et leurs valeurs codées utilisées pour déterminer les rapports des concentrations en réactants (cystéine chauffée et HMF)

Valeurs codées / Valeurs réelles	-1,41	-1	0	1	1,41
[cystéine] (mM) avant chauffage	0,8	2	5	8	9,6
[HMF] (mM)					

2.3. Préparation des produits dont l'activité mutagène a été testée par le test d'Ames

Pour la préparation des PRM, les solutions de glucose-cystéine (1 / 0,25 ; M / M) ont été chauffées dans une étuve ventilée (Memmert, ULE 400) après ajustement du pH à 2 avec de l'acide phosphorique concentré dans des fioles en pyrex (20 mL) scellées avec des septa en silicone / téflon (Interchim, Montluçon, France).

Les produits « néoformés » sont issus d'un mélange ayant réagi pendant 24 h à 4 °C de cystéine (100 mM) chauffée (115 °C ; 200 min) mélangée après refroidissement avec du HMF (concentration finale : 100 mM).

Tous les échantillons utilisés pour le test d'Ames ont été lyophilisés (48 h - Heto PowerDry LL1500) avant leur envoi au "*Department of Nutritional Sciences*" de l'université de Vienne (Autriche). Le pouvoir inhibiteur (PI) et la concentration en HMF des PRM et du mélange sont stables au moins trois mois après lyophilisation et conservation à température du laboratoire.

2.4. Optimisation de la préparation des PRM inhibiteurs de l'activité LOX

2.4.1. Criblage des facteurs du plan d'expériences

Afin de discriminer les acides aminés formant des PRM inhibiteurs de la LOX de fève et / ou de soja, différents acides aminés (lysine, arginine, histidine, cystéine, alanine, proline, glycine) et un peptide (glutathion) ont été mélangés à du glucose et chauffés. Les concentrations en acide aminé et en glucose sont fixées à 0,25 M. Le pH initial n'étant pas ajusté, il varie selon l'acide aminé introduit. Pour mettre en évidence l'apparition de composés inhibiteurs au cours du chauffage, les PRM sont chauffés à 103 °C entre 1 et 14 h. Cette valeur de 103 °C a été choisie afin de pouvoir comparer les propriétés de ces PRM à celles des systèmes modèles étudiés par **Maillard *et al.* (2007)** : un traitement thermique à 103 °C pendant 14 h forme des composés ayant un pouvoir antioxydant maximal. Au cours du temps de chauffage des différents systèmes modèles, nous avons mesuré le PI par polarographie en présence de 10 µL de PRM en cuve. Ceci permet de cibler les acides aminés les plus efficaces et d'appréhender la durée de chauffage adéquate pour former les PRM inhibiteurs de l'activité LOX. Dans une seconde série d'expériences, les acides aminés retenus ont été chauffés à 103 °C (0 – 14 h) avec du glucose ou du fructose afin de déterminer l'ose réducteur capable de générer les PRM les plus inhibiteurs de l'activité LOX.

La méthode utilisée pour discriminer entre les moyennes est la procédure des comparaisons multiples de Student-Newman-Keuls. Avec cette méthode, nous avons choisi le niveau 5,0% de risque de dire qu'une ou plusieurs paires de moyennes sont significativement différentes lorsque les vraies différences sont égales à 0.

2.4.2. Plan d'expériences à quatre facteurs : pH, durée de chauffage, concentration en glucose et en lysine

Afin de déterminer les conditions de la réaction de Maillard permettant la synthèse des produits les plus inhibiteurs de l'activité LOX de fève, la méthodologie des plans d'expériences a été retenue en utilisant un plan centré composite isovariant par rotation avec cinq répétitions du point au centre. Le modèle mathématique utilisé est un modèle à effet quadratique utilisant une régression polynomiale d'ordre 2.

Ainsi, si on considère que Y est la réponse mesurée et X_1, X_2, X_3 et X_4 les quatre facteurs continus et contrôlés, on peut écrire (**Eq. 1**) :

$$\begin{aligned} y = \quad & \beta_0 \\ & + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 \\ & + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{24} X_4 X_2 \\ & + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 \\ & + \varepsilon \text{ (terme d'erreur)} \end{aligned} \qquad \textbf{(1)}$$

avec : X_i : valeur centrée réduite du paramètre étudié x_i,

β_0 : moyenne des réponses au centre,

β_i : coefficient donnant le poids du terme linéaire du paramètre x_i sur la réponse

β_{ij} : coefficient donnant le poids de l'interaction entre les paramètres x_i et x_j sur la réponse,

β_{ii} : coefficient donnant le poids du terme quadratique du paramètre x_i sur la réponse,

Les facteurs testés (X_1 : pH initial noté pHi, X_2 : la durée de chauffage [h], X_3 : concentration en lysine [M] et X_4 : la concentration en glucose [M]) sont présentés avec leurs niveaux dans le **tableau 8**.

<u>Tableau 8</u> : Variables réelles et codées pour le premier plan d'expériences pour l'optimisation de l'inhibition de la LOX de fève par les PRM

Valeurs codées / Valeurs réelles	$-\alpha = -2$	-1	0	1	$+\alpha = 2$
X_1 pHi	3	5	7	9	11
X_2 durée de chauffage (h)	0,5	5	9,5	14	18,5
X_3 [lysine] (M)	0,2	0,4	0,6	0,8	1
X_4 [glucose] (M)	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Les réponses mesurées (y) sont :

- L'activité LOX résiduelle avec 2 µL de PRM et 2,5 nkat d'activité LOX,
- Les absorbances à 350 et 420 nm à + 25 °C déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre à barrette de diodes (Hewlett Packard 8453) et correspondant aux longueurs d'ondes des produits primaires et finaux de la réaction de Maillard ;
- le pH final (Mettler TOLEDO InLab 422)

2.4.3. Plan d'expériences pour optimiser le traitement thermique et la formation des PRM inhibiteurs de l'activité LOX

Un mélange à isoconcentrations (0,08 M) en glucose et lysine et à pH non ajusté (pH = 10,1) a été chauffé à des températures comprises entre 90 et 120 °C pendant 5 à 24 h afin de déterminer le couple temps-température de chauffage permettant la formation de composés les plus inhibiteurs de l'activité LOX. Après chauffage, la réaction est arrêtée par immersion des flacons de PRM dans la glace et l'activité LOX résiduelle en présence de 10 µL de PRM est rapidement mesurée par polarographie. Ce plan d'expériences à deux variables et cinq niveaux est présenté dans le **tableau 9**.

Tableau 9 : Domaine du plan expérimental (valeurs codées et réelles) utilisé pour l'optimisation du traitement thermique afin d'inhiber l'activité LOX de fève

Valeurs codées / Valeurs réelles	$-\alpha = -\sqrt{2}$	-1	0	1	$+\alpha = \sqrt{2}$
X_1 durée de chauffage (h)	5	7,5	14,5	21,5	24
X_2 température (°C)	90	94	105	116	120

Les réponses étudiées dans ce plan sont :

- le pouvoir inhibiteur des PRMs mesuré par polarographie vis-à-vis de l'activité de la LOX de fève (2,5 à 3 nkat d'activité LOX totale en cuve),
- la variation de l'absorbance à 294 nm
- la valeur de pH après l'obtention des PRM

3. CARACTERISATION DES SYSTEMES ENZYMATIQUES

3.1. Mesure des activités enzymatiques

Les activités enzymatiques sont déterminées à 30 °C par mesure de la vitesse de la consommation en oxygène dans le milieu réactionnel à l'aide d'une électrode de Clark. L'activité enzymatique est déterminée après ajout de l'enzyme au milieu réactionnel (1,4 mL) par mesure de la pente initiale de la courbe donnant la consommation d'oxygène en fonction du temps. Les activités enzymatiques sont exprimées en nanomoles d'oxygène consommées par secondes (nkatal) et peuvent être rapportées au volume d'extrait enzymatique introduit dans le dosage (nkata/mL d'enzyme).

Lorsque le dosage est effectué en présence d'un inhibiteur potentiel (PRM, Mélange etc.), celui ci est ajouté dans la cuve après le substrat, juste avant l'addition de l'enzyme. Il est alors vérifié que la présence d'inhibiteur n'entraîne pas une consommation d'oxygène qui perturberait la mesure de l'activité enzymatique. Lorsque l'activité résiduelle en présence d'inhibiteur est très faible, l'activité résiduelle est mathématiquement transformée en pouvoir inhibiteur (noté PI, **Eq. 2**) comme suit :

$$PI = \frac{100}{\text{activité résiduelle (\%)}} - 1 \qquad \textbf{(2)}$$

De cette façon : PI = 0 lorsqu'il n'y a pas d'inhibition (l'activité résiduelle vaut alors 100 %) et tend vers l'infini lorsque l'activité résiduelle tend vers 0.

La méthode polarographique présente généralement un domaine de linéarité large, une bonne sensibilité et une bonne reproductibilité lorsque les activités enzymatiques mesurées sont élevées (**Palmieri *et al.*, 1987**). Par ailleurs, cette méthode, par rapport aux mesures d'activité enzymatique par spectrophotométrie, présente l'avantage de suivre spécifiquement la consommation d'oxygène c'est-à-dire la vitesse de disparition d'un substrat et donc uniquement l'activité enzymatique, et non pas la résultante qu'est le brunissement enzymatique dans le cas par exemple des mesures de l'activité PPO.

Par ailleurs cette méthode polarographique limite les biais de mesure liés à l'introduction des PRM dans la cellule de mesure qui pourrait biaiser les résultats.

L'estimation des paramètres cinétiques des catalyses enzymatiques (V_m, K_m) et des inhibitions (K_{iapp}) ont été réalisées à l'aide du logiciel GraFit Version 4.06 (© Erithacus Software Limited) à partir d'au moins trois mesures d'activité enzymatique pour chaque concentration en substrat. En dehors des études cinétiques, les valeurs d'activité résiduelle ou de pouvoir inhibiteur correspondent à la moyenne arithmétique calculée sur au moins trois mesures expérimentales. Les barres d'erreur correspondent alors aux écarts-types calculés pour ces mesures.

3.1.1. Mesure de l'activité PPO

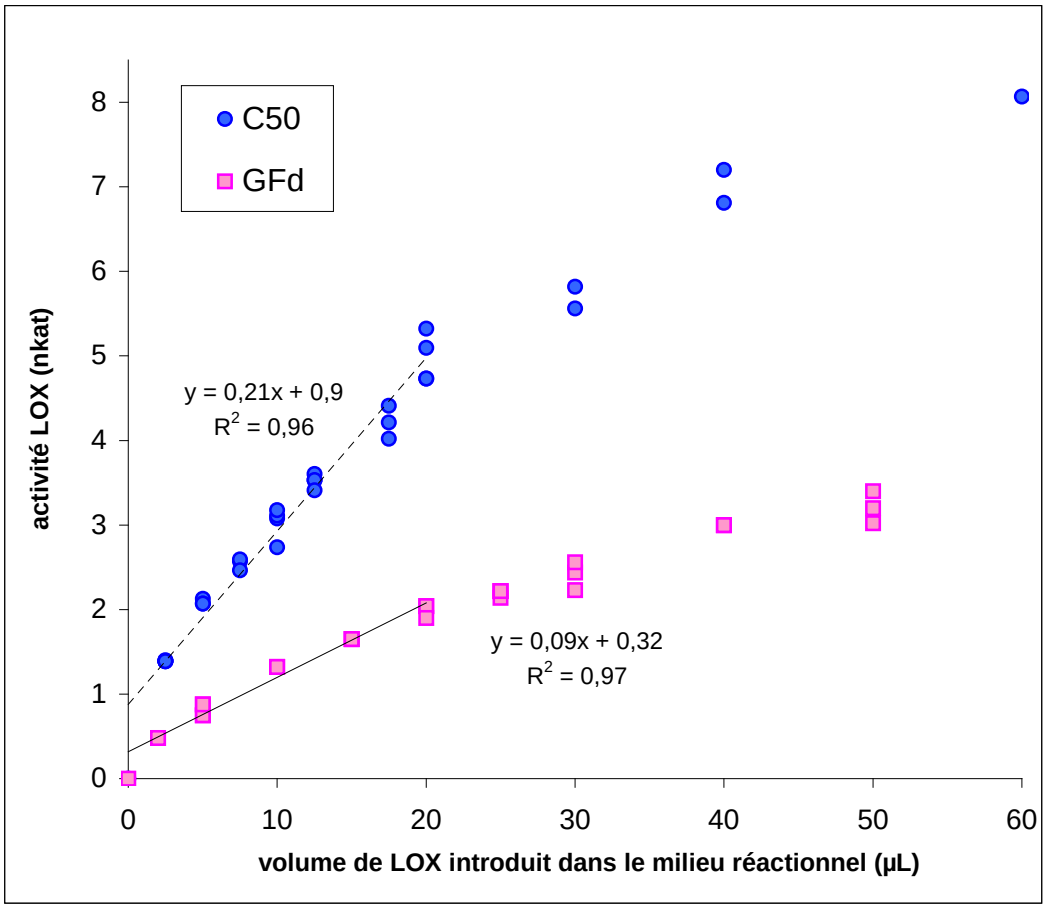
Pour les dosages d'activité PPO, le 4-méthylcatéchol a le plus souvent été utilisé comme substrat. Le cas échéant, l'utilisation d'un autre substrat est indiquée. Afin d'étudier les différentes PPO dans des conditions proches de leurs optima tout en limitant l'auto-oxydation partielle des substrats, les mesures d'activité ont été réalisées à pH 4,5 pour la PPO de pomme, de pomme de terre et la tyrosinase de champignon et à pH 5,0 pour la PPO d'aubergine. La quantité d'extrait enzymatique injectée en cuve ne doit pas contenir une activité supérieure à 25 nkat afin que la pente mesurée reste proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le milieu. L'activité PPO introduite en cuve se situe généralement autour d'une valeur de 8 nkat.

3.1.2. Préparation du substrat et dosage de l'activité LOX

Le protocole de préparation du substrat est celui défini par **Surrey, (1964)**. Il consiste en une dispersion d'acide linoléique en phase aqueuse à l'aide de Tween 20. Du Tween 20 (0,55 g) est dispersé dans 10 mL d'une solution de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6,5. Afin de disperser l'acide linoléique (0,56 g) qui est ajouté ensuite, la solution est fortement agitée. De la soude 1 N est ensuite ajoutée jusqu'à l'obtention d'une solution complètement limpide qui est finalement ajustée à 200 mL avec une solution de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6,5. Cette solution se conserve 3 jours à 4 °C à l'abri de l'air et de la lumière. Juste avant son utilisation, le substrat est dilué au ½ dans la solution de tampon phosphate de sodium (0,1 M ; pH 6,5) pour obtenir une émulsion d'acide linoléique à 5 mM.

L'activité LOX est dosée comme l'activité PPO par la mesure polarographique de la consommation d'oxygène à 30 °C. Elle est exprimée en nkat ou en nkat par mL de solution enzymatique.

Il est à noter que la présence d'un inhibiteur dans les extraits enzymatiques de LOX provenant de la farine de fève (C_{50} et GF), conduit à une absence de proportionnalité entre la quantité d'enzyme introduite en cuve et l'activité enzymatique mesurée pour des valeurs supérieures à 20 µL d'enzyme en cuve (**figure 24**). Ainsi, les volumes d'extrait enzymatique de LOX non purifié (C_{50}) et purifié (GFd) utilisés ont été de 20 et 10 µL respectivement et correspondant à une activité de 2 et 3 nkat dans le milieu réactionnel de mesure de l'activité enzymatique.



<u>Figure 25</u> : Activité LOX de fève (nkat) en fonction du volume d'enzyme mis en cuve (µL) pour les deux extraits enzymatiques de farine de fève utilisés (C50 : ○ et GFd : □) – Mise en évidence d'une relation non linéaire pour des volumes supérieurs à 20 µL

3.2. Dosage des protéines

Au cours des étapes de purification des activités enzymatiques, afin de pouvoir établir le tableau de purification et déterminer le taux et le rendement de purification, la quantité de protéines contenue dans chaque extrait enzymatique est dosée selon la méthode de **Bradford (1976)** à l'aide du réactif commercialisé par la société Bio-Rad. Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 20 et 140 µg pour la méthode standard, et entre 2 et 9 µg pour la micro-méthode. Le dosage consiste dans un premier temps à ajouter 800 µL d'échantillon convenablement dilué à 200 µL de réactif de Bradford (méthode standard). Le mélange, après homogénéisation, est ensuite placé 15 min à l'obscurité, et l'absorbance finalement mesurée à 595 nm (Hewlett Packard 8453) contre de l'eau ultrapure. Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire à partir d'une gamme étalon contenant de l'albumine de sérum bovin.

Cette méthode présente l'inconvénient d'être incompatible avec de trop fortes concentrations en sels et notamment en sulfate d'ammonium largement utilisé au cours des procédés de purification. Cependant, cette méthode présente un avantage majeur par rapport à la méthode de dosage des protéines par mesure de l'absorbance à 280 nm décrite **Layne, (1957)**. En effet, la présence de contaminants ayant une absorption à 280 nm ou proche de cette longueur d'onde biaise la détermination de la quantité de protéines. Parmi ces contaminants présents dans les extraits enzymatiques, on retrouve notamment les acides nucléiques (forte absorbance dans l'UV, avec un maximum autour de 254 nm) mais ce sont surtout les polyphénols (absorbance maximale comprise entre 260 et 330 nm) qui altèrent les calculs de rendement de purification lorsque la méthode spectrophotométrique est utilisée.

3.3. Détermination des masses moléculaires

Deux mélanges de marqueurs moléculaires ont été préparés dans une solution de tampon phosphate 0,1 M à pH 7. Ils sont injectés en tête de la colonne de gel Sephacryl S-200 HR (FPLC), et sont élués avec une solution du tampon phosphate 0,1 M, pH 7.

Un des mélanges contient 1 mg.mL^{-1} du bleu Dextran (2,000 kDa), 10 mg.mL^{-1} ribonucléase A (13,7 kDa), 10 mg.mL^{-1} d'albumine serum bovine (BSA, 67 kDa). Le second mélange contient 10 mg mL^{-1} ovalbumine (43 kDa), 10 mg.mL^{-1} d'alcool-deshydrogénase (ADH, 140 kDa) et 10 mg.mL^{-1} catalase (240 kDa). Les résultats sont exprimées en K_{av}, coefficient qui définit le comportement d'une protéine indépendamment des dimensions du gel ou du remplissage de la colonne. Ce coefficient est déterminé grâce aux volume d'élution de de chacune des protéines de calibration selon l'**équation 3 :**

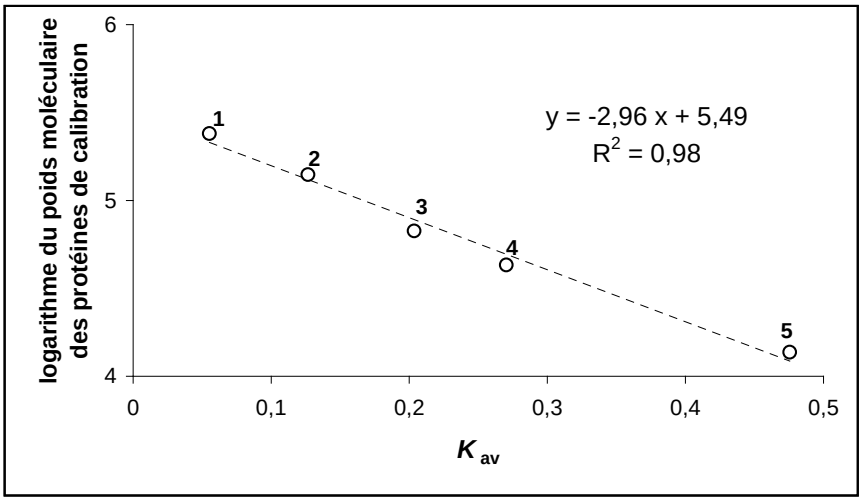
$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \qquad \textbf{(3)}$$

où : V_e = Volume d'élution de la protéine, V_0 = Volume mort = Volume de l'élution du Bleu de Dextran, et V_t = Volume total d'élution

Les valeurs de K_{av} sont comprises entre 0 (K_{av} d'exclusion) valeur correspondant aux protéines de haut poids moléculaire et 1 (Kav maximum) valeur correspondant aux particules de faible poids molécualire. Un K_{av} supérieur à 1 résulte d'une adsorption des molécules sur la matrice du gel.

En portant pour chaque protéine, le logarithme décimal du poids moléculaire $\log_{10}$ (PM) en fonction du K_{av} sur la **figure 26**, on obtient une relation linéaire permettant ensuite de déterminer, en connaissant le K_{av} d'une protéine, son poids moléculaire (**Eq. 4**) :

$\log_{10}$ (PM) = - 2,96 K_{av} + 5,49 **(4)**



Les marqueurs moléculaires sont en solution dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0.

1 : Catalase, 2 : Alcool déshydrogénase (ADH), 3 : Albumine bovine sérique (BSA), 4 : Ovalbumine, 5 : Ribonucléase

Figure 26 : Courbe de calibration de la colonne Sephacryl S – 200 HR utilisée pour la détermination du poids moléculaire de la LOX de fève

3.4. L'électrophorèse

Les électrophorèses sont réalisées à 15 °C sur des gels de polyacrylamide prêts à l'emploi de 0,35 mm d'épaisseur, de 40*50 mm et dont le gradient de concentration en acrylamide va de 8 à 25 % (Phastgels, Amersham Biosciences) dans les conditions non dénaturantes indiquées par le **tableau 10**. Des dépôts de 4 µL des extraits enzymatiques (préalablement incubés avec des composés inhibiteurs ou de l'eau) ont été appliqués sur les gels.

Tableau 10 : Conditions éléctrophorétiques de séparation des protéines en conditions non dénaturantes (natives). Le système est thermostaté à 15 °C

	tension (V)	Intensité (mA)	Puissance (W)	Durée (V * h)
Préfocalisation	400	10	2,5	10
Dépôt	400	1	2,5	2
Migration	400	10	2,5	268

L'appareillage Phastsystem a permis la séparation des protéines et leur révélation par le nitrate d'argent d'après les conditions décrites dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Méthode de coloration par le nitrate d'argent

Etape	Solution	Temps d'application (min)	Température (°C)
1	acide trichloroacétique 20 %	5	20
2	50 % éthanol, 10 % acide acétique	2	50
3	10 % éthanol, 5 % acide acétique	2	50
4	10 % éthanol, 5 % acide acétique	4	50
5	8,3 % glutaraldéhyde	6	50
6	10 % éthanol, 5 % acide acétique	3	50
7	10 % éthanol, 5 % acide acétique	5	50
8	eau	2	50
9	eau	2	50
10	0,5 % nitrate d'argent	10	40
11	eau	0,5	30
12	eau	0,5	30
13	solution de développement (*)	1	30
14	solution de développement (*)	5	30
15	5 % acide acétique	2	50
16	10 % acide acétique, 10 % glycérol	3	50

* : Solution de développement : 0,015 % de formaldéhyde dans une solution de carbonate de sodium (2,5 %)

4. METHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES ENZYMES

4.1. Extraction et purification de la PPO d'aubergine et de pomme

L'extraction et la purification de la PPO d'aubergine suit le protocole indiqué par **Cheriot *et al.* (2006)**. Il comporte trois étapes principales : extraction, précipitations fractionnées (20 – 70 % de saturation) par le sulfate d'ammonium et chromatographie d'interactions hydrophobes. Toutes les opérations sont effectuées à + 4 °C.

L'extraction et la purification de la PPO de pomme est réalisée selon le protocole décrit par **Janovitz-Klapp *et al.* (1989)** comportant après l'extraction, une étape de précipitation par le sulfate d'ammonium (30 % de saturation) et une chromatographie d'interactions hydrophobes.

4.2. Extraction et purification de la PPO de pomme de terre

4.2.1. Extraction

100 g de chair de pomme de terre (variété Charlotte) sont découpés finement et homogénéisés pendant trois fois 30 secondes à l'aide d'un broyeur (Ultra-Turrax T 25, IKA Labortechnik) dans 100 mL d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,5 (Tampon A) additionnée d'acide ascorbique (10 mM), de cystéine (5 mM) et de triton X-100 (0,5 % par rapport à la masse de chair de pomme de terre). Le broyat est ensuite centrifugé pendant 30 min à 37 800 g dans une centrifugeuse Beckman (modèle J2-21). Le surnageant, filtré sur filtre nylon (20 µm), constitue l'extrait brut (EB).

4.2.2. Précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium

L'extrait brut est ensuite porté à 10 % de saturation en sulfate d'ammonium. Puis, après une attente de 4 h à 4 °C, le précipité de protéines dépourvu d'activité PPO, est séparé de la phase soluble par centrifugation (30 min à 37 800 g, 4 °C). Le surnageant filtré représente la fraction nommée S_{10}. Celle-ci est amenée à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium puis est centrifugée après une attente de 4 h à 4 °C. Le précipité formé est de nouveau séparé par centrifugation (30 min à 37 800 g, 4 °C). Le culot ainsi récupéré et remis en solution dans du tampon A additionné de sulfate d'ammonium 0,8 M, constitue la fraction $C_{10\text{-}70}$. Celle-ci est mise à dialyser à 4 °C (membrane Spectra / Por, seuil de coupure : 12 000 - 14 000 Da) contre une solution de tampon phosphate A enrichie en sulfate d'ammonium (0,8 M), pendant la nuit. Cet échantillon dialysé constituant le surnageant $C_{10\text{-}70D}$ est de nouveau centrifugé (30 min à 37 800 g, 4 °C) avant son application sur la colonne de chromatographie d'interactions hydrophobes.

4.2.3. Chromatographie d'interactions hydrophobes

L'extrait dialysé et centrifugé est déposé sur une colonne de 2 cm^2 de section et de 40 cm de long (Pharmacia XK16) reliée à une pompe péristaltique (Pharmacia P1) et à un collecteur de fractions (Isco Foxy). La colonne est remplie de gel d'interactions hydrophobes TSK Toyopearl-butyl 650 M (Supelco, Tosoh) sur une hauteur de 20 cm et équilibrée avec une solution de tampon A enrichie en sulfate d'ammonium (0,8 M). Après élution des protéines non fixées par 2 à 3 volumes de colonne par la solution d'équilibrage, l'activité PPO est ensuite éluée par une solution tampon A renfermant 0,2 M de sulfate d'ammonium. Les protéines encore fixées sont éluées par une solution tampon A. Une fraction enzymatique minoritaire est ensuite éluée par de l'eau avant que la colonne ne soit régénérée par le passage d'un mélange d'eau distillée et d'éthylène glycol (50/50, v/v). L'élution est descendante avec un débit de 100 $mL.h^{-1}$. L'éluat est recueilli par fractions de 7 mL, sur lesquelles sont effectués un dosage de l'activité PPO et une mesure d'absorbance à 280 nm. Les fractions actives réunies constituent l'extrait enzymatique purifié qui a été utilisé dans toutes nos expériences.

4.3. Extraction et purification de la lipoxygénase de farine de fève

Le protocole utilisé pour la purification de l'activité LOX de farine de fève est adapté de **Beaux *et al.*, 1973**). A chaque étape de la purification, l'activité LOX de fève des extraits enzymatiques est contrôlée pour situer les pertes éventuelles.

4.3.1. Extraction

La farine de fève (7,5 g) est additionnée de 50 mL de solution tampon acétate de sodium (0,1 M ; pH 4,5 – tampon B) puis homogénéisée pendant deux fois 15 s (Ultra Turrax - T25, IKA Labortechnik). Le broyat est ensuite centrifugé à 27 000 g pendant 30 min et le surnageant de centrifugation, filtré (filtre nylon), constitue l'extrait brut (EB).

4.3.2. Précipitations fractionnées à l'aide de sulfate d'ammonium

L'extrait brut est ensuite porté à 25 % de saturation. Les protéines précipitées (4 h à 4 °C) sont séparées par centrifugation à 12 000 g pendant 20 min afin d'obtenir le surnageant S25. Du sulfate d'ammonium est ajouté à ce surnageant afin d'amener sa concentration à 50 % de saturation. La grande partie de l'activité LOX de fève précipite après 12 h de repos à 4 °C. L'extrait est ensuite centrifugé (12 000 g – 20 min) pour obtenir le culot C_{50}. Ce culot C_{50} repris extemporanément dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,8) est utilisé comme source d'activité LOX pour le criblage des facteurs visant à établir les paramètres physico-chimiques de la réaction de Maillard ayant un effet significatif sur la production de composés inhibiteurs. Cet extrait enzymatique a également été utilisé lors du premier plan d'expériences.

Pour l'étude des propriétés cinétiques de la LOX de farine de fève, la détermination du poids moléculaire de l'enzyme et le second plan d'expériences, la purification de la LOX est prolongée par une étape de gel filtration. Le culot C_{50} est alors remis en suspension dans 2 mL de solution tampon B puis dialysé pendant une nuit contre cette même solution tampon pour constituer l'extrait C_{50d} avant d'être appliqué en gel filtration.

4.3.3. Gel filtration

Les autres activités protéiques et les protéines inactives contenues dans l'extrait C_{50d} sont séparées de la LOX par gel filtration en utilisant une colonne de chromatographie (diamètre 26 mm, hauteur 60 cm) contenant le gel Sephacryl S-200 HR (Amerscham Biosciences) permettant de séparer les protéines de masses moléculaires comprises entre 5 et 250 kDa. La colonne est préalablement conditionnée dans une solution tampon acétate B.

La séparation se fait à l'aide du système *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC ; Amersham Biosciences) comprenant deux pompes (P-500), un conductimètre, un détecteur UV mesurant l'absorbance à 280 nm en sortie de colonne et un collecteur de fractions. L'extrait (C_{50d}) est injecté à l'aide d'une boucle (2 mL) sur le système FPLC. Le volume d'élution total de 320 mL représente une durée de séparation d'environ 5 h (débit = 1 $mL.min^{-1}$). L'activité LOX des fractions (4 mL) est mesurée puis les fractions présentant une forte activité sont collectées et forment la fraction de gel filtration (GF). Ces fractions actives collectées sont dialysées une nuit contre une solution de tampon acétate (0,1 M ; pH 5,6) supplémentée avec 1 M de sulfate d'ammonium afin d'améliorer la conservation de l'enzyme. La fraction obtenue, GFd, est stable plusieurs mois lorsqu'elle est conservée à - 20°C.

5. CARACTERISATION DES COMPOSES INHIBITEURS

5.1. Dosage des thiols par la méthode d'Ellman

Le dosage des thiols libres totaux est basé sur la réaction d'**Ellman** (**1959**). Après ajout de DTNB (acide 5-5'-dithiobisnitrobenzoïque), l'apparition d'un produit présentant un maximum d'absorbance à 412 nm en milieu alcalin, est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à barrette de diodes (Hewlett Packard 8453).

La réaction est réalisée en excès de DTNB. Elle s'effectue en ajoutant 200 µL d'échantillon à 0,5 mL d'une solution de DTNB 10 mM préparée dans une solution de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 et 4,5 mL d'une solution tampon Tris / HCl (0,2 M pH 8,2). Le mélange est laissé au repos pendant environ 15 min à la température du laboratoire avant de mesurer l'absorbance à 412 nm.

La teneur en thiols dans le milieu de dosage est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire déterminé par la gamme d'étalonnage réalisée sur des solutions de cystéine (ε = 13 500 $M^{-1}.cm^{-1}$).

5.2. Détermination des propriétés spectrales d'échantillons inhibiteurs

5.2.1. Spectres de transmittance infrarouge d'absorbance UV-VIS

La spectrométrie infrarouge est une technique d'analyse structurale fonctionnelle basée sur l'analyse vibrationnelle des liaisons. Elle permet de caractériser les fonctions chimiques de produits organiques. Une molécule soumise à des radiations dans l'infrarouge peut absorber certaines d'entre elles à des longueurs d'onde qui correspondent aux fréquences de vibration des groupement chimique qui la constituent. La mesure de l'intensité de lumière absorbée à chaque longueur d'onde conduit à un spectre caractéristique du produit étudié. Par comparaison avec les spectre d'absorption infraroute de substances de référence, il est possible d'identifier les substances connues. Les analyses sont effectuées en transmission et les spectres sont présentés en transmittance.

Une fraction méthanolique d'échantillons inhibiteurs de l'activité PPO a été analysée par spectrophotométrie infrarouge. Ce spectre a été réalisé à la chaire de génie analytique du Cnam à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (Nicolet 740 – Thermonicolet, France) dans les conditions suivantes :

- Gamme spectrale : 4000 à 400 cm^{-1} (Infrarouge moyen)
- Nombre de balayages : 16
- Résolution : 2 cm^{-1}
- Détecteur : DTGS KBr
- Diviseur de faisceaux : KBr

Une aliquote de la fraction inhibitrice (0,2 – 0,5 mL) est déposée sur une pastille de bromure de potassium (KBr) puis séchée avant d'en prendre le spectre infraroute qui représente $I/I_0 = f(\tau)$ avec I = intensité absorbée, I_0 = intensité initiale, τ nombre d'onde = $1/\lambda$ exprimée en cm_{-1}.

5.2.2. Spectres d'absorbance UV-VIS

Les spectres d'absorbance UV-VIS des différents échantillons ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre à barrette de diodes (Hewlett Packard 8453).

5.3. Méthodes chromatographiques appliquées aux composés inhibiteurs

5.3.1. Chromatographie liquide haute pression et détection UV-VIS (HPLC-DAD) pour le dosage du 5-hydroxyméthylfurfural

L'échantillon est injecté manuellement (boucle d'injection de 20 µL) dans le système HPLC (Waters) comportant deux pompes (Waters 600), un système de dégazage à membrane sous vide (Waters) et un détecteur à barrette de diodes (Waters 996) permettant d'obtenir les spectres des produits analysés entre 190 et 800 nm. La résolution spectrale est de 1,2 nm. Les chromatogrammes à 220, 283 et 360 nm sont enregistrés.

La séparation des composés se fait grâce à une colonne C18 (Y.M.C ODS-AQ AIT. 5 µm, 250 mm × 4,6 mm) en élution isocratique (0,8 $mL.min^{-1}$) avec comme phase mobile un mélange acide acétique à 0,2 % dans l'eau / acétonitrile (95 / 5 v/v) dont le pH est fixé à 3,0. Dans ces conditions d'élution, les temps de rétention du HMF et du furfural, dont les spectres d'absorbance sont présentés **figure 27**, sont d'environ 12,2 et 16,3 min respectivement (chromatogramme présenté **figure 28)**.

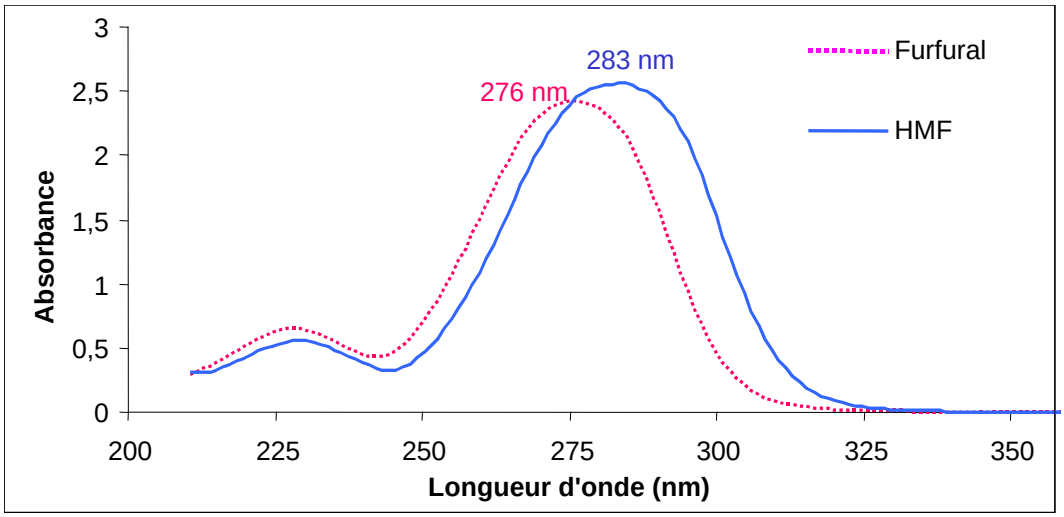


Figure 27 : Spectres d'absorbance du HMF et du furfural

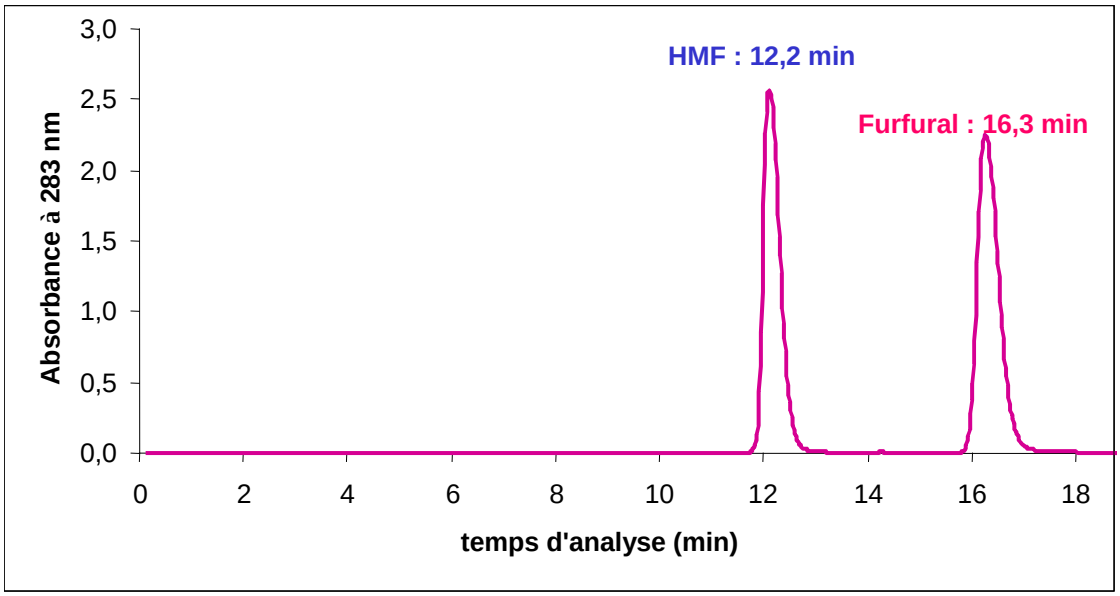
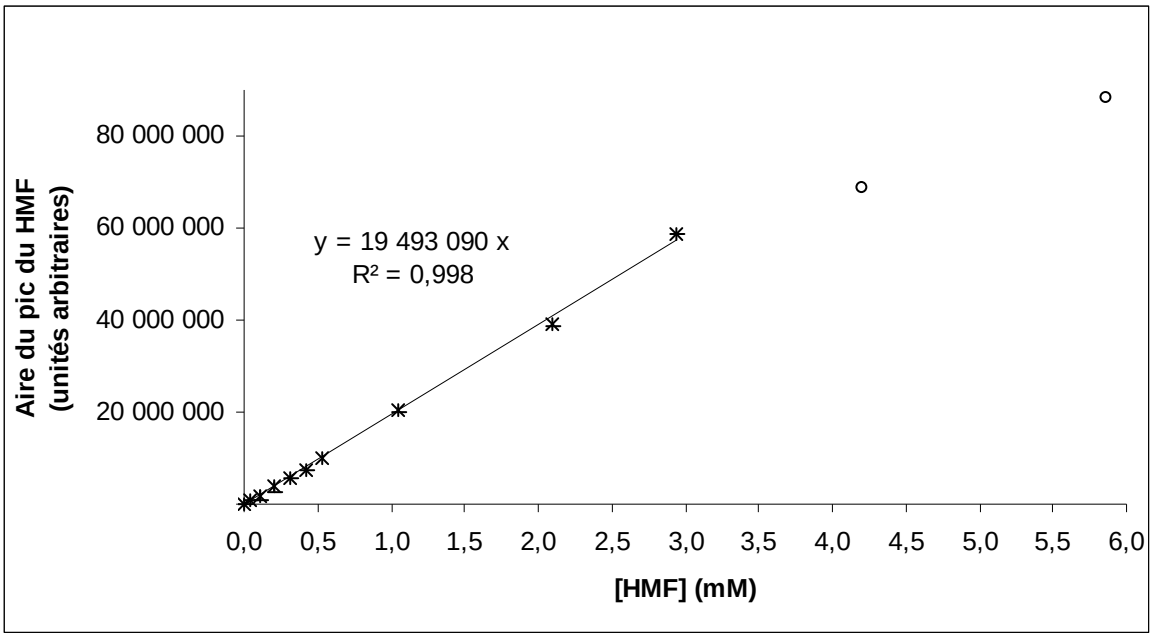


Figure 28 : Chromatogramme à 283 nm d'une solution de HMF et de furfural

La gamme d'étalonnage effectuée dans ces conditions permettant d'établir la correspondance entre l'aire du pic de HMF et sa concentration (**figure 29**) montre une zone linéaire pour des concentrations en HMF allant jusqu'à 3 mM dans le milieu. Lorsque cela est nécessaire, les échantillons sont dilués pour que les concentrations injectées soient situées dans la zone de linéarité.



Colonne C18 (Y.M.C ODS-AQ AIT. (5 µm, 250 mm × 4.6 mm) en élution isocratique acide acétique 0,2 % dans l'eau / acétonitrile (95 / 5 v/v) pH = 3,0

Figure 29 : Gamme d'étalonnage externe pour doser le HMFpar HPLC-DAD

5.3.2. Chromatographie liquide haute pression et détection électrochimique (HPLC-DEC) pour le dosage des thiols

Le protocole de séparation et de dosage des composés thiolés à l'aide du système HPLC équipé d'un détecteur coulométrique est adapté de celui décrit par **Kaïd *et al.* (2000)**. L'appareillage utilisé comprend les éléments suivants :

- une chaîne chromatographique constituée d'un ensemble *workstation* (Varian) avec une pompe 9012 et un injecteur Valco C6W (boucle d'injection de 20 µL),
- une colonne de silice greffée en C18 (YMC-ODS-AQ, AIT, France) de granulométrie 5 µm, de dimensions 250 * 4 mm et précédée d'une précolonne de même remplissage,
- un détecteur coulométrique, modèle Coulochem (ESA). Ce détecteur comprend une cellule de garde (modèle 5020) placée entre la pompe et l'injecteur, et une cellule analytique (modèle 5010) composée de deux électrodes en graphite poreux. Ainsi, toutes les espèces présentes sont oxydées (ou réduites) et le courant qui en résulte est, d'après la loi de Faraday, directement proportionnel à la concentration de l'espèce réagissant au niveau des électrodes.

La réponse du détecteur est étalonnée par l'injection régulière d'une solution standard de thiols et de disulfures toutes les trois analyses. Les conditions d'analyse sont :

- un potentiel de 1 V pour l'électrode de garde
- un potentiel de 0,45 V pour l'électrode 1 et
- un potentiel de 0,85 V pour l'électrode 2

L'élution est effectuée en mode isocratique avec un débit de 0,7 mL.min^{-1}, à l'aide d'une phase mobile composée d'une solution de dihydrogénophosphate d'ammonium (20 mM) ajustée à pH 2,5 avec de l'acide *o*-phosphorique. Dans ces conditions d'élution, les temps de rétention des composés sont :

- cystine : ~ 4 min
- cystéine : ~ 4,5 min
- glutathion : ~ 8,5 min
- glutathion oxydé : ~ 15 min

5.3.3. Chromatographie liquide haute performance et détecteur à diffusion de lumière (HPLC-DDL) pour le dosage du glucose résiduel dans les PRM

L'analyse chromatographique est réalisée en mode isocratique avec un débit de 1,4 mL.min^{-1} de la phase éluante constituée d'un mélange acétonitrile – eau (87 / 13, v/v) préalablement filtré (filtre cellulosique Millipore® 20 µM) et dégazé aux ultrasons. L'appareillage comprend les éléments suivants :

- un chromatographe constitué d'un ensemble Waters 600E (Saint Quentin en Yvelines, France)
- une colonne NH_2-LiChrospher (100 Å) 5 µm 250 x 4,6 mm (Altech Associates Inc. – Deerfield, USA)
- un détecteur à diffusion de lumière DDL 31 (60 °C, PM 650) provenant de la société Eurosep Instruments (Cergey St. Christophe, France)
- une boucle d'injection de 20 µL.

Ces conditions chromatographiques permettent l'élution du glucose en 15 min.

La concentration molaire en glucose est déterminée dans les échantillons diluées ([glucose] < 20 mM) à partir d'une gamme d'étalonnage établie dans les mêmes conditions d'élution et de détection avec des solutions de glucose pur (**figure 30**).

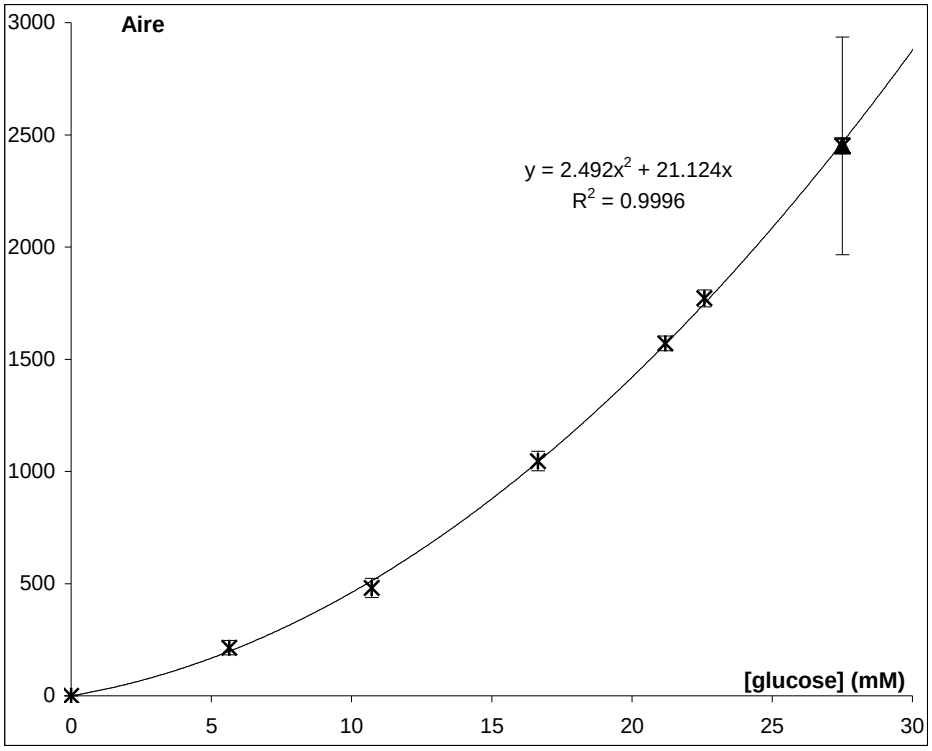


Figure 30 : Gamme d'étalonnage pour le dosage du glucose par HPLC-DDL

5.3.4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les échantillons en phases organiques sont séchés sur du sulfate de magnésium anhydre et filtrés sur des filtres 0,2 µM en polytétrafluoroéthylène (PTFE) avant toute analyse en chromatographie gazeuse (CPG).

Chromatographie en phase gazeuse couplée à détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID)

Les analyses qualitatives de différents échantillons solubilisés ou extraits dans des phases organiques sont réalisées grâce au système de chromatographie gazeuse équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (Agilent 4890 D - Les Ulis, France) équipé du logiciel HP-Chem CPG.
Le gaz vecteur (hydrogène à 0,8 $mL.min^{-1}$) entraîne une pression en tête de colonne fixée à 13,5 bars. La colonne utilisée est une colonne capillaire polaire de silice – polyéthylène glycol (DBwax : 30 m * 0,25 mm, 0,25 µm – J & W Scientific, Folsom, CA, USA) placée dans un four dont la température est fixée à 195 °C. L'injection à 250°C de 1 µL d'échantillon est en mode splitless. La température du détecteur à ionisation de flamme est de 250 °C.

Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-MS)

Ces expériences ont été réalisées à l'ENSIA sous la direction de Pierre Giampaoli et Barbara Rega. Le chromatographe en phase gazeuse Agilent Technologies Séries 6890 équipé d'un détecteur de masse 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) est utilisé en mode impact électronique (70 eV) pour la fragmentation des composés analysés. Le gaz vecteur est de l'hélium N55 dont le débit a été fixé à 2 $mL.min^{-1}$ sur une colonne capillaire de silice greffée avec du polyéthylène glycol modifié (acide nitroterephthalique) très polaire appelée FFAP (J&W Science, 30 m * 0.32 mm, épaisseur du film : 0,5 µm) et bien indiquée pour l'analyse des aldéhydes, des cétones, des nitriles et des acides. L'injection de 1 µL d'échantillon se fait en mode splitless pendant 30 secondes pour permettre le transfert de l'intégralité des composés en tête de colonne. La température de l'injecteur est maintenue à 250 °C, la ligne de transfert à 270 °C, et le piège à ions à 200 °C.

L'identification des composés se fait par comparaison des spectres obtenus avec la bibliothèque de spectres de masse Wiley et comparaison des indices linéaires de rétention pour les composés connus (HMF et furfural)

5.3.5. Chromatographie liquide haute pression - spectrométrie de masse (HPLC-MS)

Ces expériences ont été réalisées en partenariat avec le département SANS (Sciences Animales et de la Nutrition Santé) de l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais sous la direction de Frédéric Tessier.

La séparation des composés de l'échantillon (20 µL) est réalisée sur un système HPLC-MS *Surveyor* (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France) équipé d'un dégazeur en ligne et composé d'une pompe quaternaire *MS Pump Plus* et d'un injecteur automatique *Autosampler Plus*. La double détection est réalisée par un détecteur à barrette de diodes *PDA Plus* (200 – 600 nm) suivi d'un spectromètre de masse Finnigan LTQ. Ce spectromètre de masse est une trappe d'ions linéaire, également appelée trappe d'ions à deux dimensions par opposition aux systèmes de trappe d'ions (plus classiques) à trois dimensions (quadripôle circulaire). Ce spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation, d'une succession de lentilles et de trois multi-pôles qui guident les ions sélectionnés (positifs ou

négatifs) jusqu'à l'analyseur de masse, d'une trappe d'ions linéaire (l'analyseur) et de deux détecteurs d'ions.

La source d'ionisation est en mode électrospray positif (ESI) L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI : *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) permettant en général une meilleure ionisation et l'électrospray négatif ont également été enssayés sans apporter de meilleurs résultats que l'ionisation par électrospray positif.

L'acquisition et le traitement des données se font à l'aide du logiciel Xcalibur. Le courant d'ions total (*Total Ion Current*, TIC) a été enregistré sur une durée de 20 min pour des ions de masses comprises entre 50 et 600 (m/z). L'*Ion Current* (IC) pour des ratios masse sur charge (m/z) pré-selectionnés peut aussi être représenté en fonction du temps.

Des études préliminaires montrent que l'élution isocratique (0,3 $mL.min^{-1}$) par un mélange eau / acétonitrile (60 / 40) sur une colonne C18 (150 * 2 mm, 5 µm - YMC-ODS-AQ, AIT, France) permet une bonne séparation des pics et une reproduction des chromatogrammes obtenus par HPLC-DAD sur le système Waters. Ce sont conditions d'élutions qui ont été retenues. L'acidification de la phase éluante avec de l'acide formique ou acétique glacial (0,1 %) n'apporte pas une meilleure résolution des pics.

6. METHODES DE MESURE DU POUVOIR ANTIOXYDANT

Le pouvoir antioxydant ne peut être mesuré qu'indirectement à partir de ses effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites « d'inhibition » dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, en effectuant différents tests de mesure de pouvoir antioxydant, on peut générer un profil plus global des propriétés antioxydantes des échantillons étudiés (**Frankel et Meyer, 2000**)

6.1. Mesure du pouvoir réducteur et antiradicalaire par le test DPPH°

Le radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyl (DPPH°), fut l'un des premiers radicaux utilisé pour étudier la relation structure / activité antioxydante des composés phénoliques (**Blois, 1958**). Le radical stable DPPH° est utilisé comme radical oxydant pour être réduit par l'antioxydant (AH) et comme indicateur de la réaction selon le mécanisme suivant (**Brand-Williams *et al.*, 1995**) :

DPPH° + AH → DPPH-H + A° (avec AH : antioxydant).

Le DPPH° est un radical stable absorbant à 515 nm. Il fixe un hydrogène arraché à l'antioxydant AH pour former de DPPH-H, lequel n'absorbe pas à 515 nm. A partir d'une solution mère méthanolique de DPPH° à 6 mM (stable pendant 8 jours à - 20 °C), une solution de DPPH° à 60 µM est préparée extemporanément. La détermination de la concentration de la solution de DPPH° (60 µM) se fait par la

mesure de l'absorbance à 515 nm contre le méthanol. Pour chaque antioxydant, 77 µL des solutions de produit antioxydant (à différentes concentrations) sont ajoutés à 3 mL de solution de DPPH° (60 µM). La consommation du DPPH° est suivie au cours du temps à 515 nm jusqu'à l'obtention d'un plateau au temps final (t_f). Le pourcentage de DPPH° restant en fin de cinétique, généralement atteint pour t_f = 14 h, pour chaque concentration en antioxydant est exprimé comme suit (**Eq. 5**) :

$$\%\ \text{de DPPH°}\ \text{résiduel} = \frac{\text{DPPH° résiduel (abs. mesurée au plateau à } t_f) * 100}{\text{DPPH° initial (abs. DPPH° 60 µM à } t_0)} \quad (\mathbf{5})$$

Le CE 50 correspond à la concentration efficace d'antioxydant nécessaire pour faire disparaître 50 % de DPPH° initial : plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant. Le CE 50 est exprimé en mM pour les composés purs et en mM équivalent cystéine avant chauffage pour les PRM et les composés néoformés préparés avec des réactants thiolés. Les écart-types ont été calculés à partir d'au moins trois séries d'expériences réalisées avec des solutions de PRM ou de mélanges préparés extemporanément.

6.2. Mesure du pouvoir antiradicalaire par le test AAPH°

Les composés « azo » (R–N=N–R) sont couramment utilisés comme initiateurs de réaction dans différents tests *in vitro* de mesure de pouvoir antioxydant. Ces composés sont utiles à l'étude quantitative des cinétiques d'oxydation des lipides et d'anti-oxydation car ils génèrent des radicaux à une vitesse constante et reproductible.

Le test AAPH° permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire des antioxydants en milieu émulsionné. L'AAPH° (2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochlorure) est un initiateur chimique de l'oxydation lipidique qui, porté à 37 °C, produit un radical AAP°. En solution et en présence d'oxygène, ce radical AAP° forme un radical AAPOO° qui réagit par la suite avec les acides gras (RH) donneurs d'hydrogène. Il apparaît alors un radical lipidique R° qui absorbe à 234 nm en raison de la présence de doubles liaisons conjuguées (**Liegeois *et al.*, 2000**) selon les réactions suivantes :

AAP° + O_2 → AAPOO°

AAPOO° + RH → AAPOOH + R°

Les antioxydants (AOH) entraînent la réduction des radicaux R° en RH, ce qui se traduit par un retard de la l'augmentation de l'absorbance à 234 nm selon la réaction : R° + AOH → RH + AO°
Ainsi, une augmentation de la concentration en antioxydant provoque la prolongation du retard de l'apparition des dienes conjugués.

Une émulsion d'acide linoléique est préparée selon la méthode **Surrey** (**1964**). 250 µL d'acide linoléique sont ajoutés à un mélange contenant 4,5 mL de tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 et 0,30 g de Tween 20. Après ajout de 1 mL de soude 1 M, le volume est ajusté à 50 mL avec une solution de tampon borate 0,05 M à pH 8. Le mélange est agité une minute aux ultra-sons. Cette émulsion d'acide linoléique (16 mM) se conserve à 4 °C quelques jours, sous azote et à l'obscurité. La solution d'AAPH° 0,04 M est préparée dans la solution de tampon phosphate 0,05 M à pH 7,4 et peut se conserver au maximum un mois à 4 °C.

Pour les mesures spectrophotométriques, 30 µL de substrat lipidique sont ajoutés à 2,81 mL de solution de tampon phosphate 0,05 M à pH 7,4 préalablement incubés pendant 10 minutes à 37 °C. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 150 µL de solution d'AAPH° (0,04 M). Ces cinétiques sont réalisées en présence d'antioxydant (10 µL) ajouté à différentes concentrations. Pour chaque concentration d'antioxydant, la mesure est réalisée contre une cuve de référence contenant 2,84 mL de tampon phosphate 0,05 M pH 7,4, 10 µL d'antioxydant et 150 µL d'AAPH° (témoin sans substrat). Il est par ailleurs nécessaire de faire un témoin négatif pour vérifier que l'antioxydant (à la concentration la plus élevée) n'a pas d'effet sur l'AAPH° seul.

Réalisée à 37 °C, la mesure de l'absorbance à 234 nm au cours du temps permet de suivre les cinétiques de formation des dienes conjugués. Les courbes ainsi obtenues permettent la détermination du temps d'inhibition (T inh) comme étant l'intersection des tangentes des phases d'initiation et de propagation. La droite est obtenue en traçant l'évolution du temps d'inhibition en fonction de la concentration d'antioxydant. La pente de la droite s'accroît avec le pouvoir antioxydant de la substance testée.

La **figure 31** présente pour la cystéine, le type de courbe obtenu pour ce test et la lecture du temps d'inhibition. La concentration maximale des composés lors de ce test est de 50 mM. Pour le PRM, elle est exprimée en équivalent cystéine avant chauffage et correspond donc au PRM dilué 5 fois. A cette concentration, ni le HMF, ni le furfural n'ont un pouvoir antioxydant puisque les courbes en présence de 50 mM de furfural ou de HMF sont confondues avec celle du témoin (eau).

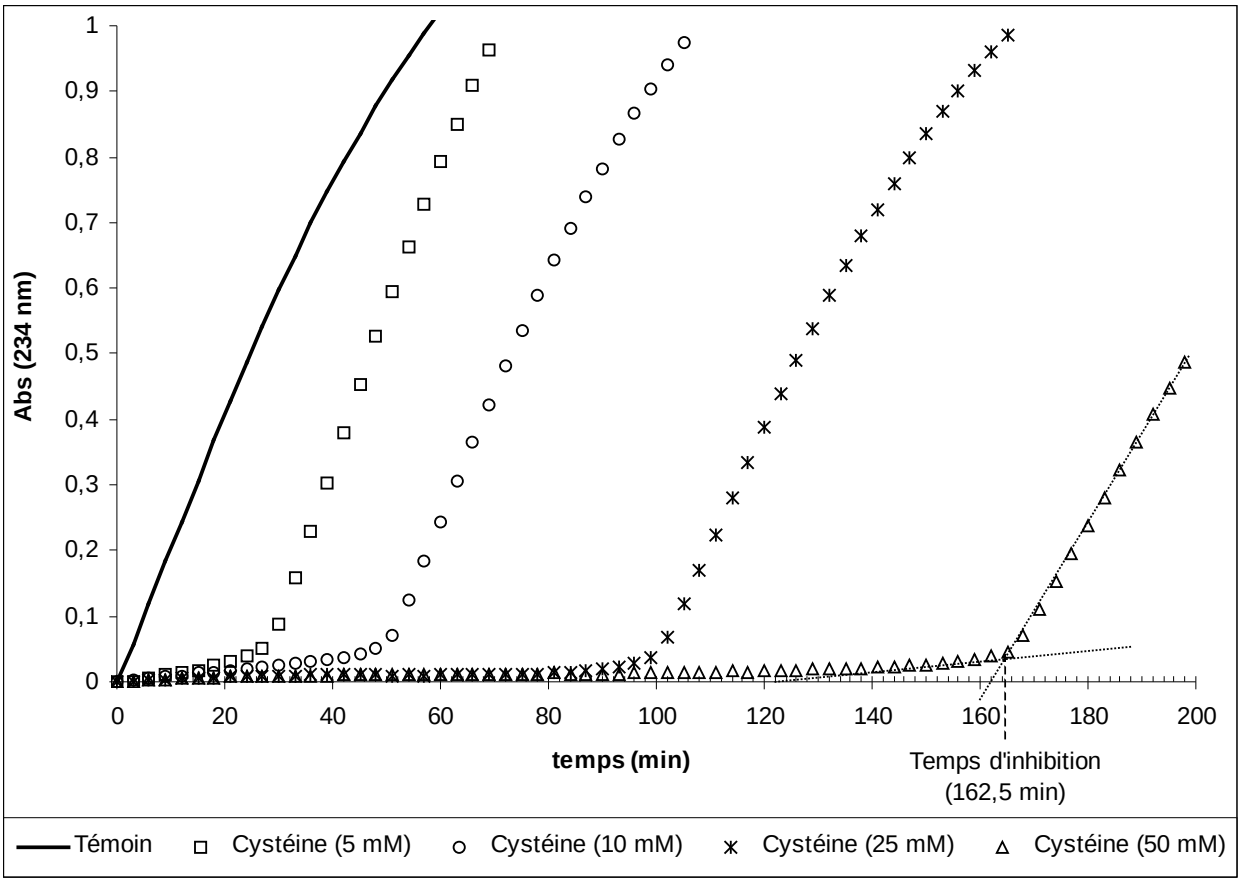
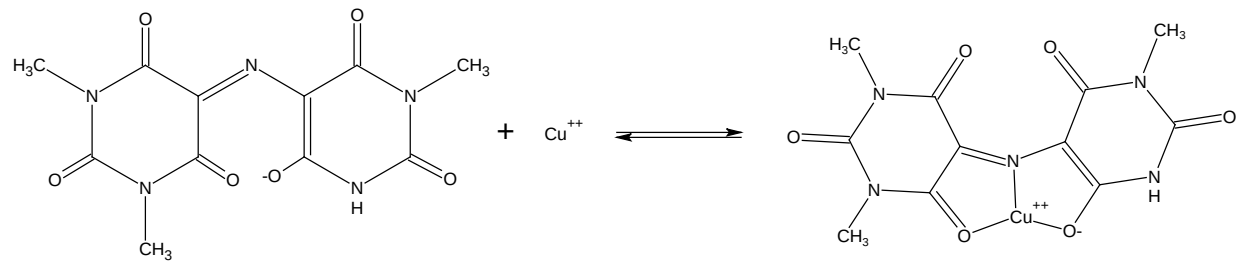


Figure 31 : Courbes expérimentales obtenues dans la mesure du pouvoir antiradicalaire par le test AAPH° mettant en évidence un temps d'inhibitio n de l'oxydation de l'acide linoléique en présence de composés antioxydants

6.3. Mesure du pouvoir chélateur du cuivre en utilisant le tétraméthylmurexide (TMM)

La mesure du pouvoir chélateur des PRM, des composés néoformés et des molécules témoins, est réalisée en utilisant la méthode spectrophotométrique (spectrophotomètre à barrette de diodes Hewlett Packard 8452 A, Bracknell, Royaume Uni) décrite par **Asakura *et al.* (1990)** et modifiée par **Maillard *et al.* (2007)**, en présence d'un agent séquestrant des métaux : le tétraméthylmurexide (TMM) présenté en **figure 32**. Le TMM libre (noté TMM) présente un maximum d'absorption à 530 nm mais en présence de cuivre Cu (II), il forme un complexe TMM-Cu ayant un maximum d'absorbance à 480 nm.



<u>Figure 32</u> : Réaction de dosage des ions cuivriques libres en utilisant le tétraméthylmurexide (TMM)

L'association entre le Cu (II) et le TMM suit l'équilibre : TMM + Cu ⇆ TMM–Cu avec une constante de dissociation (**Eq. 6**) :

$$K_d = \frac{[\mathrm{TMM}]\,[\mathrm{Cu}]}{[\mathrm{TMM{-}Cu}]} \qquad (\mathbf{6})$$

En supposant que le TMM ne fixe qu'un seul ion Cu (II), les mesures d'absorbance permettent de déterminer le coefficient d'extinction molaire (ε) pour le TMM et le TMM-Cu dans un milieu réactionnel contenant du $CuSO_4$.

D'après la loi de Beer-Lambert, en considérant que seuls le TMM libre et le TMM complexé absorbent la lumière à 530 et 480 nm respectivement, l'absorbance peut s'écrire (**Eq. 7**) :

$$A = (\varepsilon_\lambda^{\mathrm{TMM}}[\mathrm{TMM}] + \varepsilon_\lambda^{\mathrm{TMM-Cu}}[\mathrm{TMM{-}Cu}]) \times \ell \qquad (\mathbf{7})$$

Où $\varepsilon_\lambda^{\mathrm{TMM}}$ et $\varepsilon_\lambda^{\mathrm{TMM\text{-}Cu}}$ représentent les coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$) à une longueur d'onde (λ) donnée, [TMM] et [TMM-Cu] les concentrations (M) de TMM libre et complexé, *A* l'absorbance mesurée dans une cuve de ℓ = 1 cm.

Les coefficients molaires du TMM libre à 530 et 480 nm ($\varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM}}$ et $\varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM}}$) sont déterminés en l'absence de $CuSO_4$ en mesurant A_{530} et A_{480} après ajout de 1 mM de TMM à 3 mL de solution tampon hexamine-HCl. Les coefficients molaires du TMM complexé ($\varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM\text{-}Cu}}$ et $\varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM\text{-}Cu}}$) sont déterminés à ces mêmes longueurs d'onde en présence d'un excès de $CuSO_4$ (5 mM). Ainsi dans un milieu contenant du TMM et du TMM-Cu, on obtient le système d'équation suivant (**Eq. 8**):

$$\begin{cases} A_{530} = (\varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM}}[\mathrm{TMM}] + \varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM-Cu}}[\mathrm{TMM{-}Cu}]) \times \ell \\ A_{480} = (\varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM}}[\mathrm{TMM}] + \varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM-Cu}}[\mathrm{TMM{-}Cu}]) \times \ell \end{cases} \qquad (\mathbf{8})$$

Il est alors possible, en considérant les équations précédentes, de calculer les concentrations en TMM libre et complexé dans le milieu réactionnel (**Eq. 9**) :

$$[\mathrm{TMM}]=\frac{(\varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM-Cu}}\times \mathrm{A}_{530})-(\varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM-Cu}}\times \mathrm{A}_{480})}{(\varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM-Cu}}\times \varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM}})-(\varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM-Cu}}\times \varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM}})} \qquad (\mathbf{9})$$

$$[\mathrm{TMM-Cu}]=\frac{(\varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM}}\times \mathrm{A}_{530})-(\varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM}}\times \mathrm{A}_{480})}{(\varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM}}\times \varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM-Cu}})-(\varepsilon_{530}^{\mathrm{TMM}}\times \varepsilon_{480}^{\mathrm{TMM-Cu}})}$$

Les mesures sont réalisées en mélangeant 100 µL de TMM (1 mM) avec 3 mL de solution de $CuSO_4$ (0 – 5 mM) à la température du laboratoire. Les absorbances à 480 et 530 nm sont mesurées après 10 min et les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Grafit 4 (Erithacus Software Limited) en appliquant l'équation de Scatchard permettant de déterminer la valeur de la constante de dissociation (K_d) pour le cuivre.

Des quantités croissantes de solutions de PRM, de produits néoformés et de composés témoins, sont ajoutées au mélange réactionnel contenant du TMM partiellement complexé (100 µL à 1 mM) avec du $CuSO_4$ (0,05 mM). Les PRM sont en compétition avec le TMM pour chélater le cuivre et déplacent donc l'équilibre réactionnel de complexation du TMM avec le cuivre. Ils favorisent ainsi la décomplexation du TMM-Cu pour reformer du TMM libre. Le cuivre introduit initialement dans le test se répartit alors sous trois formes : le cuivre libre (Cu), le cuivre complexé au TMM (TMM-Cu) et le cuivre complexe aux PRM (ou produits néoformés) noté PRM-Cu : [Cu total] = [Cu] + [TMM-Cu] + [PRM-Cu]. Pour chaque quantité de solution d'échantillons testés (PRM et produits néoformés), les concentrations en TMM et en TMM-Cu sont déterminées d'après le système d'**équations 9**, grâce à la mesure de A_{480} et A_{530}. L'**équation 6**, permet alors de calculer [Cu] et d'en déduire [PRM-Cu].

L'activité chélatrice du cuivre est calculée à partir de la pente de la droite exprimant la différence entre la concentration en cuivre libre en présence de TMM et la concentration en cuivre libre en présence des différentes substances testées, en fonction de la concentration. L'EDTA (3 mM – 0-50 µL) a été sélectionné comme agent chélatant de référence. La pente observée pour l'EDTA dans ces conditions de test est proche de 1. Une pente élevée indique un fort pouvoir chélateur du Cu (II).

7. LE TEST D'AMES POUR MESURER L'ACTIVITE MUTAGENE ET ANTIOXYDANTE DES PRM

Les expériences de mesure de mutagénicité et du pouvoir antioxydant des différents composés testés ont été réalisées sous la direction du professeur Karl-Heinz Wagner (*University of Vienna, Department of Nutritional Sciences*) et avec l'aide de Stephan Pöchtrager (étudiant en master). Cette étude a été soutenue par le COST Cooperation 927 ("Thermally processed Foods: possible health implications ") sous la forme d'une mission scientifique courte (short term scientific mission n° 927-02812) de 3 mois.

7.1. Les souches bactériennes utilisées

Le test d'Ames, parfois appelé test à *Salmonella*/microsome ou à *Salmonella* ou encore mutatest, consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées dans le test sont des souches porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation **His$^-$** rend les souches incapables de se développer sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations **His$^-$** reversent spontanément vers **His$^+$** : les cellules retrouvent leur capacité à croître sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries **His$^-$** à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses **His$^+$** (**Mortelmans et Zeiger, 2000**).

Deux souches bactériennes de nature génétique différente sont utilisées pour cette étude (TA98 et TA102). Ces souches sont porteuses de mutations **His$^-$** différentes qui permettent de tester des agents mutagènes variés. En plus des mutations spécifiques sur l'opéron **His**, ces souches possèdent des caractères génétiques qui permettent d'augmenter leur sensibilité à l'agression génotoxique. Les caractéristiques génotypiques de ces deux souches sont résumées dans le **tableau 12**. Ces deux

souches portent la mutation *rfa* qui affecte la structure de la membrane externe lipolysaccharidique et augmente la perméabilité des souches aux molécules de masses moléculaires élevées. De plus, l'introduction du plasmide pKM101 dans ces souches augmente leur sensibilité aux mutations induites par une exposition aux UV et aux produits chimiques tout en leur conférant une résistance à l'ampicilline, ce qui permet de facilement détecter la présence du plasmide.

Une mutation par délétion du gène de la biotine rend la souche TA98 biotine-dépendante, et la mutation dans le gène *uvrB-bio* dans cette même souche bloque le processus de réparation par excision-synthèse des lésions de l'ADN. La souche TA102 porte la mutation *HisG428* sur le plasmide pAQ1 introduit en multicopie pour augmenter le nombre de sites de mutation. Cette souche contient par ailleurs un gène *uvrB* fonctionnel qui autorise la détection de produits hautement toxiques provoquant des réticulations de l'ADN. Elle est plus spécifiquement utilisée pour donner des informations sur le stress oxydatif provoqué par les composés chimiques testés tandis que la souche TA98 donne des informations sur des mutations portant sur la séquence de l'ADN.

Tableau 12 : Génotypes des souches de Salmonelles utilisées dans le test d'Ames (TA98, TA102)

Souche	Génotype mutation	Bio ubrB	Défaut de la membrane lipolysaccharidique	Plasmide
TA98	*HisD352*	Mutation par délétion	*rfa*	pKM101
TA102	*HisG429*	Souche sauvage	*rfa*	pKM101 ; pAQ1

L'intégrité génétique et le taux de mutation spontané des souches de *Salmonella typhimurium* ont été vérifiés selon le protocole publié par **Mortelmans et Zieger** (**2000**).

7.1.1. Préparation des souches bactériennes initiales

Les souches bactériennes commerciales sont mises en culture dans un milieu contenant :

- 3,2 g / 200 mL d'Agar
- 4,3 mL de solution de Vogel-Bonner
- 10 mL de glucose 40 %
- 2,17 mL de solution d'histidine (0,25g / 50 mL)
- 1,3 mL de solution de biotine (6,1 mg / 50 mL)
- 682 µL de solution d'ampicilline (0,2 g / 25 mL 0,2 N NaOH)

+ 54,3 µL de solution de tétracycline (80 mg / 10 mL) pour la souche TA102

et incubées pendant 48 h à 37 °C sur milieu minimum.

La dépendance de ces souches à l'histidine, la biotine, la présence du plasmide pKM101 (résistance à l'ampicilline), la présence du plasmide pAQ1 (résistance à la tétracycline), la combinaison du marqueur *rfa* et la délétion *ubrB* sont testées avant l'utilisation de ces colonies comme source bactérienne.

7.1.2. Préparation des cultures bactériennes

Une colonie provenant des souches bactériennes est prélevée des boîtes de Pétri porteuses des souches bactériennes initiales (*master plates*) et introduite dans 12 mL de bouillon de culture (5 g / 200 mL + 0,625 mL de solution d'ampicilline à 0,2 g / 25 mL 0,2 N NaOH filtrée stérilement). Les bactéries sont ensuite mises à incuber pendant 12 h à 37 °C. Après les 12 h d'incubation, cette préparation (*overnight culture* : ONC) est utilisée comme source bactérienne dans le test d'Ames.

7.2. Mesure de la mutagénicité des PRM

Le protocole utilisé est adapté de **Maron et Ames (1983)** avec une pré-incubation de 25 min à 37 °C. La pré-incubation est utilisée pour permettre un contact plus étroit entre les souches et les composés dont la mutagénicité est testée tout en augmentant la sensibilité du test. Certains composés ne sont mutagènes qu'après activation métabolique ou au contraire sont inactivés lors de leur métabolisation. Il est donc important de tester le pouvoir mutagène des composés chimiques en présence et en l'absence

d'activation métabolique. Les bactéries ne possédant pas de système d'oxydation métabolique, une source exogène d'origine mammifère d'activation métabolique doit être ajoutée lors du contact entre les bactéries et les mutagènes potentiels. Pour cela, un système d'oxydation métabolique extrait de rongeurs a été introduit dans le test d'Ames (**Ames *et al.*, 1973** ; **Mortelmans et Zeiger, 2000**). Ce système d'activation métabolique est composé du surnageant après centrifugation (9000 g) de foie de rats préalablement traités à l'Aroclor 1254 (fraction microsomale notée S9). Dans le test, le S9 est ajouté en présence de NADP et de cofacteurs nécessaires à l'oxydation (**Maron et Ames, 1983**).

L'utilisation de composés chimiques dont l'activité mutagénique est connue (contrôles positifs), spécifiques des souches utilisées et des conditions de test permettent de confirmer la spécificité, les propriétés de réversion des souches ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique. Pour les deux souches utilisées (TA98 et TA102), le 2,4,7-trinitro-9-fluorénone et l'azoture de sodium ont été utilisés comme contrôles positifs sans et avec activation métabolique respectivement. Le contrôle négatif a été réalisé avec de l'eau et l'ensemble des tests effectués est reporté dans le **tableau 13**.

Tableau 13 : Echantillons et conditions du test d'Ames

Echantillons	concentrations (mg / boîte de Pétri)	Souches et conditions de tests
PRM C	0,05	TA 98 :
$Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,\ 100\ mM}$	0,1	$S9^-$; $H_2O_2^-$ $S9^+$; $H_2O_2^-$
Cystéine chauffée (100 mM ; 115 °C - 200 min)	0,5	TA 102 :
Cystéine	1	$S9^-$; $H_2O_2^-$ $S9^-$; $H_2O_2^+$
HMF	5	$S9^+$; $H_2O_2^-$ $S9^+$; $H_2O_2^+$

7.2.1. Propriétés mutagènes des PRM mesurées par le test d'Ames

Les différents composés (lyophilisés et purs) sont dilués dans l'eau et utilisés à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 mg / boîte de Pétri). Les produits lyophilisés testés sont :

- Le PRM C : glucose (1 M) / cystéine (0,25 M) chauffés à pH 2 pendant 200 min à 115 °C
- La cystéine (0,1 M) chauffée pendant 200 min à 115 °C
- Le mélange cystéine chauffée / HMF (0,1 M).

A titre de contrôle et pour mieux comprendre l'origine des propriétés mutagènes de ces produits, le HMF et la cystéine (non chauffée) sont également testés.

Pour un test standard de mutagénicité, les différentes substances mélangées sont (**figure 33**) :

- 500 µL de tampon phosphate de sodium stérile (20 mM, pH 7,4).
- 100 µL de suspension bactérienne (ONC) fraîchement préparée
- 200 µL de composés dissous dans l'eau et filtrés stérilement

Ce mélange est ensuite incubé pendant 25 min à 37 °C puis 2 mL de « top Agar » sont ajoutés juste avant dépôt sur les boîtes de Pétri. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37 °C pendant 48 h.

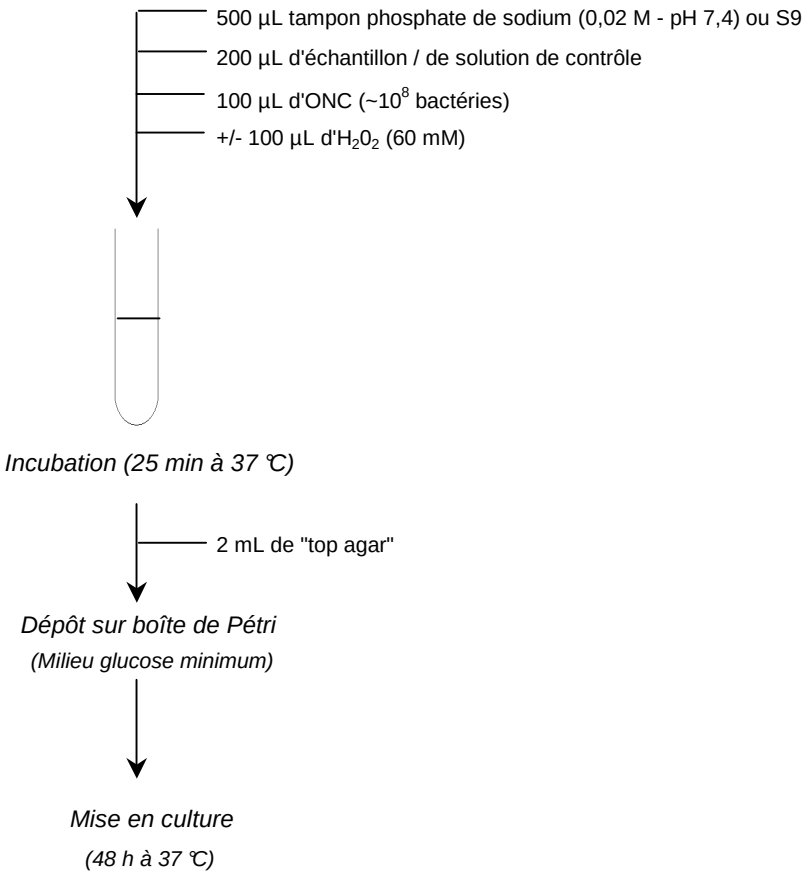


Figure 33 : Schéma du protocole pour test d'Ames

Comme le recommandent **Mortelmans et Zeiger** (**2000)**, trois boîtes de Pétri sont réalisées pour chaque concentration et chaque test est répété dans les mêmes conditions. Pour qu'un composé soit dit mutagène, le nombre de colonies formées (colonies réverses ou révertantes) sur les boîtes portant ce composé doit être au moins deux fois supérieur au nombre de colonies réverses spontanées portées par les boîtes de contrôle négatif. De plus, un effet dose sur le nombre de colonies doit être montré.

7.2.2. Mesure du pouvoir antioxydant des PRM dans le test d'Ames

De la même façon que pour les tests de mutagénicité, les propriétés antioxydantes des composés sont testées à 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 mg / boîte de Pétri. La souche TA102 est utilisée comme marqueur d'oxydation de l'ADN en présence de 60 mM d'H_2O_2. Les contrôles contiennent alors également 60 mM d'H_2O_2. Lors d'une mesure de pouvoir antioxydant, sont mélangés :

- 500 µL de tampon phosphate de sodium stérile (20 mM, pH 7,4).
- 100 µL de suspension bactérienne (ONC) fraîchement préparée
- 200 µL de composés dissous dans l'eau à 60 mM d'H_2O_2 et filtrés stérilement

Ce mélange est ensuite incubé à 37 °C pendant 25 min.

Un composé est considéré comme antioxydant si le nombre total de colonies réverses par boîte de Pétri est significativement ou au moins deux fois inférieur au nombre de colonies réverses spontanées.

7.2.3. Analyse statistique des résultats

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne du nombre de colonies réverses par boîte de Pétri sur les six (12 dans le cas du contrôle négatif) boîtes réalisées. L'analyse de la variance à un facteur des différentes réponses au test de mutagénicité observées pour les différentes concentrations sont analysés à l'aide du logiciel Statgraphics centurion XV (StatPoint, Inc Herndon, Virginia – USA). Les différences entre le nombre de colonies révertantes observé en présence du composé testé et le contrôle négatif sont analysées en utilisant un test de Student après vérification de la distribution normale du nombre de colonies observées pour chacune des conditions de tests. Les différences sont considérées significatives à la valeur $p < 5$ %.

8. MESURE DE LA COULEUR ET APPLICATION DES PRM POUR INHIBER LE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

Après avoir été pelées, les pommes, pommes de terre ou aubergines (50 g) sont coupées en petits morceaux et homogénéisées (Ultra-Turrax T 25 - IKA Labortechnik) avec 50 mL d'eau (témoin), de solutions de cystéine, d'un mélange cystéine chauffée (115 °C – 200 min) / HMF, de métabisulfite de sodium ou de PRM (glucose-cystéine : 1 / 0,25 M – pH 2 – 115 °C ; 200 min) à différentes concentrations.

La couleur de ces broyats est analysée à l'aide d'un spectrophotomètre (CM 3500d, Konica, Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) dans le système CIELab de représentation des couleurs, développé par la CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) en 1976. Les coordonnées chromatiques (L^*, a^*, b^*) d'un échantillon d'environ 1 cm de hauteur, placé dans une boîte de Pétri (Ø 4 cm – verre optique) sont mesurées par réflectance à la température du laboratoire (≈ 25 °C) durant les 60 min qui suivent le broyage. L'illuminant est de type D65 (lumière type « lumière du jour ») avec l'observateur normal à 10 °. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de trois mesures. L'évolution de la couleur au cours du temps est exprimée par rapport aux valeurs initiales après broyage en utilisant ΔL^*, Δa^*. En effet, ces facteurs sont les plus représentatifs du changement de couleur lors du brunissement enzymatique. La valeur Δb^* et la différence totale de couleur $\Delta E^* = \{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}^{½}$ ont été mesurées et calculées mais elles ne seront pas présentées car dans les conditions de tests, la variance de Δb^* ne dépend pas de l'échantillon (additif et / ou concentration) et affecte directement la valeur de la différence totale de couleur ΔE^*.

Lors de la mise en œuvre des produits inhibiteurs, des solutions diluées d'échantillons ont été utilisées directement à 1 ou 2 mM pour la pomme de terre et la pomme respectivement. Mais afin de pouvoir établir une correspondance entre les tests de mutagénicité et les essais technologiques, les produits lyophilisés (PRM et mélange cystéine chauffée – HMF) ont également été testés à des concentrations de 0,5 et 1 $g.L^{-1}$ pour la pomme de terre et la pomme respectivement.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. CARACTERISATION DES SYSTEMES ENZYMATIQUES

1.1. La PPO de pomme de terre

1.1.1. Extraction / Purification

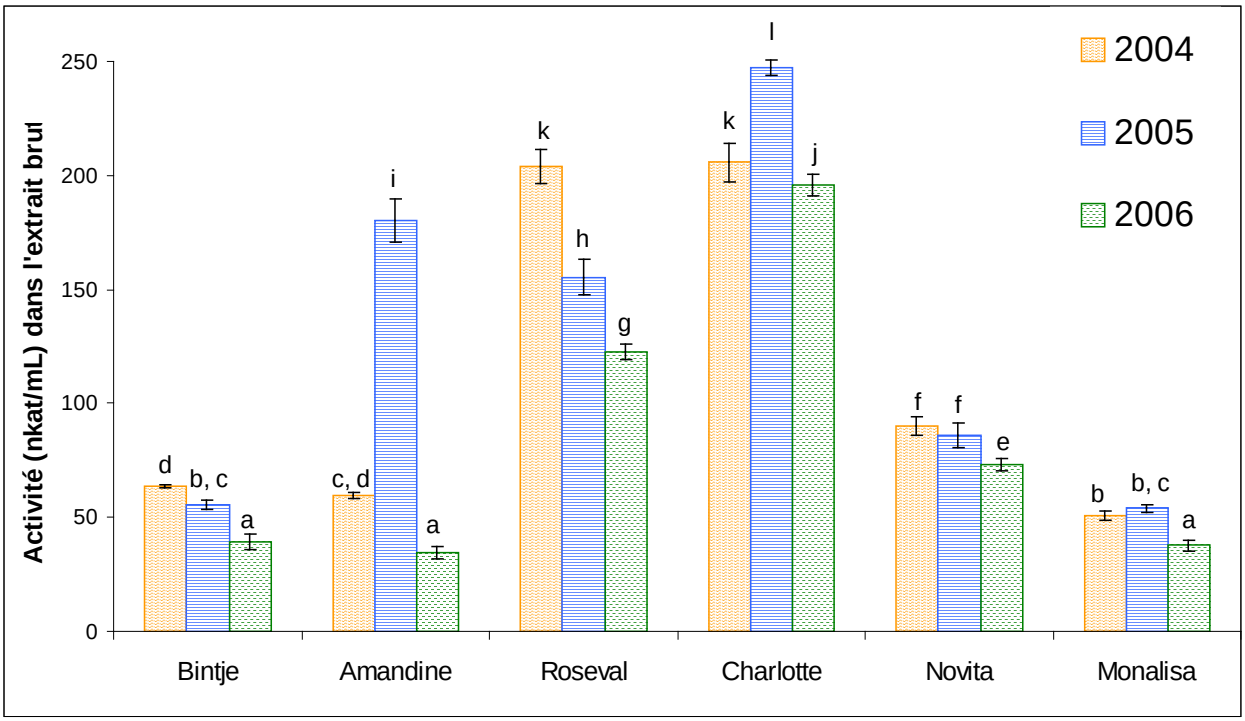
Etude variétale

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de choisir la variété de pomme de terre renfermant le plus d'activité PPO. L'extraction de l'activité enzymatique d'extraits bruts (30 g de pulpe / 50 mL de milieu d'extraction) de six variétés de pomme de terre est réalisée au cours des trois dernières années (2004 – 2006) et l'activité PPO des différents extraits bruts enzymatiques est mesurée par polarographie (substrat : 4-MC 20 mM pH 4,5).

Le milieu d'extraction est alors constitué de tampon A auquel est ajouté de l'acide ascorbique (15 mM) pour réduire les quinones en phénols et ainsi éviter leur polymérisation et l'inactivation de l'enzyme au

cours de l'extraction. De plus, le milieu d'extraction est additionné de 0,5 % de Triton X 100 pour assurer la solubilisation des enzymes liées à des structures membranaires.

Une étude préalable sur les capacités de brunissement observées *de visu* sur les mêmes extraits a montré que la variété « Mona Lisa » était la plus sensible au brunissement. Cette propriété de cette variété avait déjà été signalée (**Cantos *et al.*, 2002**). Cependant, d'après la **figure 34** présentant les activités PPO des extraits bruts des différentes variétés, la variété « Charlotte » est celle qui montre les plus fortes activités au cours des trois années. La faculté de brunissement des pommes de terre n'est donc pas uniquement due à l'activité PPO présente dans les tubercules mais également à d'autres paramètres tels la quantité de polyphénols pouvant être oxydés, le cultivar et l'année de récolte. La relation entre le brunissement et la teneur en phénols des pommes de terre de différentes variétés a été établie dès 1977 (**Matheis et Belitz, 1977**).



Les groupes homogènes (où il n'y a pas de différence significative au seuil de 5 %) portent une lettre identique.
La méthode utilisée pour discriminer entre les moyennes est la procédure des différences significatives minimales de Fisher.

Figure 34 : Activité PPO de l'extrait brut de pommes de terre de différentes variétés récoltées en 2004, 2005 et 2006

La variété « Charlotte » qui a été choisie comme source de PPO de tubercule de pomme de terre pour les expériences ultérieures, est relativement récente (inscrite au catalogue français en 1981). Elle a pour origine génétique Hansa X Danaé. Il s'agit d'une variété semi-précoce (ramassage 100 jours après la plantation) qui forme des tubercules oblongs allongés, très réguliers, à la peau et la chair jaune. Cette

variété se montre peu sensible aux taches de rouille, au cœur creux et aux taches cendrées. La Charlotte est appréciée pour ses qualités culinaires et de conservation. Un lot différent de pommes de terre a été acheté chaque année à maturité peu de temps avant les expériences de purification de la PPO.

Essais préliminaires

Les essais préliminaires ont permis de déterminer les conditions d'extraction de la PPO de pomme de terre et d'étudier les effets de différents additifs sur la quantité d'activité PPO présente dans les extraits bruts préparés à partir de 100 g de pomme de terre dans 100 g de tampon A.

D'après les **figures 35 (a – e)**, un maximum d'activité est extrait par une solution d'extraction composée de solution de tampon phosphate A additionnée d'acide ascorbique (10 mM), de cystéine (5 mM) et à laquelle est ajouté du Triton X-100 (0,5 %).

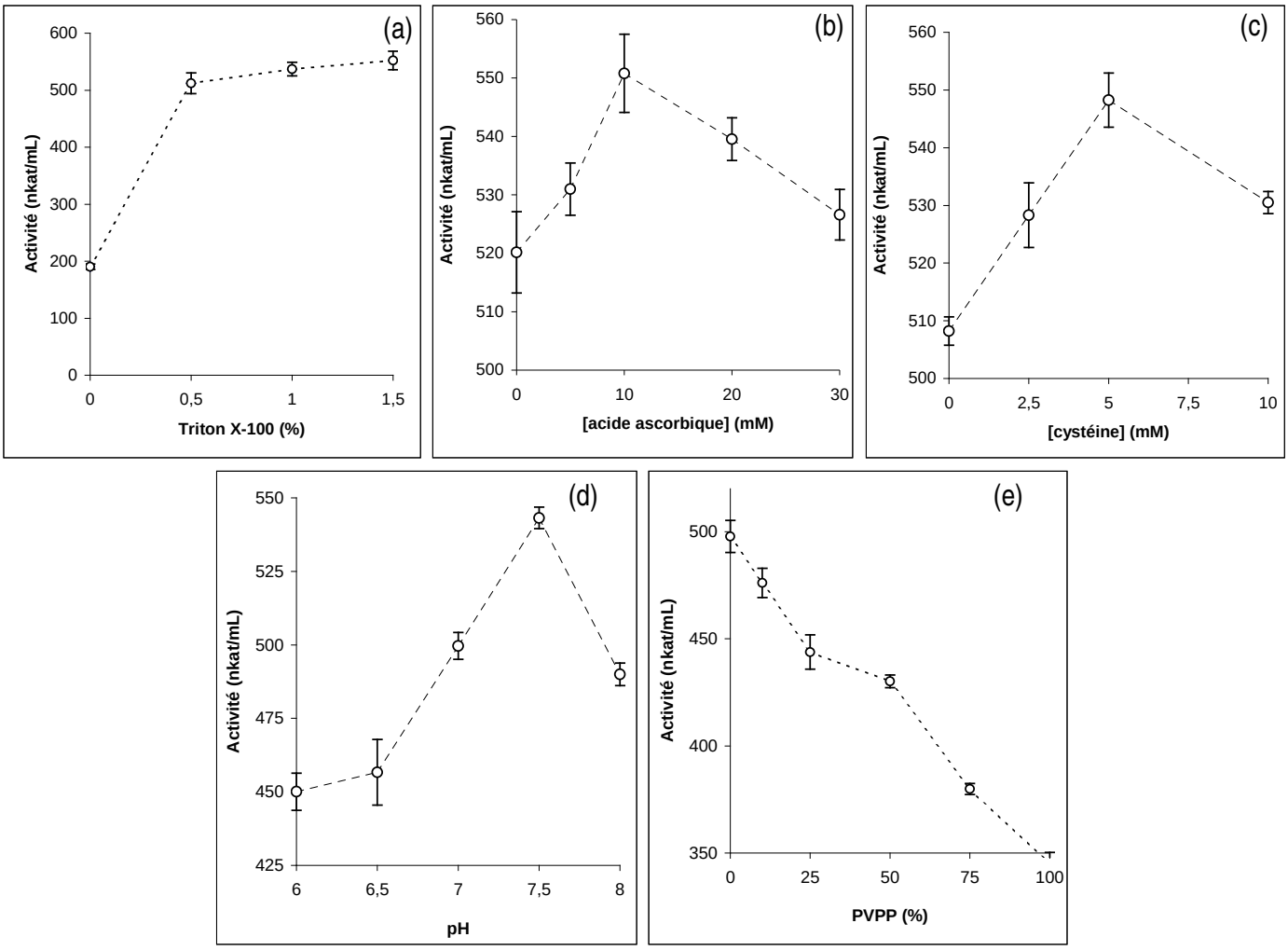


Figure 35 : Activité PPO de l'extrait brut de pomme de terre en fonction du pourcentage de Triton X-100 (a), de la concentration en acide ascorbique (b), de la concentration en cystéine (c) , du pH de la solution de tampon phosphate (d) et du pourcentage de PVPP (e) dans le milieu d'extraction.

Taux de purification

Le **tableau 14** présente les rendements et taux de purification au cours du procédé de purification de l'activité PPO de 100 g de pulpe de pomme de terre. Ce procédé comprend principalement suite à l'extraction : des précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium (10 – 70 %), une dialyse et une chromatographie d'interactions hydrophobes.

Jusqu'à l'étape de dialyse, le rendement reste supérieur à 90 % mais la PPO de pomme de terre semble sensible à ce procédé et accuse une perte d'environ 40 % d'activité PPO au cours de cette étape de purification pourtant nécessaire avant la chromatographie d'interactions hydrophobes.

Tableau 14 : Rendement et taux de purification de l'activité PPO de pomme de terre

Fraction	Volume (mL)	Protéines (mg)	Activité totale (µkat)	Activité spécifique ($\mu kat.mg^{-1}$)	Rendement par rapport à l'EB (%)	Taux de purification (Bradford)
EB	136	418	54	0,130	-	1,00
S10	136	430	66	0,154	121,8	1,18
C70	40	278	49	0,177	90,8	1,36
C70 – D	53	282	29	0,102	53,1	0,79
C70 - D + centrifugation	52,5	251	24	0,095	44,0	0,73
F 31	8	25	9	0,358	16,3	2,76
Fractions actives	16	40	14	0,350	26,0	2,69

D'après la **figure 36**, montrant le profil d'activité PPO et d'absorbance (280 nm) des fractions de chromatographie d'interactions hydrophobes sur gel TSK-butyl Toyopearl 650 M, il existe au moins deux isoformes de la PPO de pomme de terre dont la principale est éluée avec 0,2 M en sulfate d'ammonium.

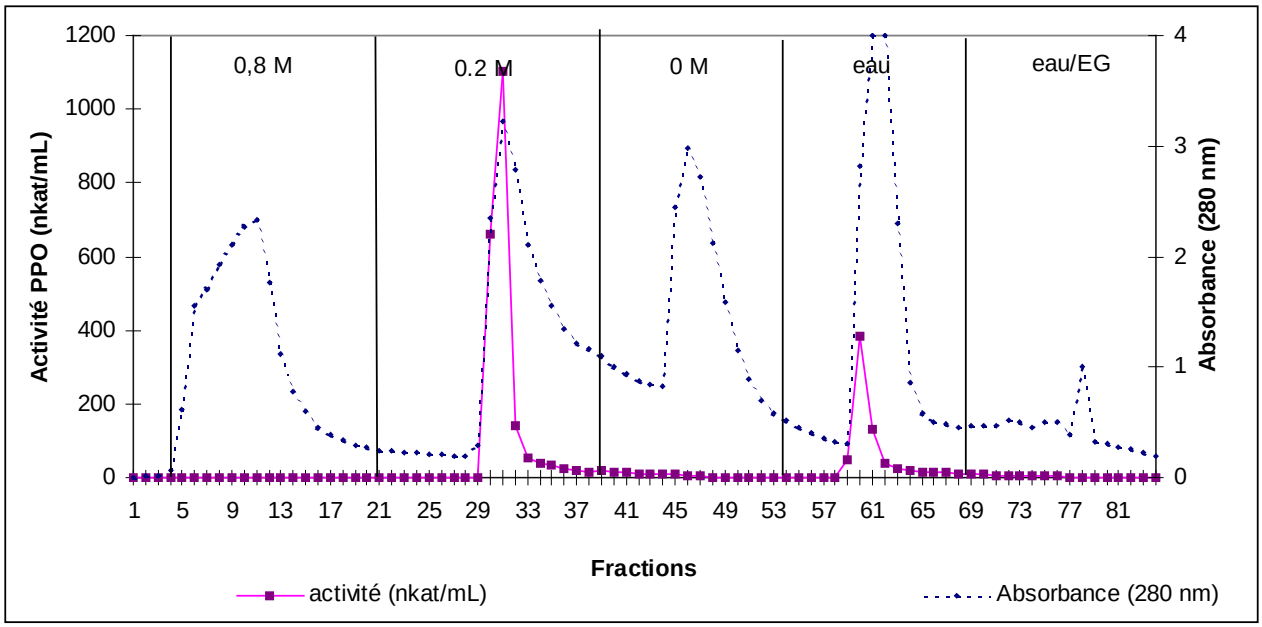


Figure 36 : Profils d'activité PPO et d'absorbance (280 nm) des fractions issues de la chromatographie d'interactions hydrophobes sur gel TSK-butyl 650 M Toyopearl

Les différentes équipes qui ont travaillé sur la PPO de pomme de terre ont observé de multiples isoformes présentes simultanément dans les tubercules de pomme de terre (**Partington et Bolwell, 1996** ; **Pathak et Ghole, 1994**). Selon **Vámos-Vigyázó (1981)**, dans la pomme de terre, les formes natives et matures sont actives. La masse moléculaire de la forme native de la PPO est évaluée à environ 340 kDa par **Marri *et al.* (2003**). Par ailleurs, ces auteurs montrent en conditions totalement dénaturantes une bande unique de 69 kDa et en déduisent que la PPO de pomme de terre présente de multiples isoformes correspondant aux différents multimères. Ils soulignent également la forte tendance de cette protéine à l'agrégation en complexes de hauts poids moléculaires : une solution diluée de la protéine monomérique chargée sur une colonne Superdex 200 résulte en un pic unique présentant une forte activité PPO et élué dans le volume mort.

Malgré le faible taux de purification de la PPO de pomme de terre des fractions actives rassemblées (2,7), cette technique de purification a été retenue car simple et rapide, elle permet d'obtenir une fraction enzymatique stable (au moins 18 mois à – 20 °C) en 48 h. Le faible taux de purification observé est sans doute dû à la contamination par des glycoprotéines de réserves appelées patatine et qui représentent plus de 40 % des protéines solubles des tubercules de pomme de terre : la PPO de pomme de terre et la patatine ont des propriétés structurales et physico-chimiques proches et peuvent s'agréger sans entraîner la perte de l'activité PPO (**Pots *et al.*, 1999**).

Par ailleurs, les expériences d'électrophorèse en conditions natives avec une révélation par le nitrate d'argent montrent au moins 6 bandes protéiques. Cependant, les expériences en révélation spécifique en utilisant le 4-méthylcatéchol (20 mM) et l'acide chlorogénique (5 mM) à pH 4,5 n'ont pas permis de mettre en évidence la répartition des activités PPO sur les gels d'électrophorèse et n'ont donc pas permis la détermination des poids moléculaires des différentes isoformes de PPO dans l'extrait enzymatique.

1.1.2. Effet du pH sur l'activité PPO de pomme de terre

La **figure 37** montre l'effet du pH sur la vitesse initiale de la consommation en oxygène par la PPO de pomme de terre en utilisant deux substrats (4-méthylcatéchol - 20 mM et acide chlorogénique - 10 mM) préparés dans des solutions tampon citrate-phosphate (3,3 ≤pH ≤ 6,0) et phosphate (6,0 ≤ pH ≤ 7,5). Les pH supérieurs à 7,5 n'ont pas été envisagés en raison de l'oxydation très rapide et spontanée des substrats dans les milieux alcalins (**Li *et al.*, 2007**).

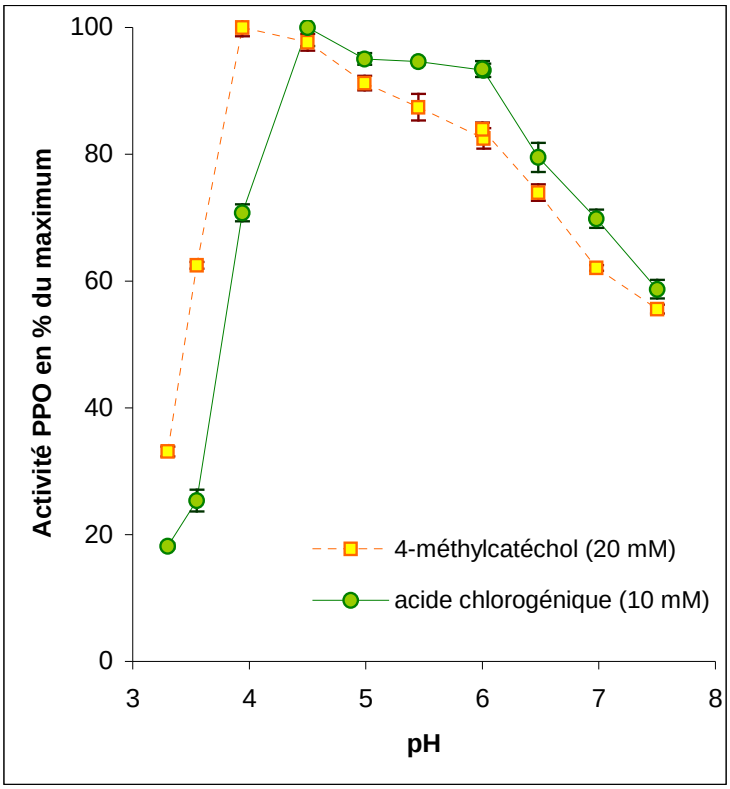


Figure 37 : Activité PPO de pomme de terre vis-à-vis du 4-méthylcatéchol (20 mM - ■) et de l'acide chlorogénique (10 mM - ○) en fonction du pH

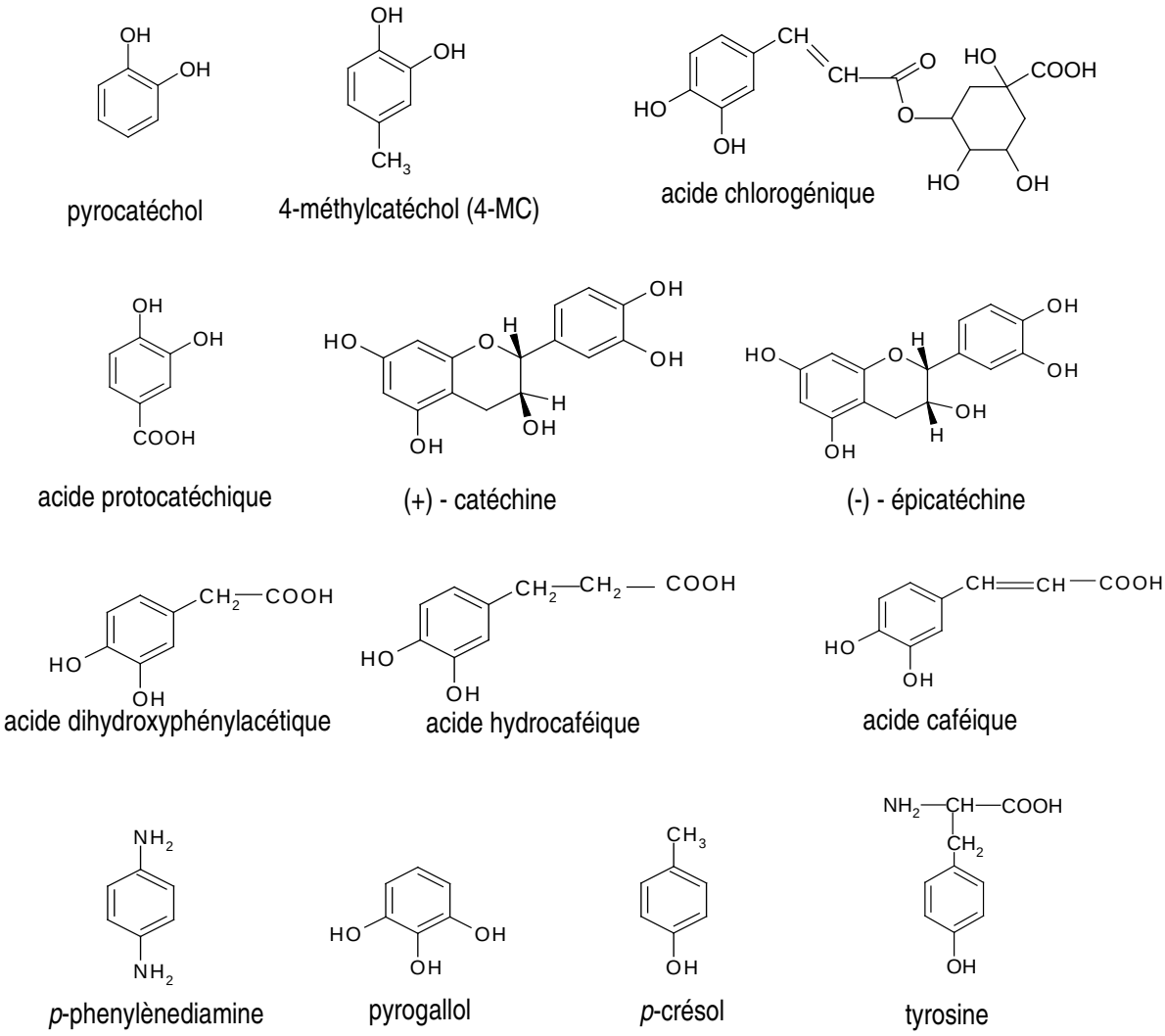
On observe un fort effet des pH très acides sur l'activité PPO de pomme de terre lorsque l'acide chlorogénique est utilisé comme substrat. Il ne subsiste que 25 % d'activité par rapport à l'activité maximale obtenue à pH 4,5 lorsque le milieu réactionnel est amené à pH = 3,5. Pour cette même valeur de pH et avec le 4-méthylcatéchol, l'activité mesurée représente près de 60 % de l'activité maximale obtenue entre pH 4 et pH 4,5.

L'évolution de l'activité suit ensuite la même tendance pour les deux substrats utilisés. Aux pH supérieurs à 5 et jusqu'à 6, l'activité PPO reste supérieure à 80 % du maximum pour décliner ensuite et atteindre 60 % à pH = 7,5.

L'activité PPO maximale est observée pour les deux substrats pour un pH voisin de 4,5. C'est donc cette valeur de pH qui sera choisie pour mesurer l'activité PPO de pomme de terre dans les études ultérieures. **Duangmal et Owusu-Apenten (1999)**, par des mesures d'absorbance à 420 nm décrivent une activité PPO maximale de l'extrait brut de pomme de terre, pour un pH d'environ 6,8 avec un plateau entre 4,4 et 6,0 en utilisant le 4-méthylcatéchol (20 mM) comme substrat. **Cantos *et al*. (2002)** observent pour l'activité PPO de pomme de terre extraite de 5 variétés différentes, une activité PPO maximale pour des valeurs de pH comprises entre 5,25 et 5,75. Différentes valeurs optimales de pH ont déjà été rapportées pour l'activité PPO de pomme de terre (**Patil et Zucker, 1965** ; **Matheis, 1987**). Cette valeur dépend de la variété, de la nature du substrat phénolique, du mode d'extraction de la PPO et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité PPO.

1.1.3. Spécificité des substrats

Afin d'étudier la spécificité de la PPO de pomme de terre vis-à-vis des composés phénoliques (**figure 38**), les valeurs des constantes cinétiques apparentes (K_m et V_m) pour la fraction purifiée de pomme de terre ont été déterminées (**tableau 15**) à pH 4,5 (tampon citrate-phosphate). La valeur du K_m est une constante pour chaque substrat et une enzyme particulière tandis que la valeur du V_{max} varie avec la quantité d'enzyme introduite dans le milieu réactionnel. Un substrat est d'autant meilleur qu'il a une affinité forte avec l'enzyme (faible K_m) et une valeur élevée du V_m (pour une quantité donnée d'enzyme). Un critère d'évaluation d'un substrat largement utilisé est l'efficacité catalytique exprimée par le ratio V_m / K_m car il correspond à une constante de vitesse pour de basses concentrations de substrat.



<u>Figure 38</u> : Structures des composés phénoliques utilisés comme substrats de la PPO de pomme de terre

L'acide chlorogénique, qui représente plus de 90 % des composés phénoliques endogènes des tubercules de pomme de terre, apparaît comme le substrat le plus efficace de la PPO à pH 4,5. La stéréospécificité de l'enzyme vis-à-vis des deux diastéréoisomères de flavan-3-ols n'est pas évidente en terme de K_m, elle est par contre plus nette en terme d'efficacité. En effet, la PPO de pomme de terre est 4 fois plus efficace avec la (-)épicatéchine qu'avec la (+)catéchine.

Concernant les phénols simples (4-méthylcatéchol, 4-MC ; pyrocatéchol et Dopa), l'efficacité de la catalyse de la PPO apparaît 8 et 20 fois plus faible vis-à-vis du pyrocatéchol et de la Dopa respectivement, comparée à celle du 4-MC. La PPO de pomme de terre ne présente pas d'activité monophénolase mesurable lorsque la catalyse est étudiée en présence de tyrosine ou de *p*-crésol mais elle est capable d'oxyder un triphénol comme le pyrogallol avec cependant une faible affinité.

<u>Tableau 15</u> : Valeurs des constantes cinétiques (V_m et K_m) apparentes et efficacité de différents composés phénoliques vis-à-vis de la PPO de pomme de terre (fraction purifiée)

Substrat à pH 4.5	V_m (nkat/mL)	K_m (mM)	V_m (% 4-MC)	Efficacité (V_m / K_m)
acide chlorogénique	186 ± 2,0	0,9 ± 0,1	57,2	202,1
4-méthylcatéchol (4-MC)	326 ± 2,9	1,8 ± 0,1	100,0	183,1
(-) épicatéchine	208 ± 2,4	1,3 ± 0,1	64,1	160,4
acide dihydroxyphénylacétique	177 ± 1,9	3,5 ± 0,2	54,6	50,7
acide hydrocaféique	317 ± 5,4	7,3 ± 0,3	97,5	43,6
(+) catéchine	59,3 ± 1,0	1,6 ± 0,1	18,3	36,3
pyrogallol	218 ± 2,5	6,0 ± 0,3	67,0	36,4
pyrocatéchol	183 ± 2,2	8,5 ± 0,3	56,3	21,5
acide caféique	27,8 ± 1,3	1,1 ± 0,2	8,6	25,4
L-Dopa	217 ± 2,8	24 ± 0,9	67,0	8,9
acide protocatéchique	ND*	ND	ND	ND
tyrosine	ND	ND	ND	ND
p-crésol	ND	ND	ND	ND
p-phénylènediamine, HCl	ND	ND	ND	ND

Les écarts indiqués correspondent à l'erreur standard obtenue lors de la modélisation en double inverse à partir d'au moins trois mesures d'activité enzymatique pour chacune des concentrations en substrat.

En comparant l'acide chlorogénique à l'acide caféique, deux composés phénoliques naturellement présents dans les tubercules de pomme de terre (**Friedman, 1997**), il apparaît que l'estérification de la fonction carboxylique de l'acide caféique par l'acide quinique ne modifie pas l'affinité de la fonction caféoyl : les valeurs de K_m pour les deux composés sont relativement proches ($K_m \approx 1$ mM). En revanche, cette estérification provoque une nette augmentation du Vm conduisant à une efficacité environ 8 fois plus élevée en faveur de l'acide chlorogénique.

En présence d'une fonction carboxylique directement liée au cycle (acide protocatéchique), l'activité PPO est inexistante. Lorsque cette fonction est séparée du cycle par un (acide dihydroxyphénylacétique) ou deux (acide hydrocaféique) carbones, l'activité PPO remonte et les activités sont comparables vis-à-vis de ces deux substrats.

Il résulte de ces comparaisons que le 4-MC qui est un bon substrat synthétique de la PPO de pomme de terre et a été utilisé pour la majorité des expériences d'inhibition. D'autres études sur la PPO de pomme de terre le décrivent comme un très bon substrat des PPO (**Duangmal et Owusu-Apenten, 1999**). Cependant, compte tenu de l'importance de l'acide chlorogénique, naturellement présent dans les tubercules de pomme de terre, ce substrat a également été mis en œuvre dans différentes expérimentations.

1.1.4. Spécificité des inhibiteurs

Les propriétés inhibitrices de différents acides carboxyliques et du 4-hexylrésorcinol (**figure 39**) ont été analysées (**tableau 16**) en utilisant comme substrat du 4-MC à pH 4,5.

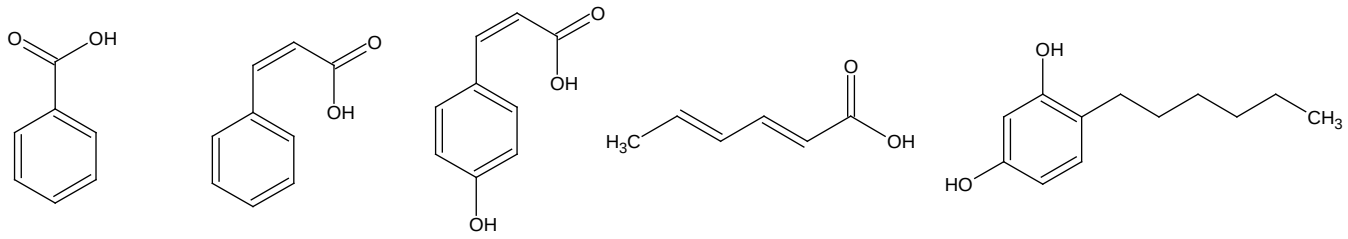


Figure 39 : Structures des acides carboxyliques et du 4-hexylrésorcinol testés en tant qu'inhibiteurs de la PPO de pomme de terre

Les acides benzoïque, *t*-cinnamique, *p*-coumarique et sorbique, tout comme le 4-hexylrésorcinol sont des inhibiteurs compétitifs de la PPO de pomme de terre. Les deux acides phénoliques de la série de l'acide cinnamique, naturellement présents dans les tubercules de pomme de terre (**Friedman, 1997**), ont un pouvoir inhibiteur comparable à l'acide benzoïque (K_{iapp} ≈ 0,1 mM). L'acide sorbique, bien qu'ayant une affinité pour l'enzyme moindre (K_{iapp} ≈ 0,9 mM) se montre également un bon inhibiteur de l'activité PPO de pomme de terre. Ces résultats montrant l'efficacité des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique à inhiber l'activité PPO de pomme de terre sont en accord avec ceux trouvés sur l'aubergine (**Cheriot *et al.*, 2006**) et la pomme (**Janovitz-Klapp *et al.*, 1989**).

Tableau 16 : Valeurs des constantes d'inhibition des acides carboxyliques et du 4-hexylresorciniol sur la PPO de pomme de terre à pH 4,5

Inhibiteur	K_{iapp} (mM)
acide benzoïque	0,12
acide *t*-cinnamique	0,14
acide *p*-coumarique (hydroxycinnamique)	0,11
acide sorbique	0,86
4-hexylrésorcinol	0,45

Le 4-hexylrésorcinol, dont l'utilisation pour inhiber le brunissement enzymatique des crevettes est brevetée, apparaît beaucoup moins efficace que dans le cas de la tyrosinase de champignon (K_{iapp} ≈ 0,004 mM) au même pH (**Fayad *et al.*, 1997**).

Ainsi, l'extrait enzymatique de pomme de terre dont on connaît la teneur en protéines sera utilisé à pH 4,5 avec comme substrat du 4-MC dans les expériences ultérieures d'inhibition par les PRM et les composés néoformés. L'activité PPO de pomme de terre et son mécanisme d'inhibition par les PRM et les composés issus du mélange seront comparées à celles de PPO d'autres origines végétales (pomme, aubergine et champignon).

1.2. La LOX de farine de fève

1.2.1. Extraction et purification de la LOX de farine de fève

Le **tableau 17** présente les rendements et taux de purification au cours du procédé d'extraction de l'activité LOX à partir de 7,5 g de farine de fève. Après une double précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium (25 – 50 %), le culot à 50 % de saturation est repris dans une solution tampon B puis dialysé pour constituer l'extrait C_{50d}. C'est ce dernier extrait qui est déposé en tête de colonne de gel filtration.

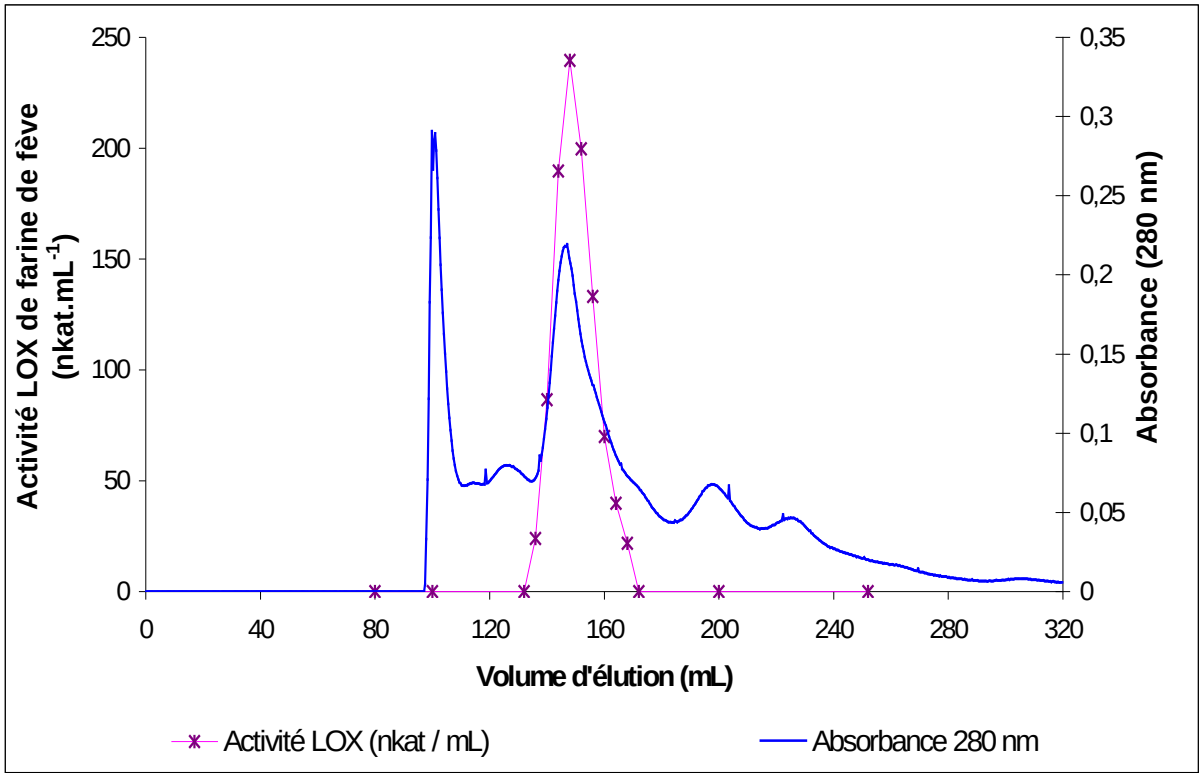
Tableau 17 : Taux de purification et rendement l'extraction de LOX de farine de fève

Etape	Volume mL	Protéines (mg)	Activité totale (µkat)	Activité spécifique µkat/mg	Rendement (%)	Taux de purification
Extrait brut	38	53	7,6	0,14	100	1
S25	37	59	6,6	0,12	91	0,8
C_{50}	2	2,5	1,7	0,69	23	4,8
C_{50d}	2,5	3,7	1,3	0,45	22	3,1
Fractions totales éluées GF	36	6,2	4,0	0,65	53	4,6
Fraction la plus active (36)	4	0,97	0,96	0,99	13	6,9

Pour la fraction la plus active, un rendement global d'environ 13 % avec un taux de purification proche de 7 est obtenu en cours de cette purification. La seconde précipitation par le sulfate d'ammonium pour obtenir l'extrait C_{50} entraîne une perte d'activité très importante (proche de 70 %). Ceci indiquerait que le protocole utilisé ici (**Beaux *et al.*, 1973**) semble peu propice au traitement de cet échantillon de farine de fève et qu'une partie de l'activité LOX n'a pas été précipitée dans ces conditions de concentration en

sulfate d'ammonium. A l'inverse, au cours de l'étape chromatographique de gel filtration, un gain notable d'activité LOX est mesuré. On peut émettre l'hypothèse que le composé inhibiteur présent dans l'extrait enzymatique de LOX et évoqué précédemment est, au moins partiellement, séparé de la LOX au cours de la filtration sur gel.

Le chromatogramme obtenu pour un extrait C_{50d} déposé en tête de colonne de gel Sephacryl S–200 HR présente un pic unique d'activité LOX (**figure 40**). Les protéines dépourvues d'activité LOX présentes dans l'échantillon sont éluées très tôt après le volume mort de la colonne, correspondent à des protéines de haute masse moléculaire (MM) proche de 250 kDa. D'autres fractions protéiques minoritaires et inactives de PM variables (une fraction de PM supérieur et deux à trois fractions de PM inférieurs à celui de la LOX de fève) sont également observées sur le chromatogramme.



<u>Figure 40</u> : Chromatographie de gel filtration sur Sephacryl S – 200 HR de la fraction C_{50d} de la farine de fève

1.2.2. Détermination de la masse moléculaire de la LOX de farine de fève extraite

La détermination du poids moléculaire de la LOX de farine de fève est effectuée sur la colonne de Sephacryl S-200 HR utilisée pour la purification et calibrée. Le volume d'élution du pic majoritaire de l'activité LOX de farine de fève sur cette colonne est de 144 mL représentant une valeur de K_{av} pour le gel de 0,216. D'après l'**équation 3** (paragraphe 7.1 du chapitre Matériel et méthodes) ceci correspond donc à une masse moléculaire de 68 kDa.

L'analyse en biologie moléculaire de la LOX de fève extraite des nodules de fève montre une masse moléculaire plus élevée : 96,5 kDa (**Perlick *et al.*, 1996**). Cependant, la valeur de masse moléculaire déterminée ici correspond à celle (66 kDa) de l'une des deux isoformes de LOX caractérisées dans la farine de fève par ultracentrifugation (**Nicolas et Drapron, 1977**).

1.2.3. Détermination des constantes cinétiques de la LOX de fève vis-à-vis de l'acide linoléique

Les vitesses initiales de la consommation en oxygène pour des solutions de concentration variable en substrat acide linoléique (1 – 15 mM) et saturées en air sont dosées à 30 °C. Ainsi, les valeurs des constantes cinétiques apparentes (K_m et V_m) pour la fraction purifiée (GFd – 20 µL) de LOX de fève sont déterminées à pH 6,5 (tampon phosphate 0,1 M). La courbe d'activité obtenue suit la loi de Michaelis-Menten, comme illustré dans la **figure 41**, et indique une vitesse maximale de 279 ± 6,9 nkat / mL et un K_m = 3,8 ± 0,3 mM. Cette valeur caractéristique de l'enzyme est proche de celle trouvée par **Richard-Forget *et al.* (1995)** pour une LOX de même origine végétale ($K_m \approx$ 2,2 mM à pH 6,5).

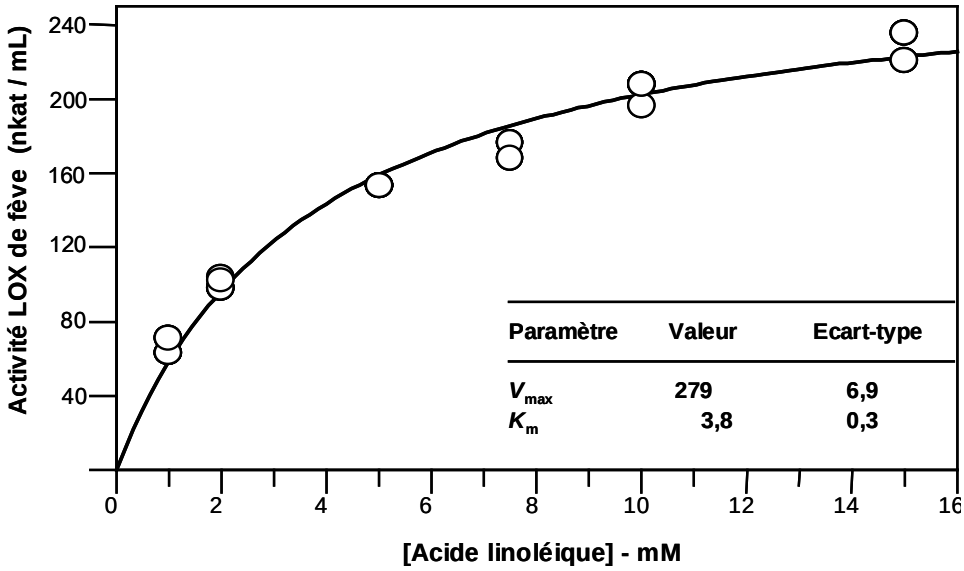


Figure 41 : Activité de la LOX purifiée de fève (GFd – 20 µL) en fonction de la concentration en acide linoléique (1-15 mM à pH 6,5 et à 30 °C)

Les protocoles utilisés montrent des taux de purification plutôt faibles et ne mènent pas à une purification jusqu'à homogénéité des deux extraits enzymatiques majoritairement utilisés dans les études d'inhibition. Cependant, les extraits obtenus ont l'avantage d'être représentatifs de l'activité enzymatique globale présente dans le végétal considéré. Ceci permet l'observation d'inhibiteurs d'une activité enzymatique globale et pas seulement spécifiques d'une isoenzyme particulière. Par ailleurs, ces protocoles, relativement rapides à mettre en œuvre, permettent l'obtention d'extraits enzymatiques stables plusieurs mois à – 20 °C.

2. ACTION DES PRM ET DU MELANGE SUR L'ACTIVITE PPO ET LE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

2.1. Mesure du pouvoir inhibiteur, dosage des réactants résiduels et du HMF dans les PRM

Différents PRM à base de glucose, de cystéine ou de glutathion ont été étudiés au laboratoire pour leurs propriétés inhibitrices de l'activité PPO de champignon, de pomme, d'aubergine et de pomme de terre (**tableau 18**) :

- PRM A : glucose (1 M) / glutathion (0,15 M) chauffés à 110 °C pendant 4 h
- PRM B : glucose (0,8 M) / cystéine (0,5 M) chauffés à 103 °C pendant 14 h
- PRM C : glucose (1 M) / cystéine (0,25 M) chauffés à 115°C pendant 200 min.

Tableau 18 : Pouvoir inhibiteur (PI) des différents PRM utilisés sur des PPO de différentes sources végétales en présence de 1 µL de PRM

	pH initial (des solutions avant chauffage)	Tyrosinase de champignon		PPO de pomme		PPO d'aubergine		PPO de pomme de terre	
		moy	σ	moy	σ	moy	σ	moy	σ
PRM A	non ajusté (≈ 3)	5,5	0,02	23	3,6	24,9	4,9	35	4
PRM B	non ajusté (≈ 5)	2,3	0,2	7,7	1,6	7,9	0,5	8,2	0,7
	pH = 3	3,3	0,01	12	0,9	13	1,8	15	1,2
PRM C	non ajusté (≈ 5)	7,1	0,4	8,2	0,1	9,2	0,7	7,6	0,5
	pH = 2	14,3	1,5	48	10	61	12	23	4

Avec $PI = \frac{100}{\text{activité résiduelle (\%)}} - 1$

Il faut noter que le PRM A, à base de glutathion présente un pH initial proche de 3, ce qui rend inutile l'acidification initiale. Pour les PRM B et C, initialement à pH ≈ 5 sans ajustement, quelle que soit l'enzyme, la baisse de pH des systèmes modèles avant chauffage, augmente le PI des PRM. Ceci peut paraître étonnant dans la mesure où le développement de la réaction de Maillard est favorisé en milieu alcalin (**Ajandouz et Puigserver, 1999**). On peut noter également d'après ce tableau que le classement des PRM respecte le même ordre de PI lorsque les systèmes sont chauffés dans des conditions acides. En effet, pour toutes les PPO testées, les PRM C ajustés à pH 2 sont toujours les plus inhibiteurs (à l'exception de la PPO de pomme de terre avec les PRM A). Viennent ensuite les PRM A, puis les PRM B ajustés à pH 3 (à l'exception de la tyrosinase de champignon pour les PRM C à pH non ajusté). Les PRM C et les PRM B à pH non ajustés sont les moins inhibiteurs. Globalement, pour la même dose de PRM (1µL dans 1,4 mL de milieu réactionnel), la PPO de pomme de terre apparaît la plus sensible (à l'exception des PPO de pomme et d'aubergine avec les PRM C ajustés à pH 2), suivie des PPO de pomme et d'aubergines qui présentent des valeurs d'inhibitions très proches. Enfin, la tyrosinase de champignon est la moins sensible à l'inhibition causée par les PRM. Le brunissement enzymatique n'est pas uniquement dû à l'activité PPO présente dans le végétal mais également lié à la teneur en phénols. Cependant, la sensibilité plus ou moins grande de l'activité PPO vis-à-vis des PRM est un facteur à prendre en compte dans la détermination de la quantité de PRM à introduire dans les tests de mesure d'activité enzymatique et dans les mesures colorimétriques du brunissement enzymatique.

En plus du pouvoir inhibiteur de ces PRM, les concentrations résiduelles en réactants de ces différents systèmes modèles ont été déterminées afin de connaître la proportion de réactants ayant réagi pour former des PRM. En effet, en vue de leurs applications technologiques, il est souhaitable de connaître la composition des produits que l'on souhaite introduire dans des procédés industriels. Ainsi, le glucose résiduel (**tableau 19**) et les composés thiolés (**tableau 20**) ont été dosés par HPLC-DDL et HPLC-DEC respectivement et comparés aux réactants chauffés seuls dans les mêmes conditions.

La première observation du **tableau 19**, met en évidence les grandes quantités de glucose résiduel présentes dans les PRM : plus de 60 % du glucose introduit dans les systèmes modèles pour la synthèse des PRM n'a pas réagi. Contrairement aux études de **Renn et Sathe (1997)** et d'**Ajandouz et Puigserver (1999)** indiquant que la RM est accélérée par des milieux alcalins, les PRM synthétisés en milieu acide voient la réactivité du glucose augmentée. En comparant les concentrations résiduelles en glucose dans les PRM à celles observées pour les solutions de glucose seul chauffées dans les mêmes conditions, il apparaît que la perte en glucose lors du chauffage est plus importante en présence de

cystéine ou de glutathion. Ceci est accentué par la comparaison des trois PRM ayant des concentrations en composés aminés différentes : plus la concentration initiale en acide aminé est élevée, moins il subsiste de glucose résiduel après le chauffage.

Tableau 19 : Concentrations en glucose résiduel (M) des différents PRM et des solutions de glucose chauffées dans les mêmes conditions (pH et barèmes de chauffage)

	pH initial	[glucose] (M) PRM		glucose ayant réagi (% par rapport au glucose initial)	[glucose] (M) glucose chauffé seul	
		moy	σ		moy	σ
PRM A	non ajusté (≈ 3)	0,90	0,05	10	0,92	0,06
PRM B	non ajusté (≈ 5)	0,52	0,02	35	0,78	0,03
	pH = 3	0,48	0,01	40	0,76	0,04
PRM C	non ajusté (≈ 5)	0,83	0,02	17	0,93	0,02
	pH = 3	0,73	0,01	27	0,71	0,02

Le **tableau 20** montre qu'effectivement, l'acide aminé thiolé introduit en concentration inférieure au glucose dans tous les systèmes modèles, réagit dans de larges proportions au cours de la réaction de Maillard : plus de 96 % du glutathion du PRM A et 60 % de la cystéine dans les PRM B et C ont réagi au cours du chauffage. De plus, l'acidification initiale du mélange provoque une dégradation plus importante des thiols lors du chauffage. Ces taux sont beaucoup plus faibles lorsque les solutions de composé thiolés sont chauffées en absence de glucose.

Tableau 20 : Concentrations en réactif thiol (glutathion dans le PRM A / cystéine dans les PRM B et C) comparées à celles des solutions de réactifs thiols chauffés seuls dans les mêmes conditions

	pH initial	[glutathion ou cystéine] (M) PRM		thiol ayant réagi (%)	[cystéine ou gluthation] (M) cystéine ou glutathion chauffés seuls	
		moy	σ		moy	σ
PRM A	non ajusté (≈ 3)	0,006	0,0002	96	0,036	0,003
PRM B	non ajusté (≈ 5)	0,14	0,01	72	0,36	0,01
	pH = 3	0,05	0,003	90	0,46	0,03
PRM C	non ajusté (≈ 5)	0,09	0,002	62	0,21	0,01
	pH = 3	0,04	0,002	83	0,16	0,01

Par ailleurs, le HMF est un composé souvent cité comme marqueur de la réaction de Maillard et est depuis longtemps utilisé comme critère de qualité des jus de fruit (**Berry et Tatum, 1965**) et du miel

(**Mesallam et El-Shaarawy, 1987**). Il a également été dosé dans les différents PRM étudiés (**tableau 21**). Il apparaît alors que le PRM le plus inhibiteur est également celui qui possède la plus forte concentration en HMF (≈ 3 mM). Les PRM B, obtenus après un chauffage plus long (14 h) ont des teneurs en HMF inférieures au seuil de détection (0,02 mM). Dans ce cas, ce composé intermédiaire de la réaction de Maillard a sans doute subi une réaction de Maillard plus avancée et a été transformé en d'autres produits de polymérisation : **Tomasik *et al.* (1989**) considèrent que le HMF ainsi que d'autres composés furannes, peuvent être les précurseurs des polymères responsables de la couleur des produits de chauffage lors de la caramélisation ou de la réaction de Maillard. Par ailleurs, en comparant les teneurs en HMF des PRM formés en présence de cystéine (B et C) à celles des solutions de glucoses chauffées seules correspondantes, on observe comme **Kroh (1994)**, que la teneur en HMF est inférieure dans les PRM.

<u>Tableau 21</u> : Concentrations en HMF (mM) dans les PRM comparées à celles des solutions de glucose chauffé seul dans les mêmes conditions

	pH initial	[HMF] (mM) PRM		[HMF] (mM) glucose chauffé seul	
		moy	σ	moy	σ
PRM A	non ajusté (≈ 3)	0,75	0,02	1,11	0,01
PRM B	non ajusté (≈ 5) pH = 3	non détectable		1,14 2,07	0,07 0,07
PRM C	non ajusté (≈ 5) pH = 3	0,22 2,91	0,01 0,09	0,52 3,63	0,16 0,02

Afin d'élucider la relation qui pourrait exister entre l'apparition du HMF et le PI des composés formés, des PRM (0 – 1 M glucose / 0,25 M cystéine) chauffés à 115 °C pendant 200 min après acidification initiale (pH = 2) ou non ont été plus spécifiquement étudiés. La **figure 42** présente en fonction de la concentration initiale en glucose, l'évolution des teneurs en HMF et des PI de ces systèmes modèles. Il apparaît alors que le pouvoir inhibiteur des PRM augmente avec la concentration initiale en glucose. Pour une même concentration initiale en glucose, lorsque le pH des solutions de glucose-cystéine est ajusté à 2 avant chauffage, les PRM montrent un pouvoir inhibiteur plus fort confirmant ainsi l'effet de l'abaissement du pH dans la génération des composés inhibiteurs. A partir d'une concentration de 0,4 M en glucose, la concentration en HMF dans les PRM augmente avec la concentration en glucose, et ceci de façon plus marquée en milieu acide. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle la formation du HMF est favorisée en milieu acide (**Kroh, 1994**).

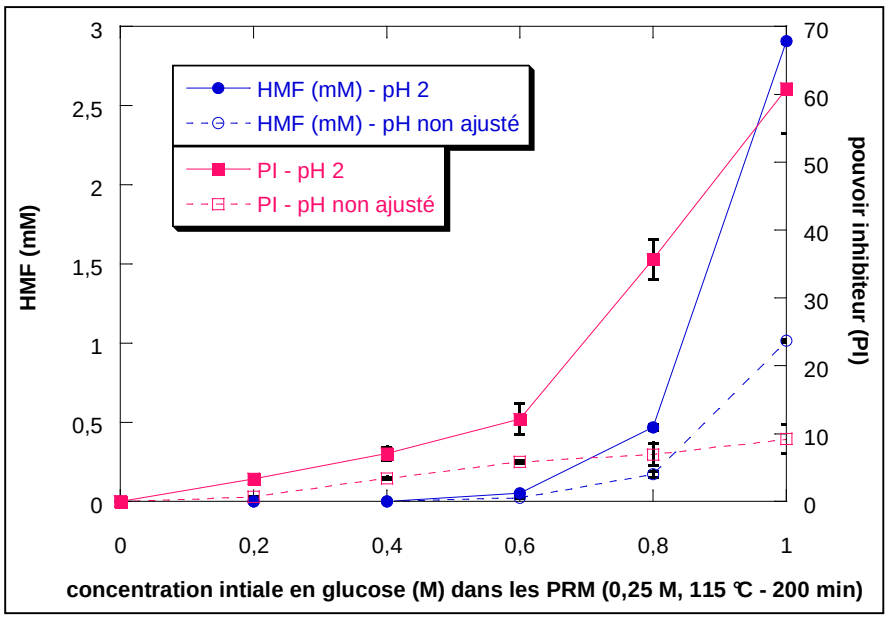
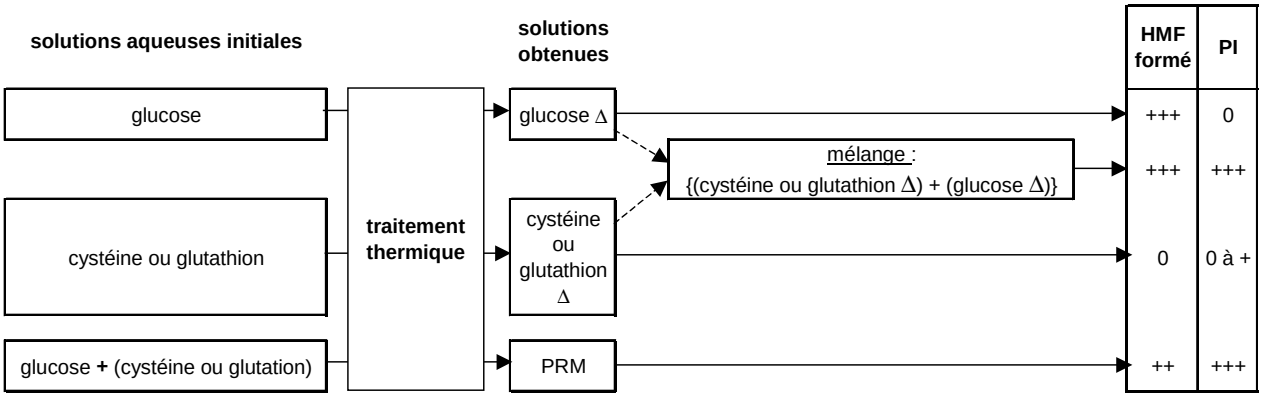


Figure 42 : Concentration en HMF et pouvoir inhibiteur (PI) vis-à-vis de l'activité PPO de pomme de systèmes modèles (glucose : 0 - 1 M / cystéine : 0,25 M) chauffés à 115 ℃ pendant 200 min après acidification initiale (pH = 2) ou non

Lors de la préparation de l'ensemble des échantillons et au cours de la réalisation de témoins (**figure 43**), est apparu un fait marquant : le mélange de solutions de glucose et de cystéine chauffées séparément, entraîne également la formation de composés très inhibiteurs après qu'ils aient été mis en contact pendant 20 min comme le montre le **tableau 22** qui dresse la comparaison des activités PPO résiduelles de pomme de terre en présence d'un microlitre de solutions préparées dans des conditions analogues aux PRM B.



Δ : chauffé

Figure 43 : Récapitulatif des différents échantillons testés - Mise en évidence du rôle du HMF dans la formation des composés inhibiteurs

Tableau 22 : Comparaison des activités PPO résiduelles de pomme de terre en présence de 1 µL de différentes solutions ajustées à pH 3 non chauffées ou chauffées (103 °C, 14 h)

Echantillon	Activité PPO résiduelle (%)	Ecart-type (%)
Glucose (0,8 M) non chauffé	100	2
Glucose (0,8 M) chauffé	99	2
Cystéine (0,5 M) non chauffée	99	2
Cystéine (0,5 M) chauffée	89	1,5
Glucose (0,8 M) chauffé / Cystéine (0,5 M) non chauffée	97	2
Glucose (0,8 M) non chauffée / Cystéine (0,5 M) chauffée	91	2
Glucose (0,8 M) chauffée / Cystéine (0,5 M) chauffée	**4,2**	**0,5**
PRM B	**7,1**	**0,8**

Le pH des solutions est ajusté à 3 (avant chauffage lorsque les solutions sont chauffées)

La bibliographie sur la réaction de Maillard indique clairement qu'en milieu acide, le chauffage d'hexose entraîne de façon prépondérante la formation de HMF. Compte tenu des résultats présentés quant à la teneur en HMF des PRM inhibiteurs, on peut supposer que le HMF produit lors du chauffage du glucose, réagirait avec des composés issus du chauffage de la cystéine pour générer des produits très inhibiteurs de l'activité PPO.

C'est à partir de ces observations et de cette hypothèse, que nous avons décidé de poursuivre nos études d'inhibition avec des mélanges plus simples constitués de composés carbonylés et de composés thiolés chauffés. En effet, ceci présente l'avantage par rapport aux PRM, de simplifier notre milieu d'étude en partant d'un système renfermant seulement un composé carbonylé pur et des produits de chauffage de la cystéine. Afin de mieux comprendre la formation des composés inhibiteurs néoformés lors du mélange d'un composé carbonylé avec la cystéine chauffée, différents modèles réactionnels ont été étudiés.

2.2. Etude des composés inhibiteurs dans des mélanges composé carbonylé / cystéine chauffée : formation, stabilité, fractionnement et analyses des produits néoformés

2.2.1. Etude structure / activité sur des mélanges de composés carbonylés avec des composés soufrés

Nature du composé carbonylé dans le mélange

Différentes solutions aqueuses de composés carbonylés (4 mM) ont été mélangées à 0 °C (pour pouvoir contrôler la réaction) pendant 0 à 180 min avec de la cystéine (10 mM) chauffée pendant 200 min à 115 °C. Des fractions aliquotes (10 µL) ont été prélevées régulièrement au cours du temps de réaction (0 – 180 min) et introduites dans le milieu réactionnel de mesure de l'activité PPO de pomme. Comme le montre la **figure 44** pour certains des systèmes modèles testés, la réaction entre le composé carbonylé et la cystéine chauffée aboutissant à la formation de produits inhibiteurs de la PPO de pomme n'est pas immédiate : il y a tout d'abord une diminution rapide de l'activité enzymatique au cours des 20 premières minutes qui se stabilise après au moins 60 min de réaction à 0 °C pour les systèmes les plus inhibiteurs. Le **tableau 23 - A** récapitule les résultats de cette première série d'expériences. Il a par ailleurs été vérifié que dans nos conditions expérimentales, la cystéine chauffée seule et les composés carbonylés seuls n'avaient pas d'effet direct sur l'activité PPO. Ceci s'oppose aux résultats décrits par **Kubo et Kinst-Hori** (**1998a** ;**1998b**) et ceux de **Sharma *et al.* (2004)** selon lesquels certains composés aromatiques aldéhydiques tels que le cuminaldéhyde, l'isopropylsalicylaldéhyde ou le HMF, sont inhibiteurs de l'activité tyrosinase de champignon mesurée par spectrophotométrie.

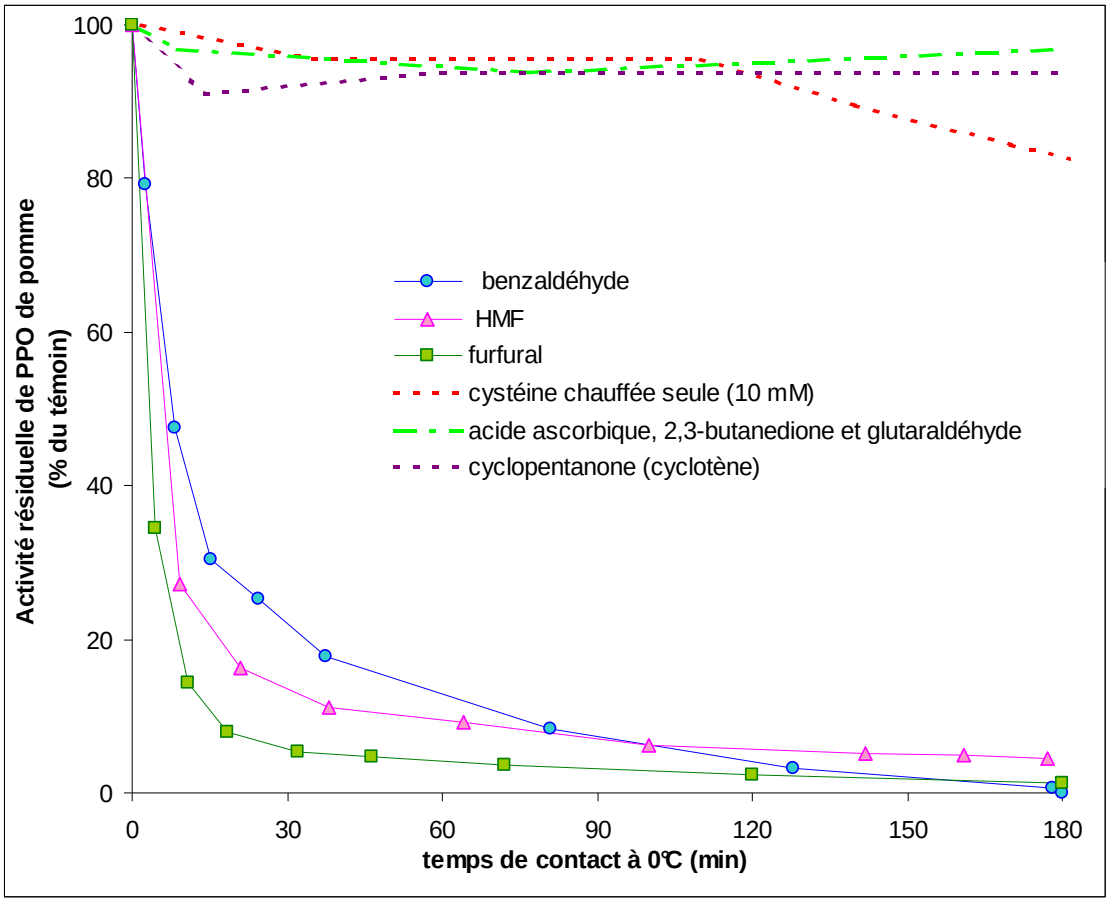


Figure 44 : Cinétique d'apparition à 0 °C des composés inhibiteurs au cours du temps de mélange entre des composés carbonylés (4 mM) et la cystéine chauffée (10 mM) à 115 °C pendant 200 min

Comme le montre le **tableau 23 A**, les solutions contenant un composé aliphatique mono- ou di-carbonyle mélangé à la cystéine chauffée, sont totalement dépourvues de pouvoir inhibiteur (acétaldéhyde, formaldéhyde, glutaraldéhyde et butanedione), ou montrent un faible pouvoir inhibiteur (glyoxal). Le même effet est observé avec des composés cycliques carbonylés à 5 atomes de carbone (cyclopentanone), 6 atomes de carbone (cyclohexane carboxaldéhyde), ou un hétérocycle furanne (2-furanone). Ceci indique que l'absence de double liaison ou la présence d'une seule double liaison sur le cycle est défavorable à la formation de composés inhibiteurs en présence de composés issus du traitement thermique de la cystéine.

En ce qui concerne les dérivés du benzaldéhyde, l'allongement de la chaîne latérale (benzèneacétaldéhyde) fait quasiment disparaître le pouvoir inhibiteur observé avec le benzaldéhyde. Inversement, la présence d'une double liaison sur cette chaîne latérale (cinnamaldéhyde) entraîne l'apparition d'un pouvoir inhibiteur comparable à celui observé pour le benzaldéhyde lorsque ces

composés sont mélangés à la cystéine chauffée. L'addition d'un groupe hydroxyle en *ortho* (salicyladéhyde) *ou* en para (p-hydroxybenzaldéhyde), ou d'un groupe méthoxy en *méta* (*m*-anisaldéhyde) ou en *para* (*p*-anisaldéhyde) sur le noyau benzénique ne diminue que faiblement le pouvoir inhibiteur des mélanges. En revanche, la présence simultanée d'un groupe hydroxyle et d'un groupe méthoxy (vanilline) ou éthoxy (éthylvanilline) en position 4 et 3 respectivement sur le benzaldéhyde, entraîne une diminution significative du PI des mélanges, montrant l'effet de groupes attracteurs d'électrons sur la formation de composés actifs à partir du benzène. De la même façon, le groupement donneur d'électrons tel que l'isopropyl présent en position *para* du groupe aldéhydique (cuminaldéhyde), provoque une diminution du pouvoir inhibiteur qui devient alors près de 8 fois plus faible que celui observé pour le benzaldéhyde.

Les composés furannes tels que le furfural ou son dérivé hydroxyméthylé (HMF) montrent des effets comparables au benzaldéhyde lorsqu'ils sont mélangés à de la cystéine chauffée avec moins de 2 et 4 % d'activité PPO résiduelle mesurée respectivement en présence de ces deux mélanges. Cependant, l'oxydation (acide 2-furoïque), la réduction (furfuryl alcool) ou la méthylation (furylméthylcétone) de la fonction aldéhydique s'accompagne d'une quasi-disparition du pouvoir inhibiteur puisqu'il ne présente pas de différence avec celui observé avec la cystéine chauffée seule.

Cette première série d'expériences montre l'importance de la présence simultanée d'un cycle insaturé et d'un groupe carbonyle libre pour permettre la formation de composés inhibiteurs. On peut alors penser que des mécanismes de délocalisation électronique sont impliqués dans les réactions chimiques avec les produits de chauffage de la cystéine. Les résultats suggèrent également que les positions et les polarités des substituants sur le cycle jouent un rôle important dans la formation des produits inhibiteurs de l'activité PPO.

Tableau 23 : Inhibition de la PPO de pomme par différents composés carbonylés (4 mM) mélangés à une solution de cystéine chauffée (115 °C – 200 min - 10 mM) Partie A – et par mélanges HMF (4 mM) / dérivés chauffés (115 °C pendant 200 min) de la cystéine (10 mM) Partie B ; après 180 min de réaction à 0 °C entre les solutions de réactants. 10 µL de mélange sont ajoutés en cuve avant l'addition de l'extrait enzymatique

A		B	
Composé carbonylé (4 mM) + cystéine chauffée (10 mM)	Activité PPO résiduelle (%)	Dérivé chauffé de la cystéine (10 mM) + HMF (4 mM)	Activité PPO résiduelle (%)
salicylaldéhyde	1,33 ± 0,16$^{(a)}$	L-cysteine méthylester	1,41 ± 0,07$^{(a)}$
furfural	1,74 ± 1,6$^{(a)}$	cystéine	1,73 ± 0,14$^{(a)}$
cinnamaldéhyde	1,76 ± 0,22$^{(a)}$	sulfure d'ammonium*	2,76 ± 0,55$^{(a)}$
benzaldéhyde	2,03 ± 1,4$^{(a)}$	N-acétylcystéine	18,2 ± 0,61$^{(a,b)}$
HMF	3,52 ± 2,5$^{(a,b)}$	homocystéine	30,5 ± 0,92$^{(c)}$
p-anisaldéhyde	3,70 ± 0,47$^{(a,b)}$	cystéamine	84,0 ± 2,37$^{(d)}$
m-anisaldéhyde	4,80 ± 0,30$^{(a,b)}$	S-méthylcystéine	88,6 ± 2,02$^{(e)}$
p-hydroxybenzaldéhyde	7,53 ± 0,31$^{(b,c)}$	acide cystéique	92,2 ± 2,19$^{(f)}$
éthylvanilline	9,41 ± 2,3$^{(c,d)}$	méthionine	97,5 ± 1,22$^{(g)}$
vanilline	13,2 ± 1,9$^{(d,e)}$	acide thiolactique	97,2 ± 0,56 $^{(g)}$
cuminaldéhyde	15,6 ± 0,60$^{(e)}$	acide 3-mercaptopropanoïque	98,1 ± 1,12 $^{(g)}$
2-furylméthylcétone	93,7 ± 1,9$^{(f)}$		
furfuryl alcool	94,8 ± 1,9$^{(f)}$	HMF (seul)	100$^{(h)}$
glyoxal	94,8 ± 1,9$^{(g)}$		
benzèneacétaldéhyde	95,0 ± 2,1$^{(g)}$		
acide 2-furoïque	95,7 ± 3,0$^{(g)}$		
cyclopentanone	95,0 ± 2,1$^{(g)}$		
2-furanone	95,1 ± 1,4$^{(g)}$		
cyclohexane carboxaldéhyde	96,5 ± 3,4$^{(g,h)}$		
acétaldéhyde	100$^{(h)}$		
formaldéhyde	100$^{(h)}$		
2,3-butanedione	100$^{(h))}$		
glutaraldéhyde	100$^{(h)}$		
cystéine chauffée (seule)	93,7 ± 1,9$^{(g)}$		

Les valeurs d'activité PPO résiduelle portant des lettres différentes (a – h) présentent des différences significatives ($p < 0,01$ – test de Duncan)

***** Le sulfure d'ammonium n'a pas été chauffé avant mélange et réaction avec le HMF.

Nature du composé soufré

Une série d'essais complémentaires a été mise en place afin de déterminer la nature des composés soufrés qui, après chauffage, pourraient réagir avec le composé carbonylé pour engendrer des composés actifs. Ces composés soufrés ont principalement été choisis du fait de leur analogie avec la cystéine (ex. homocystéine), parce que ce sont des composés identifiés parmi les produits de dégradation thermique de la cystéine (ex. acide 3-mercaptopropanoïque) ou parce qu'ils montrent des

BOC ou des pertes de certaines fonctions de la cystéine (ex. cystéamine, S-méthylcystéine, L-cystéineméthylester).

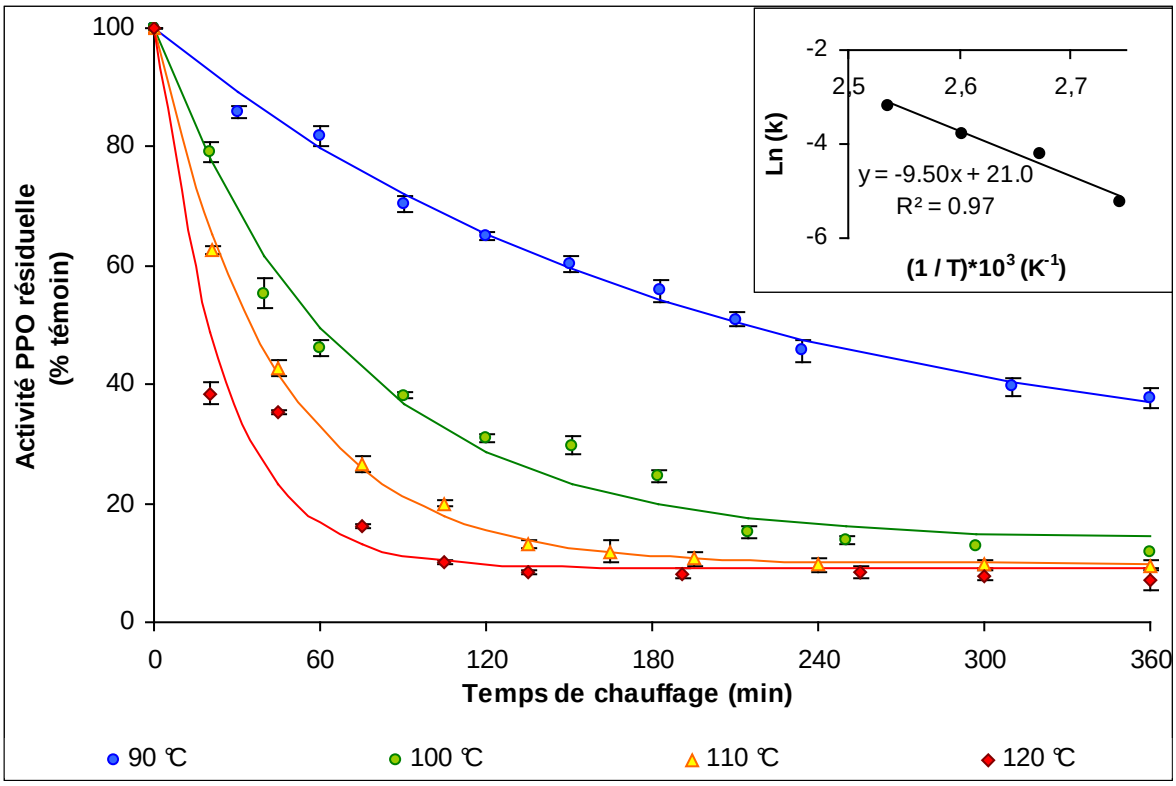
Le HMF (4 mM) a été sélectionné comme réactif carbonylé pour réagir à 0 °C pendant 5 – 180 min avec des composés dérivés de la cystéine (10 mM) préchauffés à 115 °C pendant 200 min (**tableau 23 B**). Les mélanges issus du HMF et de la cystéine ou de la cystéineméthylester chauffées sont les plus efficaces pour inhiber la PPO de pomme. Dans une moindre mesure, les solutions chauffées de N-acétylcystéine et d'homocystéine mélangées au HMF se montrent également inhibitrices. En revanche, les dérivés chauffés de la cystéine dans lesquels le groupe thiol est méthylé (méthionine, méthylcystéine) ou oxydé (acide cystéique) génèrent des composés peu ou pas inhibiteurs. De la même façon, l'absence de fonction carboxylique (cystéamine) ou amine (acides 3-mercaptopropanoïque et thiolactique) n'entraîne pas la formation de composés inhibiteurs après chauffage et mélange avec le HMF. Selon ces résultats, les conditions de chauffage semblent suffisantes pour hydrolyser les fonctions acétyles (N-acétyl-cystéine) et ester (cysteine méthylester) et générer les composés inhibiteurs avec le HMF. Le sulfure d'ammonium [$(NH_4)_2S$] non chauffé a également été inclus dans ces expériences car il correspond à la forme soluble de l'H_2S pouvant être produit lors du chauffage de la cystéine (**Zhang *et al.*, 1988**). Bien que n'étant pas inhibiteur en soit, ce composé forme des produits très inhibiteurs de l'activité PPO lorsqu'il est mélangé au HMF.

A ces concentrations, la cystéine et ses dérivés non chauffés ainsi que les sulfites sont dépourvus de pouvoir inhibiteur lorsqu'ils sont mélangés ou non au HMF après réaction dans les mêmes conditions. À l'exception de l'homocystéine, les composés dérivés de la cystéine montrent des pouvoirs inhibiteurs comparables à ceux observés pour les PRM vis-à-vis de l'activité PPO de pomme (**Billaud *et al.*, 2005**). Il semble que la présence simultanée des groupements SH, NH_2, et COOH libres soit liée à la formation de précurseurs des composés inhibiteurs au cours du chauffage. L'addition à ces précurseurs, d'une molécule avec une fonction carbonylée tel que le 5-HMF, fait apparaître le pouvoir inhibiteur. Cependant, la présence de la fonction carboxylique ne semble pas indispensable si l'on prend en compte le résultat obtenu avec le sulfure d'ammonium. En outre, le chauffage est une étape indispensable pour former les précurseurs des composés inhibiteurs à partir de ces composés thiolés. Pourtant, le furfurylthiol, composé d'arôme pouvant être formé par réaction de la cystéine avec le HMF en milieu acide (**Whitfield et Mottram, 1999**) ne présente aucun pouvoir inhibiteur. La transformation de la cystéine par le traitement thermique est nécessaire pour faire apparaître certains produits spécifiques qui vont générer le pouvoir inhibiteur après réaction avec le HMF.

En présence de cystéine chauffée, le benzaldéhyde, le salicylaldéhyde, le cinnamaldéhyde, le furfural et le HMF sont parmi les aldéhydes testés les plus enclins à former des composés inhibiteurs. Pour faciliter les comparaisons entre les PRM issus de la cystéine et ces mélanges modèles, et parce que le HMF est un composé qui a effectivement été mis en évidence et dosé dans les PRM, les mélanges cystéine chauffée – HMF ont plus particulièrement été étudiés.

2.2.2. Effet du chauffage de la cystéine sur la formation de composés précurseurs des inhibiteurs de l'activité PPO

Afin d'étudier la cinétique de formation des précurseurs des composés inhibiteurs lors du chauffage de la cystéine, des solutions de cystéine (10 mM) sont chauffées à différentes températures (90 – 120 °C) pendant des temps variables (0 – 360 min). Du HMF (5 mM) est ensuite ajouté à ces solutions de cystéine chauffée une fois refroidie de sorte que la concentration finale des réactants dans le mélange soit équivalente à 5 mM. Ce mélange est conservé dans la glace pendant 60 min puis l'activité PPO résiduelle de pomme est mesurée en présence de 2 µL de mélange. Comme le montre la **figure 45**, le pouvoir inhibiteur augmente avec la durée de chauffage de la cystéine puis tend vers un palier. Un maximum d'inhibition est observé pour chacune des températures de chauffage étudiées et l'activité enzymatique résiduelle reste stable même si le temps de chauffage augmente.



Encart : détermination de l'énergie d'activation (Ea) de la réaction de formation des précurseurs des composés inhibiteurs dérivés du chauffage de la cystéine.

Figure 45 : Evolution de l'activité PPO résiduelle de pomme en présence de 2 µL de mélange (cystéine chauffée 10 mM / HMF 5 mM – réaction pendant 60 min à 0 °C) en fonction de la température (90 – 120 °C) et du temps de chauffage (0 – 360 min) des solutions de cystéine

Les courbes expérimentales sont modélisées par un modèle du premier ordre (**Eq. 10**):

$$A = A_f + \left(A_0 - A_f\right) exp\,(-kt) \quad (10)$$

Où A représente l'activité PPO résiduelle (en % du témoin) au temps t (min), A_0 et A_f sont les activités résiduelles aux temps initial et final de chauffage respectivement dans cette étude, et k est la constante de vitesse (min^{-1}).

Les modèles cinétiques du premier ordre donnent de bons coefficients d'ajustement des valeurs d'activités résiduelles mesurées et celles issues du modèle (**tableau 24**). Les valeurs des constantes cinétiques du modèle de premier ordre pour la formation des précurseurs des composés inhibiteurs lors du chauffage de la cystéine et les valeurs d'activité finale (A_f) sont calculées à l'aide d'une régression non linéaire en minimisant la somme des carrés des différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées. Conformément à ce que l'on peut attendre, les valeurs de k augmentent avec la

température. L'énergie d'activation de la réaction de formation des précurseurs des composés inhibiteurs peut être calculée, d'après la loi d'Arrhénius, à partir de la pente de la droite obtenue en portant Ln (k) en fonction de l'inverse de la température absolue selon l'**équation 11** :

$$\text{pente} = -\frac{Ea}{R} \qquad (\mathbf{11})$$

E_a est l'énergie d'activation (kJ.mol^{-1}) et R la constante universelle des gaz parfaits (8.314 J.mol^{-1}.K^{-1}).

<u>Tableau 24</u> : Valeurs des constantes « k », des activités PPO résiduelle finales calculées et du taux d'ajustement du modèle du premier ordre

Température (°C)	Constante "k" du modèle (*10^3 min^{-1})	Activité PPO résiduelle finale calculée (%) (A_f)	R^2
90	5,3	26,2	0,98
100	15	13,9	0,91
110	23	9,8	0,98
120	41	9,2	0,86

L'énergie d'activation de la formation des précurseurs des inhibiteurs de la PPO au cours du chauffage de la cystéine est de 79 kJ.mole^{-1} (**encart de la figure 45**). Cette valeur est 2,4 fois inférieure à celle calculée pour la formation de PRM inhibiteurs à partir de systèmes modèles glucose-cystéine (Ea = 191 kJ.mole^{-1}) en considérant l'activité PPO de pomme (**Billaud *et al.*, 2004**). Ceci indique que la formation des précurseurs des composés inhibiteurs issus du chauffage de la cystéine est une réaction qui dépend moins de la température que la formation des composés inhibiteurs issus de la réaction de Maillard. On peut considérer que le chauffage de la cystéine pendant 200 min à 115 °C entraîne la formation d'un maximum de précurseurs de composés inhibiteurs alors que lorsque la cystéine est chauffée en présence de glucose, il est possible qu'une partie des précurseurs formés réagissent avec d'autres composés (issus du chauffage du glucose) pour former des composés dépourvus de pouvoir inhibiteur. Ces conditions de chauffage, identiques à celles du PRM C, sont retenues par la suite pour former les composés inhibiteurs à partir de cystéine chauffée et de HMF. Ces mélanges sont dénommés par la suite sous l'abréviation $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF}$.

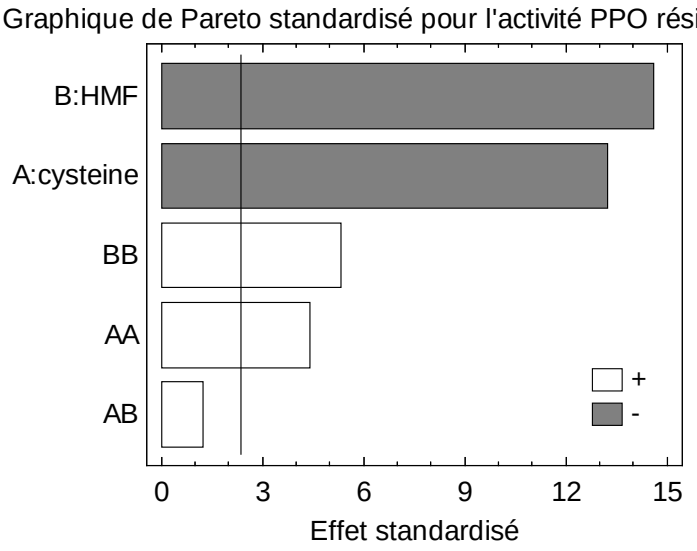
2.2.3. Effets de la concentration en réactants et de leur ratio dans le mélange HMF / cystéine chauffée

Les effets des concentrations initiales (0,8 – 9,6 mM) des réactants (HMF et cystéine chauffée à 115 °C pendant 200 min) sur la formation des composés inhibiteurs de l'activité résiduelle (Ar) de PPO d'aubergine ont été étudiés à l'aide d'un plan d'expériences centré-réduit à deux variables et cinq niveaux (**tableau 25**). Cinq répétitions du point central ont été utilisées pour calculer l'erreur expérimentale. Trois mesures de l'activité résiduelle de PPO d'aubergine en présence de 10 µL de mélange laissé à réagir pendant 60 min à 0 °C ont été réalisées.

Tableau 25 : Valeurs réelles et codées du plan d'expériences à deux variables (concentrations en HMF et en cystéine chauffée) et cinq niveaux

		$-\alpha = \sqrt{2}$	- 1	**0**	+ 1	$+\alpha = \sqrt{2}$
X_1	[cystéine avant chauffage] (mM)	0,8	2	**5**	8	9,6
X_2	[HMF] (mM)	0,8	2	**5**	8	9,6

L'analyse de la variance des effets des concentrations en cystéine chauffée et en HMF sur l'activité PPO d'aubergine résiduelle est représentée sur le graphe de Pareto en **figure 46** en utilisant un seuil de significativité de 1 %. Les effets linéaires de la concentration en cystéine chauffée et en HMF sont statistiquement significatifs au seuil de 1 %. Il est intéressant de noter que les valeurs estimées des effets sont très proches pour chacun des réactifs (- 25,3 et - 28,3 ± 2.2 pour la cystéine et le HMF respectivement) indiquant ainsi que des mélanges équimolaires conduiront à la formation d'un maximum de composés inhibiteurs. Par ailleurs, l'absence de significativité des effets quadratiques des paramètres au seuil de 1 % dans le domaine expérimental étudié, indique qu'il n'y a pas d'optimum de concentration et, de ce fait, une augmentation de la concentration des réactifs se traduit par une augmentation du PI du mélange.



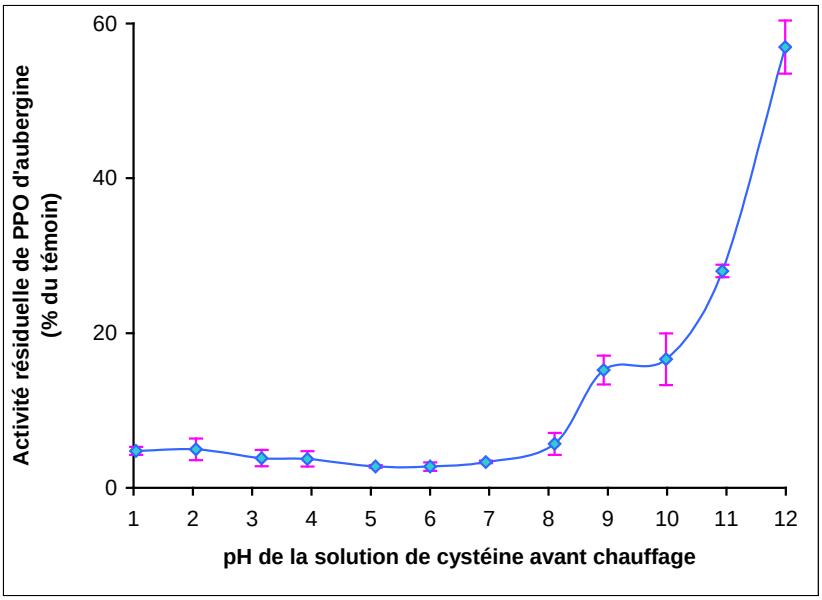
A : concentration en cystéine (mM)
B : concentration en HMF (mM)
Les effets positifs sont représentés en blancs et la ligne verticale indique le niveau de confiance de 99 % (p = 0,01). Les facteurs ayant un effet standardisé dont la valeur est supérieure à la limite indiquée par la ligne verticale sont statistiquement significatifs au seuil de 1 %.

L'équation donnée par le modèle est :
Ar = 88,3 - 6,1*cysteine - 7,9*HMF - 0,05*cysteine² + 0,4*cysteine*HMF + 0,08*HMF²

Figure 46 : Graphique de Pareto représentant les effets standardisés des concentrations des réactants sur l'activité PPO résiduelle d'aubergine en présence de 10 µL de mélange de cystéine chauffée (115 °C – 200 min) et de HMF ayan t réagi pendant 60 min à 0 °C.

2.2.4. Effet du pH de la cystéine avant chauffage sur la formation des composés inhibiteurs

La cystéine et ses dérivés tels que le glutathion sont susceptibles de s'oxyder en fonction des conditions de process tels que le pH (**Tai et Ho, 1998**). Dès lors, l'effet du pH sur la formation des précurseurs de l'inhibition lors du chauffage de la cystéine mérite d'être étudié. Pour ce faire, des solutions de cystéine (5 mM) ont été ajustées à différents pH (1 – 12) à l'aide de solutions concentrées d'acide phosphorique et de soude, puis chauffées (115 °C – 200 min). Une fois refroidies, ces solutions ont été additionnées de HMF (5 mM) puis laissées à réagir pendant 60 min à 0 °C. Après réaction, 10 µL de mélange est introduit en cuve afin de mesurer l'activité PPO résiduelle d'aubergine (**figure 47**).



10 µL de système modèle (cystéine chauffée / HMF ; 5 mM – réaction pendant 60 min à 0 °C) sont introduits dans ce test.

Figure 47 : Effet du pH initial de la cystéine chauffée (115 °C – 200 min) sur la formation de composés inhibiteurs de l'activité PPO d'aubergine après mélange avec le HMF

D'après cette figure, l'activité résiduelle est minimale (2,8 – 5 % du témoin) pour un large domaine de valeurs de pH inférieures à 7. Pour des valeurs de pH de la cystéine avant chauffage supérieures à 7, on observe une perte de pouvoir inhibiteur qui se montre particulièrement nette à partir de pH = 11. Des travaux ont montré l'influence du pH sur la formation de composés volatils au cours du chauffage (160 °C – 30 min) de la cystéine ou dans des systèmes modèles contenant de la cystéine (**Shu *et al.*, 1985**). Selon ces auteurs, le chauffage de la cystéine à des valeurs de pH proches de son point isoélectrique (5,1), entraîne une forte dégradation de ce composé pour former des dérivés de l'acétone et de thiolane en plus des composés volatils primaires de sa dégradation (H_2S, NH_3, CO_2, acétaldéhyde). A pH 2, des composés soufrés cycliques et des thiophènes se forment, alors qu'à des valeurs de pH supérieures au point isoélectrique (dans les expériences menées par les auteurs le pH était égal à 7,1) des dégradations moins intenses se produisent suggérant que la fonction amine de ce composé thiolé est plus réactive à pH 7,1 qu'à pH 5,1 ou 2,2. **Zhang *et al.* (1988)**, ont identifié de nombreux composés volatils soufrés lors du chauffage de la cystéine à 180 °C pendant 1 h à pH 7,5. D'après les résultats observés dans cette étude, le fait que les précurseurs des composés inhibiteurs sont principalement générés pour des valeurs de pH proches du point isoélectrique de la cystéine suggère que la forme protonée du groupement thiol (pK_{SH/S^-} = 8,18) est impliquée dans la formation de ces précurseurs d'inhibition.

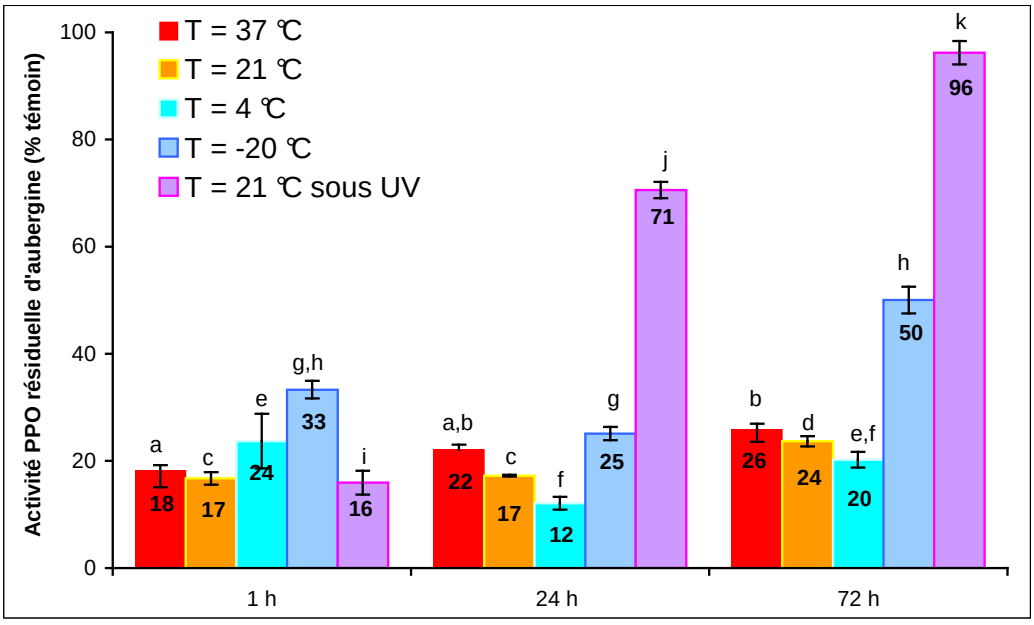
Dès lors, pour pouvoir générer un maximum de composés inhibiteurs, il est essentiel de conduire le traitement thermique de la cystéine dans des conditions acides et préférentiellement à un pH proche de 5. Cette valeur de pH correspond justement à celle des solutions de cystéine étudiées.

2.2.5. Stabilité du mélange en fonction de la température et du pH au cours du temps de stockage

D'un point de vue technologique, il est important de vérifier que les propriétés inhibitrices du mélange vis-à-vis de l'activité PPO soient stables au cours du temps de stockage. L'évolution du PI du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,5\ mM}$ a été suivie pendant 3 jours à 4 températures différentes. Les échantillons conservés dans des flacons scellés ont été stockés :

- à la température du laboratoire (≈ 21 °C),
- au réfrigérateur (4 °C),
- au congélateur (- 20 °C),
- dans une étuve à 37 °C et
- à ≈ 21 °C sous radiation UV.

Des échantillons prélevés à 1, 24 et 72 h ont permis de suivre l'évolution de leur PI vis-à-vis de l'activité PPO d'aubergine au cours du temps de stockage dans ces différentes conditions (**figure 48**).



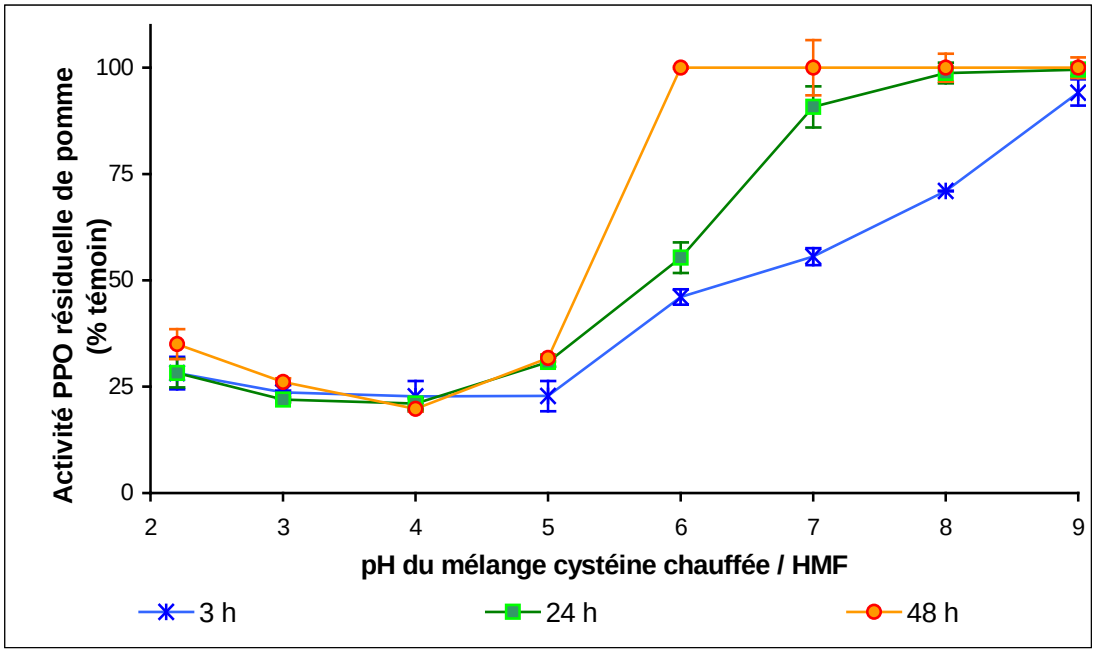
L'activité résiduelle de PPO d'aubergine est mesurée par polarographie en présence de 5 µL de mélange (5 mM) de cystéine chauffée (115 °C – 200 min) / HMF.
Les valeurs présentant des lettres différentes sont statistiquement différentes au risque p = 0,01 de déclarer deux paires différentes alors qu'elles sont identiques (test de Duncan).

Figure 48 : Effet des conditions de stockage du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,5mM}$ sur la stabilité de son pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité PPO d'aubergine au cours du temps

Selon l'analyse de la variance, le temps et les conditions de stockage ont un effet significatif ($p < 0,01$) sur l'activité PPO résiduelle. Les propriétés inhibitrices des mélanges sont relativement stables à 21 et 37 °C. Cependant, à ces températures, les mélanges gardés au-delà de 24 h voient leur PI diminuer légèrement. À 4 °C, le PI du mélange reste stable au cours des 72 h de stockage. On observe même une augmentation de ce PI après 24 h de stockage à 4 °C. Lorsque les mélanges sont soumis à des radiations UV (à 21 °C) ou à la congélation, il y a une perte significative du PI au cours du temps de stockage. On peut penser que la congélation déstabilise les produits de réaction entre la cystéine chauffée et le HMF. Ce que nous avons en fait observé est une diminution du PI des mélanges au fur et à mesure de la décongélation. Il semble donc que ce soit la décongélation des mélanges qui entraîne leur perte de PI.

D'un point de vue technologique, il semble envisageable de conserver ces mélanges sous forme de produits réfrigérés à l'abri de la lumière pendant 3 jours.

Par ailleurs, la **figure 49** montre que le pH du mélange a un effet sur la stabilité des composés inhibiteurs formés après réaction entre le HMF et la cystéine chauffée : plus le pH est bas, plus stable est le PI du mélange au cours du temps. Réciproquement, en milieu neutre ou alcalin (pH 6 – 9), il y a peu de composés inhibiteurs et ils se dégradent rapidement au cours du temps de stockage : à des pH > 6, la totalité du PI est perdue après 48 h à la température du laboratoire. D'après **Meynier et Mottram (1995)** la réaction d'un composé aldéhydique (furfural) avec un composé aminé augmente avec le pH du fait de l'augmentation de la concentration en composé amine déprotoné. Ceci laisse supposer que la réaction décrite par ces auteurs ne correspond pas à celle de formation des composés inhibiteurs de l'activité PPO.



5 µL de système modèle (5 mM) à différents pH, constitués de cystéine chauffée (115 °C – 200 min) mélangée au HMF, sont testés sur l'activité PPO de pomme mesurée par polarographie.

Figure 49 : Effet du pH sur la stabilité du pouvoir inhibiteur du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,5\ mM}$ au cours du temps de stockage (3 – 48 h)

Dans leur ensemble, ces résultats soulignent le fait que la température et le pH du milieu réactionnel influencent grandement la formation et la stabilité des composés inhibiteurs de l'activité PPO formés au cours de la réaction du HMF avec la cystéine chauffée. Par conséquent, un stockage à 20 °C ou + 4 °C et un milieu acide sont les conditions souhaitables pour préserver les propriétés inhibitrices de ces mélanges.

2.2.6. Comparaison de l'efficacité du mélange et des PRM

Efficacité de l'inhibition de PPO de différentes sources végétales

Le **tableau 26** permet de comparer l'efficacité du PRM C [A] à celle du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,5\ mM}$ [B] sur l'activité PPO d'origines végétales variées. Lorsque la concentration en cuve du mélange est identique à celle du PRM C soit 176 µM, aucune activité résiduelle n'a pu être mesurée, ne permettant pas la comparaison des propriétés inhibitrices des deux systèmes modèles vis-à-vis de PPO d'origines végétales différentes. Lorsque le mélange est introduit à une concentration 10 fois inférieures à celle du PRM C dans le milieu réactionnel, il entraîne une très forte inhibition de toutes les activités PPO.

Tableau 26 : Comparaison du pouvoir inhibiteur du PRM C [A] et du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,5\ mM}$ vis-à-vis de l'activité PPO (9 nkat) de pomme, d'aubergine, de champignon et de pomme de terre.

système modèle		concentration en cuve (µM)*	activité PPO résiduelle (% témoin)			
			PPO de pomme	PPO d'aubergine	PPO de champignon	PPO de pomme de terre
PRM C	[A]	176	2,1 ± 0,4	1,6 ± 0,3	6,5 ± 1,4	3,6 ± 0,6
$Mel_{Cys\Delta-HMF,5mM}$	[B]	17,6	7,0 ± 0,8	6,3 ± 0,6	44,0 ± 3,1	10 ± 0,5

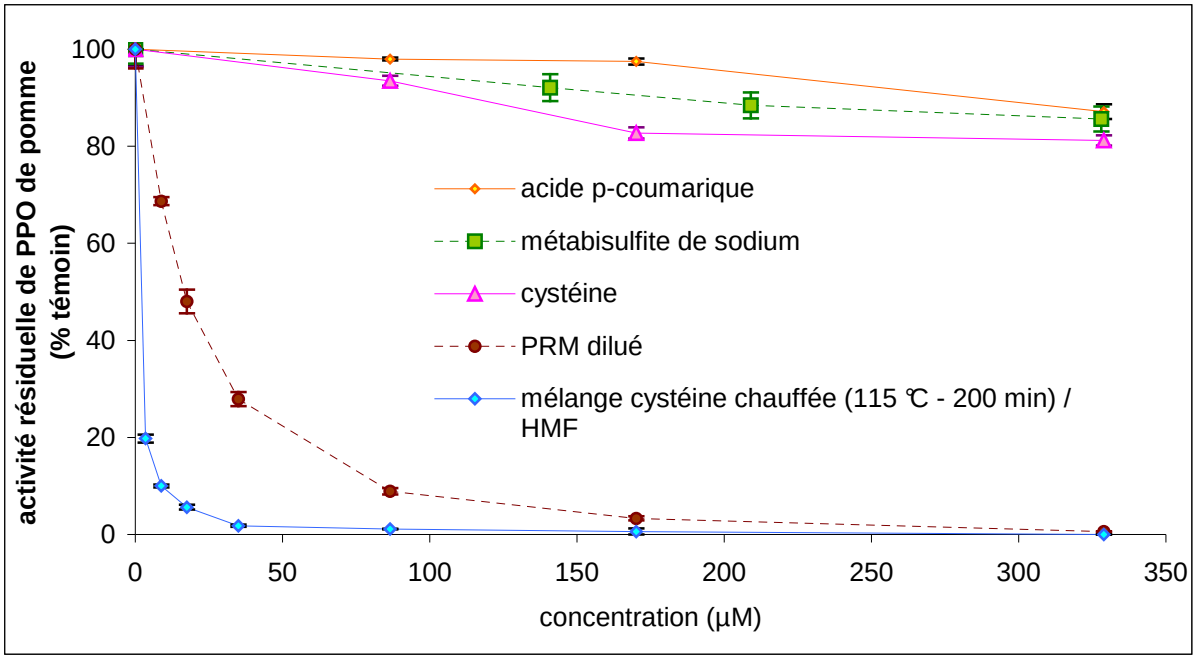
* La concentration en cuve est exprimée en équivalent cystéine avant chauffage. Des volumes de 1 µL (PRM C) ou 5 µL ($Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF}$) ont été introduits dans le milieu réactionnel.

De façon générale et comme observé précédemment, les PPO de pomme et d'aubergine se montrent 3 à 7 fois plus sensible à ces produits inhibiteurs que l'activité PPO de champignon lorsqu'elle est mesurée par polarographie en utilisant le 4-MC comme substrat.

Efficacité comparée des sulfites, d'un acide organique, du PRM C et du mélange pour inhiber la PPO de pomme

Afin de comparer l'efficacité du PRM C et du $Mel_{Cys\Delta-HMF}$, des volumes croissants de solutions (5 mM) ont été introduits en cuve et l'activité PPO résiduelle de pomme a été mesurée. Pour ce faire, le PRM C (glucose-cystéine : 1 / 0,25 M – pH 2 – 115 °C ; 200 min) a été dilué au 50^{ième} (concentration finale : 5 mM en équivalent cystéine avant chauffage). Ces échantillons ont été comparés à des solutions (5 mM) de métabisulfite de sodium, d'acide *p*-coumarique (K_{iapp} = 0,04 mM d'après **Janovitz-Klapp *et al.,* 1990**), de cystéine et de cystéine chauffée (115 °C – 200 min).

D'après la **figure 50** représentant l'activité PPO résiduelle de pomme en fonction de la concentration d'additif dans la cuve réactionnelle, il apparaît clairement qu'à concentration égale, le PRM et le mélange se montrent beaucoup plus efficaces pour inhiber l'activité PPO de pomme que les sulfites ou le meilleur composé phénolique inhibiteur de cette PPO.



Les additifs ont initialement une concentration de 5 mM. La concentration indiquée correspond à la concentration dans la cuve de mesure polarographique de l'activité PPO de pomme
Le PRM : glucose-cystéine (1 / 0,25 M – pH 2 – 115 °C, 200 min) est dilué au 50ième (concentration finale : 5 mM en équivalent cystéine avant chauffage)
Le mélange (5 mM) : cystéine chauffée (115 °C, 200 min) / HMF laissé à réagir pendant 60 min à 0 °C

<u>Figure 50</u> : Effet d'ajouts de concentrations croissantes de différents inhibiteurs de l'activité PPO de pomme

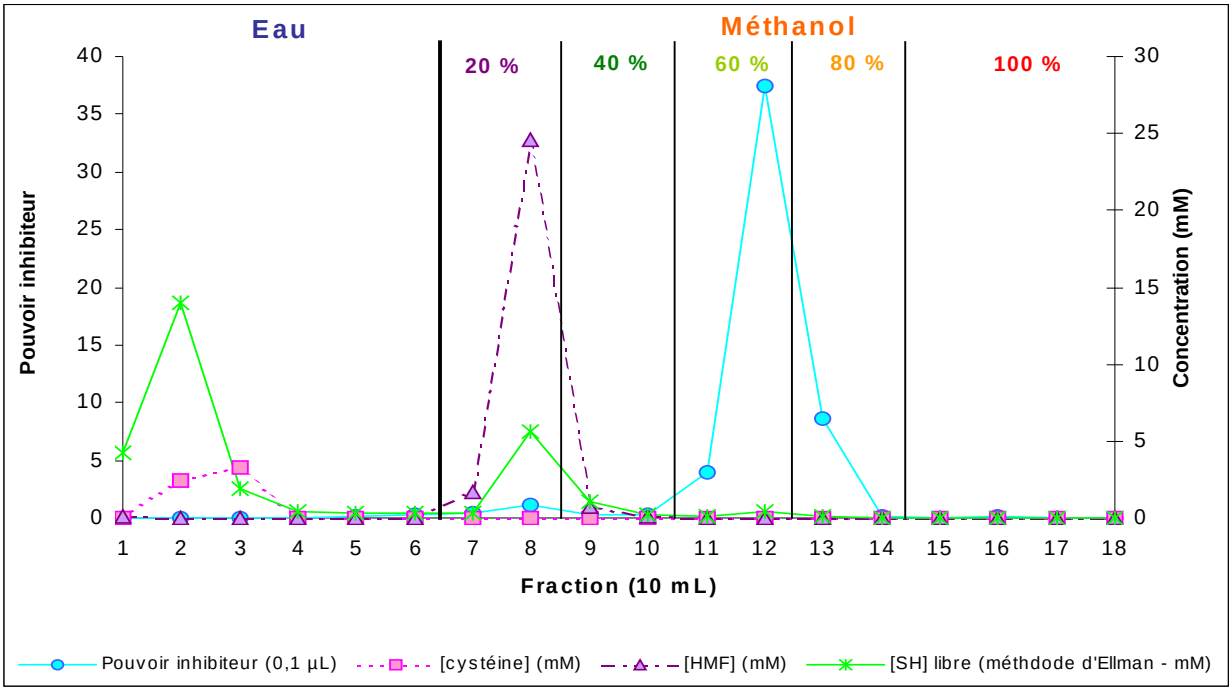
Il est à noter qu'un mélange cystéine (NON chauffée) / HMF introduit à une concentration de 200 µM en cuve, et ayant réagi dans les mêmes conditions que le mélange cystéine chauffée / HMF, conduit à une activité résiduelle de 82 ± 3,6 % (PI = 0,2), une valeur identique à celle observée avec la cystéine chauffée seule.

2.2.7. Fractionnement de mélanges inhibiteurs de l'activité PPO en phase inverse et extraction du pouvoir inhibiteur

Fractionnement du mélange cystéine chauffée / HMF

Afin de fractionner le mélange et purifier les composés responsables de l'inhibition de l'activité PPO, 10 mL de $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ (50 mM) ayant réagi pendant 2 h sont déposés en tête de colonne C18 - Méga Bond Elut (20 mL – 5 g de support C18 ayant une granulométrie de 40 µm et une porosité de 60 Å) de chez Varian France (Les Ulis – France). Cette colonne d'extraction en phase solide (SPE) a préalablement été conditionnée successivement avec du méthanol et de l'eau.

Après dépôt du mélange et lavage de la colonne par 50 mL d'eau, des fractions de 10 mL sont collectées au cours de l'élution par des solutions aqueuses enrichies en méthanol par palier de 20 %. Sur chacune de ces fractions, les concentrations résiduelles en HMF et cystéine sont mesurées par HPLC–DAD et HPLC–DEC respectivement. Parallèlement, la concentration en groupement thiol libre dans les échantillons est mesurée par la méthode d'Ellman.



Le PI a été mesuré avec 0,1 µL de chacune des fractions d'élution.

Figure 51: Profil d'élution sur une colonne SPE C18 des réactifs et du pouvoir inhibiteur issus d'un mélange (50 mM) cystéine chauffée / HMF élué par des mélanges eau / méthanol (0 / 100 à 100 / 0 par palier de 20 %)

D'après la **figure 51** montrant l'élution des différents réactants et des produits responsables du PI, il apparaît que plus de 50 % des composés thiolés sont élués au cours du lavage à l'eau de la colonne. L'élution du HMF se fait principalement avec la solution à 20 % de méthanol (fraction n°8). La fraction n° 12, correspondant à une élution dans 60 % de méthanol est très inhibitrice et pratiquement dépourvue des réactifs initiaux avec une très faible teneur en thiol libre (**tableau 27**).

Tableau 27 : Rendement de purification sur colonne SPE C18 du $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,50\ mM}$ ayant réagi 2 h à 0 °C

	Volume des fractions (mL)	Composés soufrés (Ellman)		HMF		Pouvoir inhibiteur (0,1 µL en cuve)	
		mmol	% dépôt	mmol	% dépôt	dans 10 mL	% dépôt
Mélange déposé	10	0,32		0,51		60	
fraction éluée pendant le dépôt	10	0,042	13,2	0,0006	0,1	0	0
eau (100 %)	5 * 10	0,17	52,6	0,0004	0,1	0,5	1
eau / méthanol (80 / 20)	2 * 10	0,059	18,3	0,26	52	1,5	3
eau / méthanol (60 / 40)	2 * 10	0,013	3,9	0,031	6,1	0,5	1
eau / méthanol (40 / 60)	**2 * 10**	**0,006**	1,9	**0,002**	**0,3**	**41,4**	**69**
eau / méthanol (20 / 80)	2 * 10	0,002	0,6	0,000	0	8,7	15
méthanol (100 %)	4 * 10	0	0	0,000	0	0,3	0
fraction inhibitrice (F 12)	**10**	**0,005**	**1,4**	**0,003**	**0,6**	**37**	**62**
ensemble des fractions	180	0,29	91	0,30	58	53	88

Cette fraction n° 12 représente plus de 60 % de PI déposé et elle contient moins de 1 % de HMF et 2 % des composés soufrés déposés. Ce procédé de purification semble donc être efficace pour séparer les produits inhibiteurs des réactifs initiaux n'ayant pas réagi.

Comparaison du fractionnement du mélange cystéine chauffée / HMF aux mélanges sulfure d'ammonium / HMF ou furfural

D'après le paragraphe 2.2. décrivant la relation structure / activité inhibitrice de différents composés carbonylés mélangés à différents composés soufrés chauffés ou non, il a été indiqué que le sulfure d'ammonium non chauffé et mélangé au HMF entraîne la formation de composés très inhibiteurs de l'activité PPO. D'un point de vue analytique, ce mélange présente l'intérêt de simplifier encore le

système modèle. Ainsi, trois « mélanges » modèles à 50 mM, ayant réagi 2 h à 4 °C, ont été fractionnés :

- le mélange cystéine chauffée (115 °C – 200 min) / HMF noté $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,50mM}$
- le mélange sulfure d'ammonium / HMF (noté $Mel_{AS\text{-}HMF,50mM}$) et
- le mélange sulfure d'ammonium / furfural (noté $Mel_{AS\text{-}FF,50mM}$).

Le procédé de fractionnement est simplifié par rapport à ce qui est décrit précédemment. Après dépôt du mélange inhibiteur en tête de colonne SPE C18, suit un lavage à l'eau (50 mL > 2 volumes de colonne) puis le composé carbonylé est élué dans du méthanol 20 % (v/v ; 50 mL). Le PI des fractions 100 % méthanoliques (5 mL) est mesuré. Ce fractionnement, plus rapide, permet d'obtenir des fractions très inhibitrices dans une phase 100 % organique.

La **figure 52**, montre que les mélanges contenant du sulfure d'ammonium sont plus inhibiteurs que le mélange cystéine chauffée / HMF. Comme observé lors du fractionnement décrit précédemment, le PI du mélange n'est pas élué au cours du lavage de la colonne à l'eau ou lors de l'élution par du méthanol 20 %. Par ailleurs, on observe un décalage des fractions d'élutions inhibitrices pour le mélange contenant du furfural (fraction méthanolique n° 4, notée $F4_{AS,FF}$) par rapport aux mélanges avec du HMF (fractions méthanoliques n°3 notées $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ et $F3_{AS\text{-}HMF}$). Ce décalage d'élution est sans doute lié aux différences de polarité des réactifs initiaux : le furfural est plus retenu sur une colonne C18 que le HMF (**figure 27**).

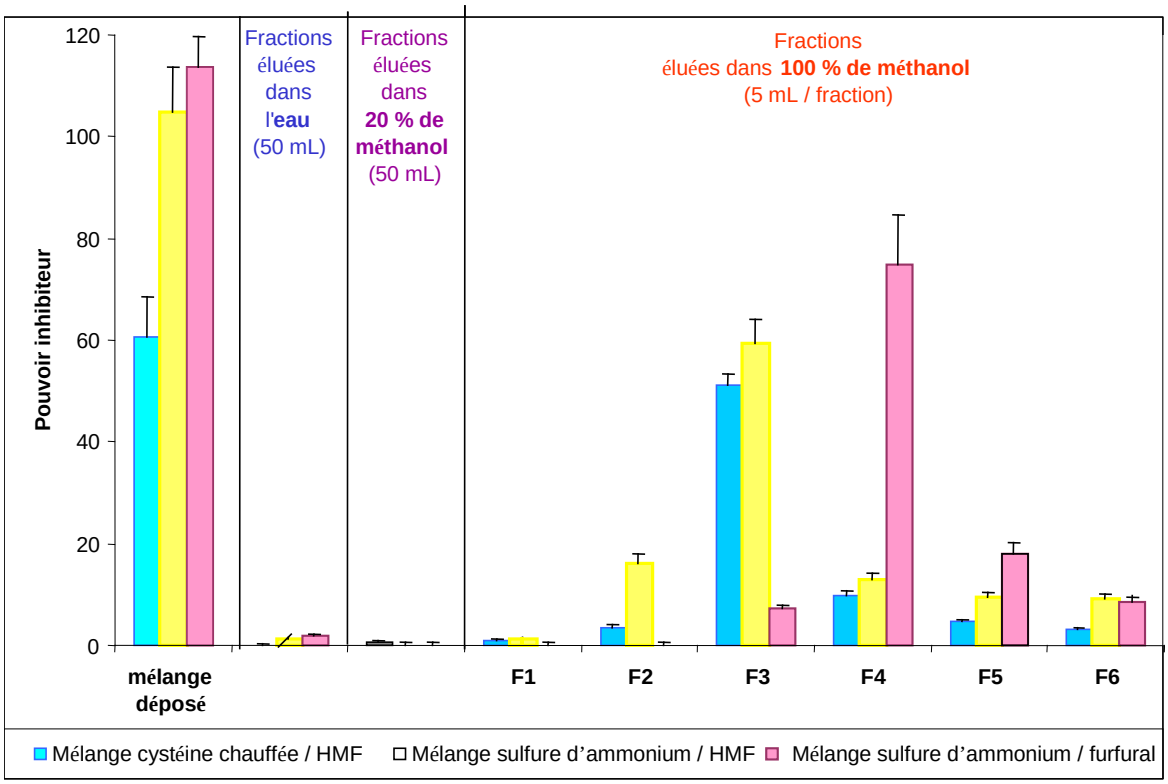


Figure 52 : Distribution du PI de l'activité PPO de pomme lors d'un fractionnement en phase inverse (colonne SPE C18) de différents mélanges (50 mM) : cystéine chauffée / HMF ; sulfure d'ammonium / HMF ; sulfure d'ammonium / furfural

2.2.8. Analyses du mélange et de la fraction inhibitrice

Spectres de transmittance infrarouge et d'absorbance UV-VIS

La fraction 100 % méthanolique $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ obtenue selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent, a été analysée par spectrophotométrie infrarouge. Ce spectre a été réalisé à la chaire de génie analytique du Cnam à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (Nicolet 740 – Thermonicolet, France) dans les conditions suivantes :

- Gamme spectrale : 4000 à 400 cm^{-1} (Infrarouge moyen)
- Nombre de balayages : 16
- Résolution : 2 cm^{-1}
- Détecteur : DTGS KBr
- Diviseur de faisceaux : KBr

Une aliquote de la fraction inhibitrice (0,2 – 0,5 mL) est déposée sur une pastille de KBr puis séchée avant d'en prendre le spectre IR. La **figure 53** montre le spectre (en transmittance) de la fraction méthanolique inhibitrice par rapport au spectre du méthanol. Parmi les quelques bandes caractéristiques, celle observée à 1660 cm^{-1} suggère la présence d'une fonction carbonyle dans l'échantillon.

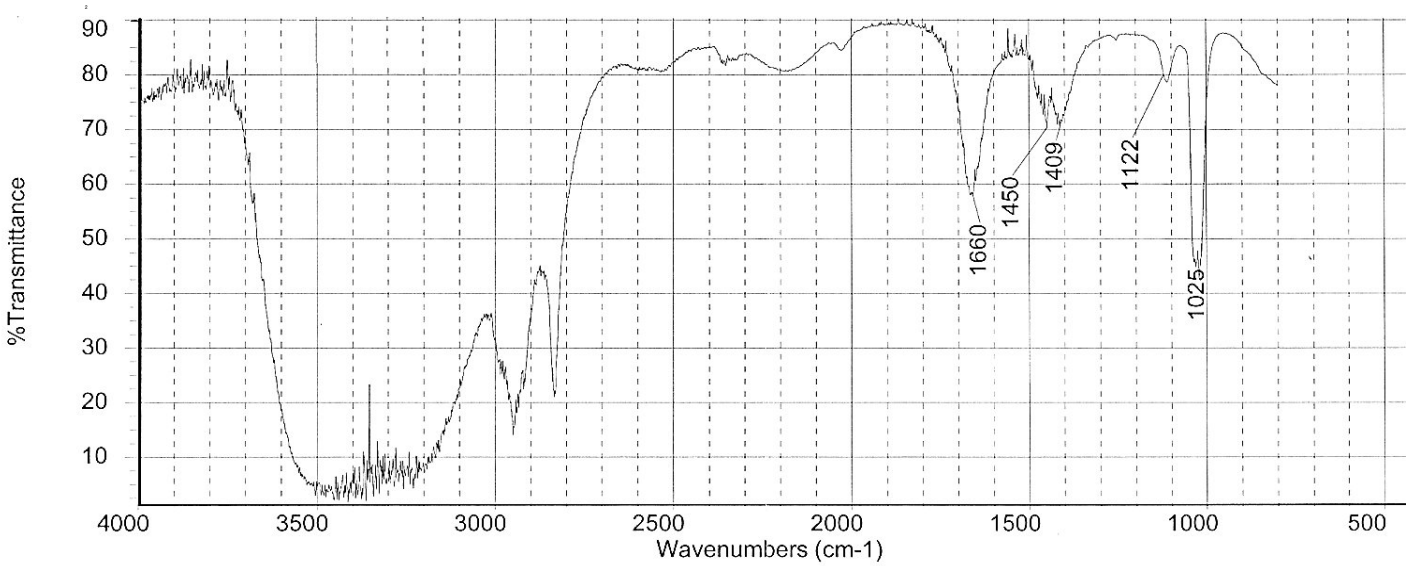


Figure 53 : Spectre de transmittance infrarouge de la fraction inhibitrice $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$

La **figure 54** montre le spectre d'absorbance (contre du méthanol) de la fraction méthanolique non diluée issue du fractionnement simplifié d'un mélange cystéine chauffée / HMF. Cette fraction inhibitrice montre un maximum d'absorbance vers 350 nm. Par ailleurs, l'absence de pics d'absorbance visibles à 220 et 283 nm caractéristiques de la cystéine et du HMF témoigne de la pureté de cette fraction. Ce même fractionnement, effectué sur mélange cystéine (NON chauffée) / HMF non inhibiteur (PI = 0,02) ne montre pas de maximum d'absorbance vers 340 – 360 nm.

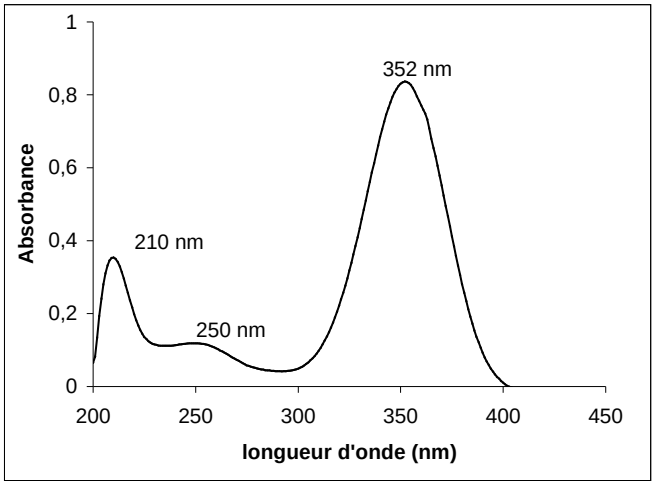
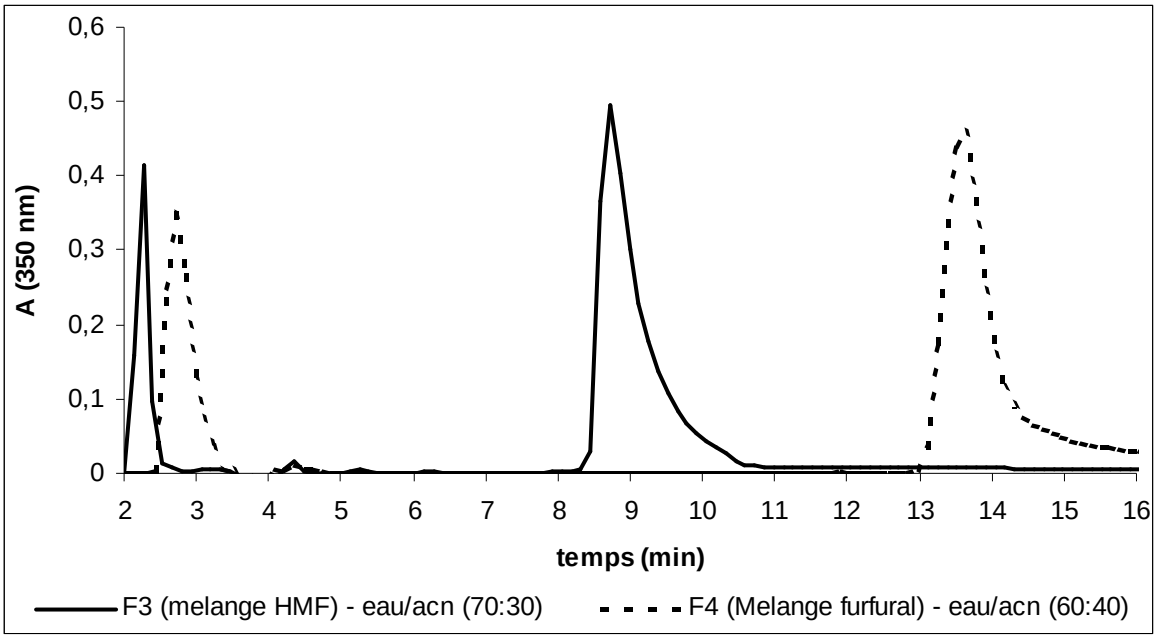


Figure 54 : Spectre d'absorbance UV-VIS de la fraction inhibitrice 100 % méthanolique $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$

Analyses en chromatographie liquide et détection UV-VIS : comparaison de différents mélanges

L'injection des différentes fractions inhibitrices ($F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$, $F3_{AS\text{-}HMF}$ et $F4_{AS\text{-}FF)}$ sur le système HPLC-DAD a permis de mettre en évidence la très faible quantité de réactif carbonylé initial (HMF ou furfural) dans ces fractions.

L'augmentation de la proportion d'acétonitrile dans la phase éluante fait apparaître dans le mélange déposé et dans les fractions inhibitrices, un pic dont le spectre présente un maximum d'absorbance vers 350 nm. Cependant pour $F4_{AS\text{-}FF}$, la proportion d'acétonitrile (noté acn) dans la phase éluante doit être de 40 % pour permettre l'élution de ce pic en moins de 20 min. La **figure 55** montre les chromatogrammes suivant l'absorbance à 350 nm au cours de l'élution par un mélange eau / acn dans deux proportions : 60 / 40 et 70 / 30 pour les fractions $F4_{AS\text{-}FF}$ et $F3_{AS\text{-}HMF}$ respectivement.

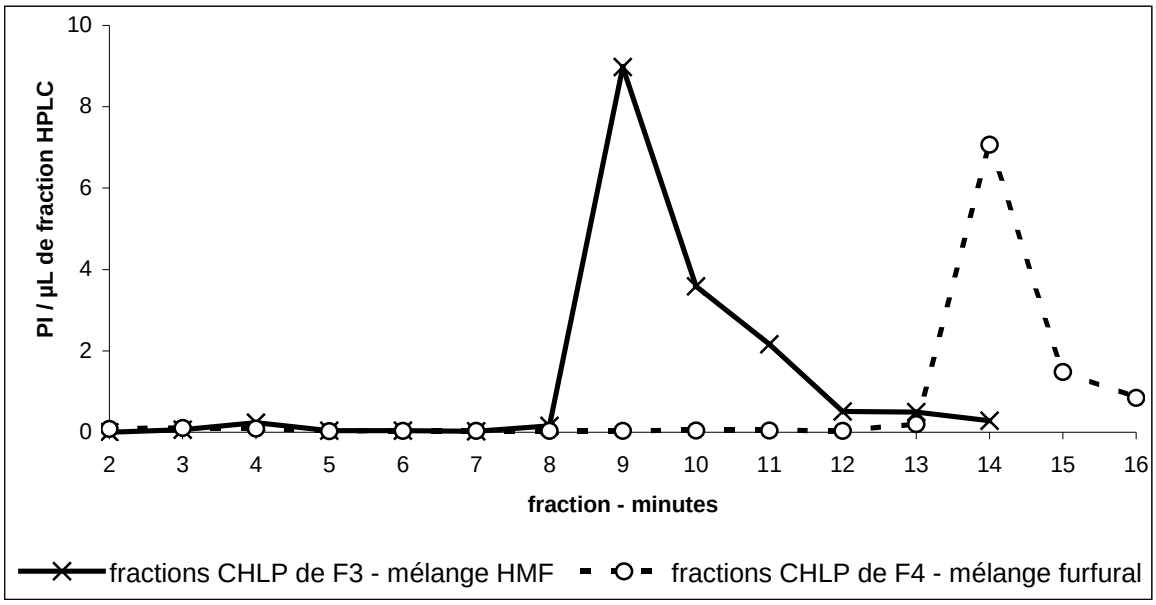


<u>Figure 55</u> : Chromatogrammes à 350 nm des fractions 100 % méthanoliques inhibitrices issues du fractionnement sur colonne SPE C18 de mélanges de sulfure d'ammonium / HMF ($F3_{AS\text{-}HMF}$; —) et de sulfure d'ammonium / furfural ($F4_{AS\text{-}FF}$; - - -) sur une colonne HPLC C18 (Y.M.C ODS-AQ AIT. ; 5 µm, 250 mm × 4.6 mm) en élution isocratique (0,8 mL.min^{-1}) avec comme phase mobile : eau / acn – 70 / 30 pour $F3_{AS\text{-}HMF}$ et 60 / 40 pour $F4_{AS\text{-}FF}$

Sur cette figure, dans chacun des mélanges, il apparaît deux pics d'absorbance à 350 nm : au début du chromatogramme, et à environ 9 et 13,1 min pour $F3_{AS\text{-}HMF}$ et $F4_{AS\text{-}FF}$ respectivement. Ceci indique

clairement que les composés issus du furfural, plus retenus sur la colonne HPLC, sont plus apolaires que ceux issus du HMF.

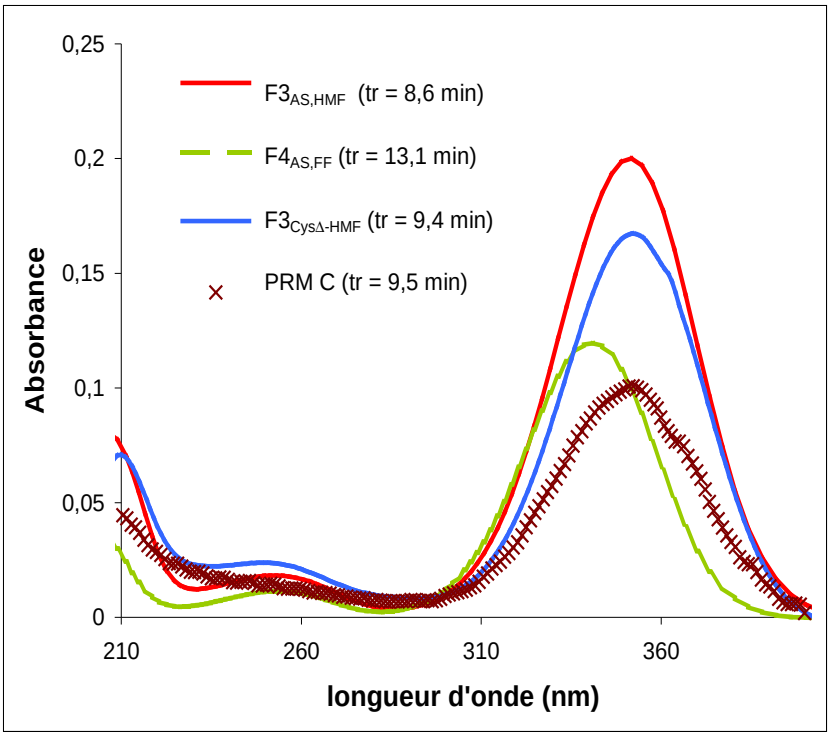
Afin de déterminer quel pic était responsable du pouvoir inhibiteur, les fractions de 0,8 mL (correspondant à une minute) sur les chromatogrammes précédents, ont été collectées après injection de 50 µL de $F3_{AS\text{-}HMF}$ et $F4_{AS\text{-}FF}$ en sortie du système HPLC-DAD. Le pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité PPO de pomme de ces fractions-minutes est mesuré par polarographie (**figure 56**). Il apparaît alors que pouvoir inhibiteur est majoritairement présent dans les fractions 9 min pour $F3_{AS\text{-}HMF}$ et 14 min pour $F4_{AS\text{-}FF}$. On peut remarquer la parfaite correspondance entre l'élution des pics à 350 nm et le pouvoir inhibiteur. Ainsi, les composés correspondants à ces pics sont responsables de la majeure partie du pouvoir inhibiteur des mélanges.



<u>Figure 56</u> : Pouvoir inhibiteur (PI) des fractions collectées en sortie du système HPLC-DAD après injection de 50 µL de $F3_{AS\text{-}HMF}$ et $F4_{AS\text{-}FF}$ élués (d = 0,8 mL.min^{-1}) isocratiquement par un mélange eau / acn 70 / 30 et 60 / 40 respectivement.

Le spectre d'absorption UV-VIS de ces deux pics est présenté et comparé au spectre d'absorbance du pic observé dans la fraction $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ à tr = 9,4 min (**figure 57**). Ces spectres présentent de grandes similitudes et notamment l'existence d'un maximum d'absorbance à 350 nm pour les mélanges à base de HMF et 340 nm pour les mélanges à base de furfural. Cet écart de 10 nm des maxima d'absorbance pourrait être expliqué par l'écart des maxima d'absorbance entre le furfural (A_{max} pour λ = 272 nm) et le HMF (A_{max} pour λ = 283 nm).

La **figure 57** présente également le spectre d'absorbance du pic à 350 nm présent à 9,5 min sur le chromatogramme du PRM C analysé par HPLC-DAD dans les mêmes conditions d'élutions que la fraction $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$. Ce spectre présente également un maximum d'absorbance à 350 nm. Bien que le PI de ce composé n'ait pas été mesuré, la présence d'un pic montrant un spectre d'absorbance similaire à ceux des composés inhibiteurs du mélange, avec un temps de rétention proche de ceux observés dans les mélanges à base de cystéine, laisse supposer qu'au moins une partie du PI des PRM pourrait être due à des composés ayant des structures chimiques similaires.



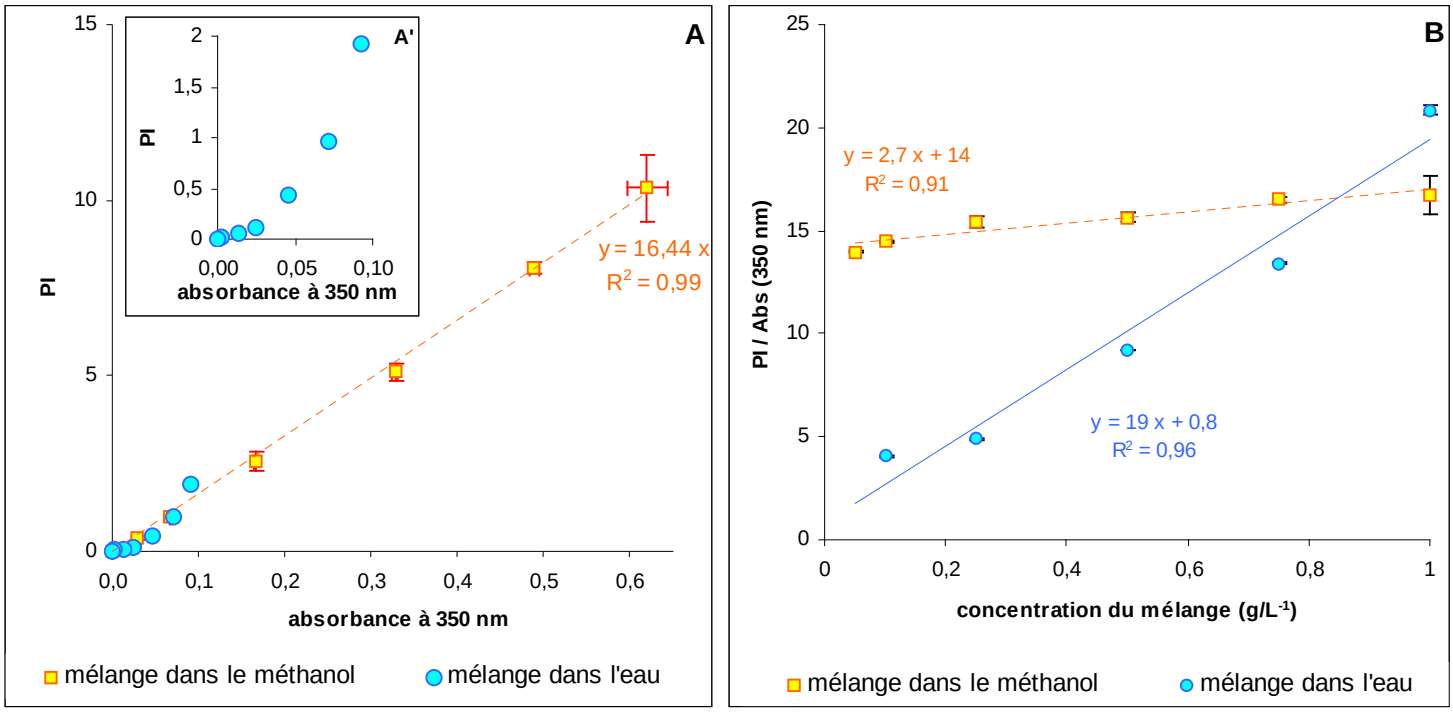
colonne HPLC C18 (Y.M.C ODS-AQ AIT. ; 5 µm, 250 mm x 4.6 mm) en élution isocratique (0,8 mL/min) avec comme phase mobile : eau / acn - 70/30 pour $F3_{AS,HMF}$ $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ et le PRM C, et 60/40 pour $F4_{AS,FF}$

Figure 57 : Spectre d'absorbance UV-VIS des pics présents dans les fractions $F3_{AS\text{-}HMF}$ (—), $F4_{AS\text{-}FF}$ (- - -) et $F3_{Cys\Delta\text{-}HMF}$ (—) et du PRM C (xxx)

Effets de la concentration du mélange sur l'absorbance à 350 nm et le PI vis-à-vis de la PPO de pomme

Afin de mieux comprendre la relation entre le PI, l'absorbance à 350 nm et la concentration des mélanges, le lyophilisat d'un mélange cystéine chauffée / HMF a été repris à différentes concentrations dans le méthanol ou dans l'eau. Le PI et l'absorbance à 350 nm de ces solutions ont ensuite été mesurés.

Concernant les mélanges repris dans le méthanol, le PI et l'absorbance montrent une relation linéaire avec la concentration et sont eux-mêmes liés linéairement (**figure 58 A**). Ceci soutiendrait l'hypothèse selon laquelle les composés inhibiteurs absorbent la lumière à 350 nm. Par ailleurs, le ratio PI sur l'absorbance à 350 nm semble indépendant de la concentration du mélange (**figure 58 B**). En revanche, concernant les mélanges lyophilisés repris dans l'eau, cette relation linéaire entre le PI et l'absorbance ne semble pas du tout suivie (**figure 58 A**). Il en résulte une forte dépendance du ratio PI sur l'absorbance à 350 nm vis-à-vis de la concentration (**figure 58 B**). Il faut cependant être prudent : compte tenu des faibles valeurs mesurées, on peut s'interroger quant à la validité des valeurs d'absorbance et de pouvoir inhibiteur.



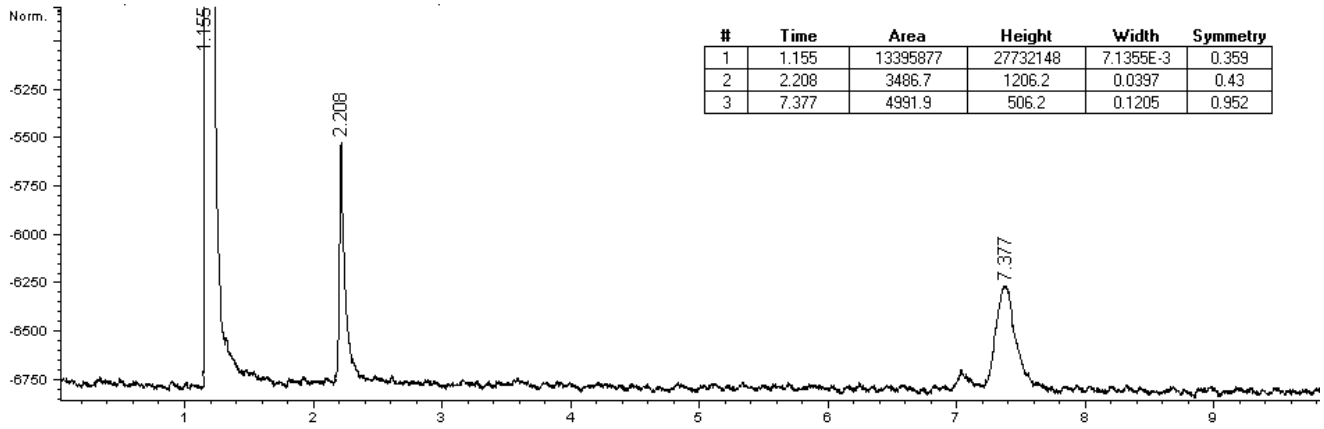
<u>Figure 58</u> : Relation entre le PI, l'absorbance à 350 nm et la concentration du mélange $cys_{\Delta\text{-HMF}}$ lyophilisé repris dans le méthanol (■) ou dans l'eau (●)

Cependant, il est indéniable que l'eau a un effet sur le PI et par voies de conséquences sur les composés responsables de l'inhibition de l'activité PPO : à concentration égale, les valeurs de PI et d'absorbance à 350 nm varient considérablement selon la nature du solvant. Ainsi à une concentration de 1 $g.L^{-1}$ de lyophilisat, la valeur de PI du lyophilisat repris dans le méthanol (PI ≈ 10) est 5 fois supérieure à celle mesurée lorsque le lyophilisat est repris dans l'eau (PI ≈ 2). Ceci semble indiquer que l'eau modifierait l'équilibre réactionnel de formation des composés inhibiteurs. Afin de pouvoir mieux comprendre ces phénomènes et déterminer l'action de l'eau sur les composés inhibiteurs, des

expériences supplémentaires seraient requises en faisant par exemple varier le pourcentage de méthanol pour re-solubiliser les lyophilisats.

Analyses des fractions inhibitrices en chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les premières séries d'expériences réalisées en CPG-FID visent à mettre au point les conditions chromatographiques de séparation des composés. Les différentes fractions méthanoliques obtenues par SPE, séchées par ajout de sulfate de sodium anhydre, filtrées et concentrées sous flux d'azote ne montrent que des chromatogrammes relativement pauvres, quelles que soient les conditions de concentration et les programmations de four et d'injecteur appliquées (**figure 59**). Le remplacement de colonnes polaires (DBwax ou carbowax) par une colonne apolaire (HT 5 de SGE International, Ringwood, Australie - greffée avec 5 % de polymères phényl-méthyl et 95 % de polycarborane-siloxane 12m x 0,32 mm, 0.1µm par exemple) n'a pas amélioré les résultats.



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	1.155	13395877	27732148	7.1355E-3	0.359
2	2.208	3486.7	1206.2	0.0397	0.43
3	7.377	4991.9	506.2	0.1205	0.952

Condition d'analyses :

- colonne : DBwax (30 m * 0,25 mm, 0,25 µm)
- température de l'injecteur et du détecteur : 250 °C
- température du four : 195 °C
- gaz vecteur : hydrogène (0,8 mL/min)

Figure 59 : Chromatogramme CPG-FID de la fraction SPE $F3_{AS\text{-}HMF}$

Cette pauvreté des chromatogrammes est également observée lors des analyses en CPG-MS des différentes fractions méthanoliques obtenues par SPE et des lyophilisats des différents mélanges repris dans du méthanol. Dans tous les échantillons issus de mélanges, il a été identifié du sulfure d'hydrogène et le composé carbonylé initial (HMF ou furfural). Des composés dérivés de ces molécules carbonylées ont également pu être identifiées telles que le furfural dans les fractions issues du HMF ou

encore des molécules dicarbonylées comme le 2,5 furandicarbaldéhyde. Par ailleurs, la comparaison d'extraits ne contenant que de la cystéine chauffée ou du sulfure d'ammonium n'a pas permis de montrer la formation de composés spécifiques aux mélanges de ces composés. De plus, la comparaison des chromatogrammes issus des mélanges furfural + cystéine chauffée et HMF + cystéine chauffée n'a pas permis de mettre en évidence la parenté entre les réactants initiaux (HMF et furfural) et les pics observés.

L'absence de résultat probant à l'issu de ces analyses en chromatographie gazeuse et notamment en CPG-MS peut résulter de la faible volatilité des molécules présentes dans l'extrait et/ou la déstabilisation des structures des composés en cours d'analyse chromatographique rendant alors impossible leur identification.

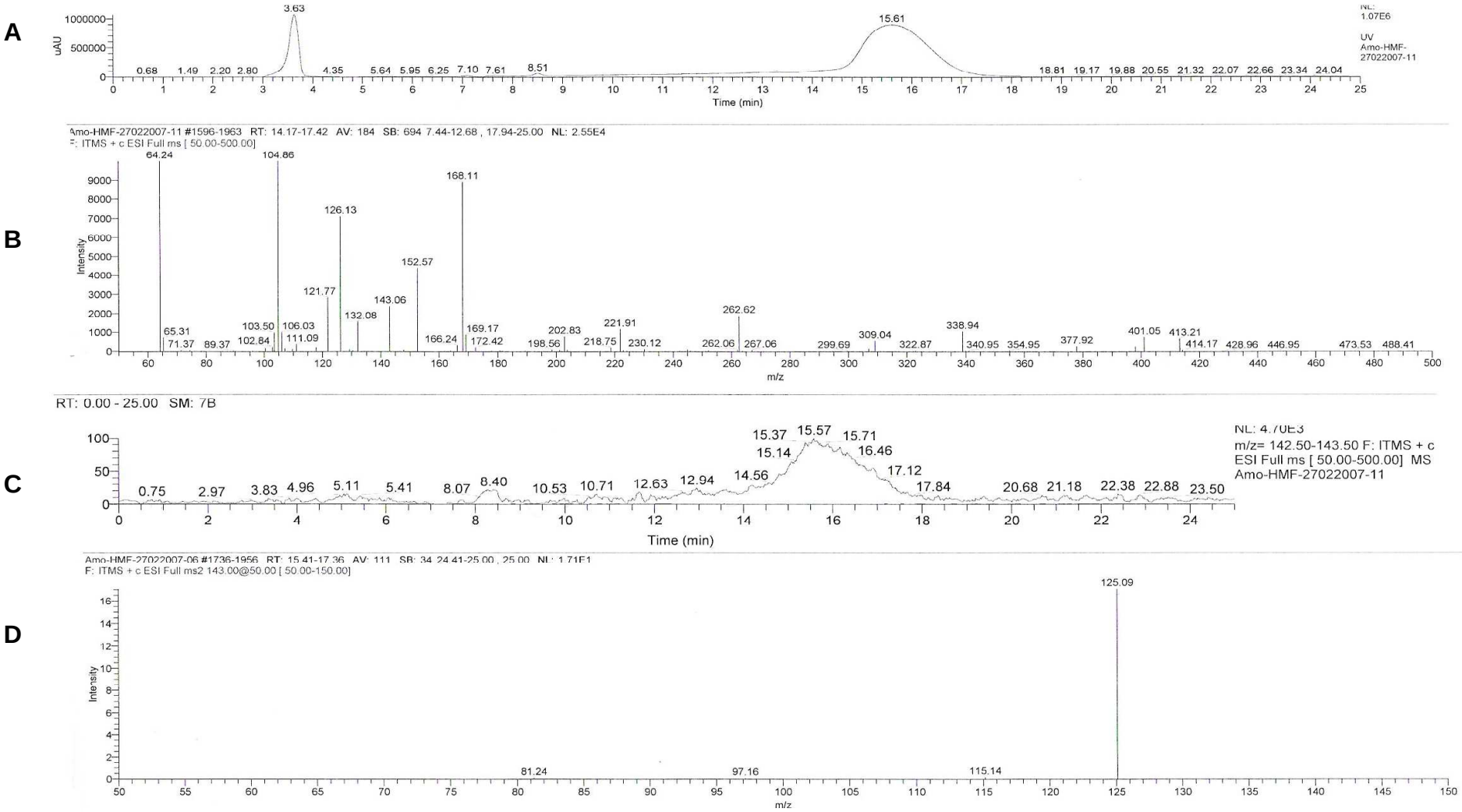
Analyses HPLC-MS

Pour ces analyses, seul le mélange le plus simple issu de composés purs : sulfure d'ammonium / HMF (5mM) ayant réagi 2 h à 4 °C a été considéré. Après lyophilisation de ce mélange, la poudre obtenue est reprise dans un même volume de méthanol. La réduction du volume de méthanol, afin de concentrer les molécules ne semble pas profitable à l'analyse : on observe alors une saturation de l'absorbance nuisant à l'analyse spectrale et l'élution du pic sur plusieurs minutes.

Que ce soit en mode d'ionisation électrospray ou chimique, positive ou négative, les chromatogrammes en ions totaux (TIC : *Total Ion Chromatogram*) issus de l'analyse des réactifs (sulfure d'ammonium et HMF) et du mélange ne montrent aucun pic supérieur au bruit de fond. Cette absence de pic sur le TIC et notamment aux temps de rétentions observés par détection UV-VIS, indique d'une part la faible capacité d'ionisation des composés présents dans ce mélange rendant difficile l'analyse par cette technique, et d'autre part la présence de chromophores sur ces molécules. En mode d'ionisation positif, les spectres de masses des composés analysés montrent les molécules protonées comme pic majoritaire. L'analyse MS-MS permet de fragmenter les ions protonés parents et d'éventuellement obtenir des informations quant à la structure du composé fragmenté.

A la zone d'absorbance à 350 nm (tr = 15,6 – **figure 60 A**) différents ratios m/z sont observés (**figure 60 B**). L'analyse du chromatogramme de ces différents ions indique que seul le fragment m/z = 143 parmi les fragments présents dans cette zone du chromatogramme, montre une abondance qui

correspond au pic observé en absorbance à 350 nm (**figure 60 C**). Le profil de fragmentation de cet ion précurseur (**figure 60 D**) met en évidence un unique ion fragment tel que m/z = 125. Deux composés de même formule brute ($C_6H_6SO_2$; M = 142 g/mol) répondent à ces caractéristiques. Ces deux molécules dont les structures pourraient éventuellement être impliquées dans les composés inhibiteurs, présentent un cycle furanne (**figure 61**), l'une une fonction thiol (**A** : 4-mercapto-5-méthyl-2-furaldéhyde) et l'autre une fonction thialdéhyde (**B** : 5-(hydroxyméthylfuran)-2-carbothialdéhyde)



<u>Figure 60</u> : Chromatogramme à 350 nm (A), fragments m/z présents à tr = 15,6 min (B), chromatogramme de l'abondance du fragment précurseur m/z = 143 (C), fragmentation du fragment précurseur (D).

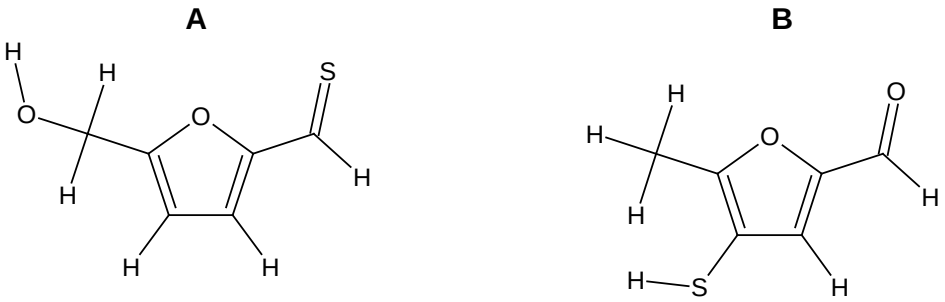


Figure 61 : Structures du 5-(hydroxyméthylfuran)-2-carbothialdéhyde (A) et du 4-mercapto-5-méthyl-2-furaldéhyde (B)

2.2.9. Effet de la lyophilisation : mélange CysΔ–HMF et PRM C

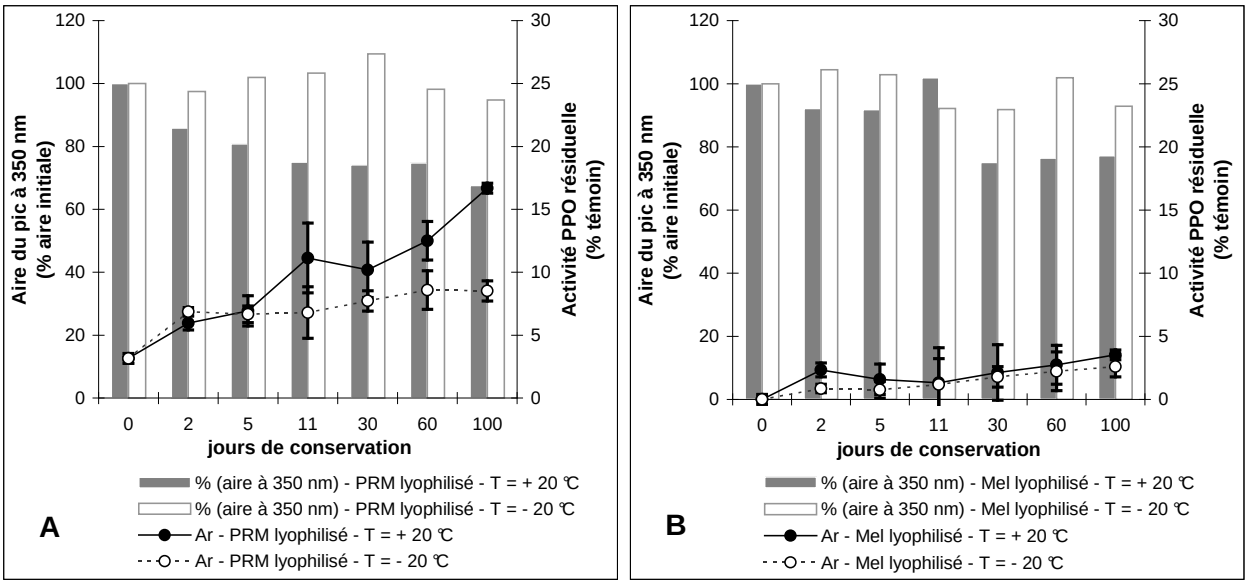
Dans une première série d'expériences, 10 mL de PRM C et de mélange (5 mM) de cystéine chauffée (115 °C – 200 min) / HMF ont été lyophilisés pendant 40 h puis repris dans un même volume (10 mL) d'eau ou de méthanol. L'activité PPO résiduelle de pomme en présence de 1 µL de PRM et de mélange avant et après lyophilisation, ainsi que l'aire du pic à 350 nm dans ces solutions sont reportées dans le **tableau 28**. Concernant le PRM, il apparaît que la lyophilisation et la nature du solvant utilisé pour solubiliser le lyophilisat, n'ont pas d'effet sur le pouvoir inhibiteur ni sur l'aire du pic à 350 nm supposé correspondre aux composés responsables de l'inhibition.

En revanche, concernant le mélange cystéine chauffée / HMF, on observe une nette augmentation du pouvoir inhibiteur et de l'aire du pic à 350 nm après lyophilisation et ceci semble être plus marqué lorsque le mélange lyophilisé est repris dans un solvant organique comme le méthanol. La lyophilisation semble donc avoir un effet positif sur la formation des composés néoformés entre la cystéine chauffée et le mélange.

Tableau 28 : Effets de la lyophilisation du PRM C et du $Mel_{CysΔ\text{-}HMF,\ 5\ mM}$ et de la nature du solvant de reprise des lyophilisats sur l'activité PPO résiduelle de pomme (1 µL en cuve) et l'aire du pic (350 nm)

	PRM C		$Mel_{CysΔ\text{-}HMF,\ 5\ mM}$	
	Ar (%)	Aire du Pic (350 nm)	Ar (%)	Aire du Pic (350 nm)
Avant lyophilisation	3,4 ± 0,4	366 144	11,6 ± 0,7	174 866
Après lyophilisation et reprise dans l'eau	2,6 ± 0,7	387 384	7,0 ± 0,4	710 718
Après lyophilisation et reprise dans le méthanol	3,2 ± 0,4	326 648	**0 ± 0**	**5 619 490**

La **figure 62** présente l'évolution à deux températures (- 20 et + 20 °C), au cours du temps de stockage de l'aire du pic à 350 nm et de l'activité PPO résiduelle de pomme (1 µL en cuve) de lyophilisats de PRM (**figure 62 A**) et de mélanges (**figure 62 B**) aliquotés et repris extemporanément dans un volume équivalent de méthanol. La lyophilisation semble un procédé efficace pour conserver le mélange. En effet, après lyophilisation, le pouvoir inhibiteur du mélange et l'aire du pic à 350 nm sont stables, que le lyophilisat soit conservé à la température du laboratoire ou à l'état congelé. Concernant le PRM, la congélation après lyophilisation semble nécessaire pour conserver les propriétés inhibitrices et la nature des composés formés. Conservé à la température du laboratoire, le lyophilisat voit l'activité PPO résiduelle augmenter de 15 points et la teneur en composés absorbants à 350 nm diminuer de plus de 30 % en 100 jours.



<u>Figure 62</u> : Evolution au cours du temps de stockage à deux températures (- 20 et + 20 °C) de l'activité PPO résiduelle de pomme (% du témoin, avec 1 µL en cuve) et de l'aire du pic à 350 nm de lyophilisats de PRM C (A) et de $Mel_{CysΔ\text{-}HMF,\ 5\ mM}$ (B) aliquotés et repris extemporanément dans un volume équivalent de méthanol.

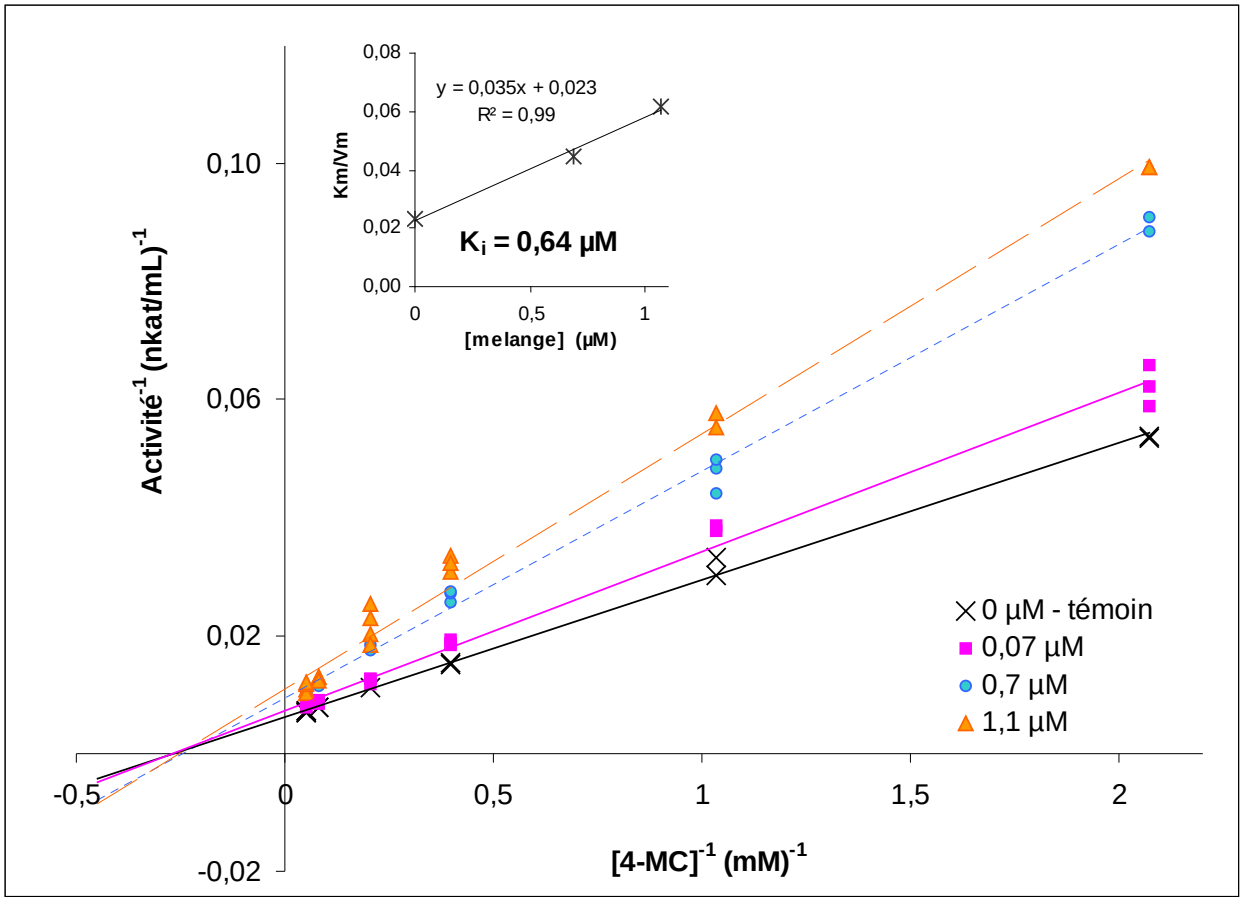
En conclusion sur l'utilisation de la lyophilisation afin de conserver les échantillons, on peut noter l'effet positif de ce procédé sur la formation de composés inhibiteurs dans le mélange. Toutefois, après lyophilisation, les PRM et le mélange montrent des propriétés inhibitrices et des compositions relativement stables au cours du temps (plus de 3 mois) s'ils sont conservés à l'état congelé.

Force est de constater que malgré la modélisation du PRM en utilisant un système simple cystéine chauffée ou sulfure d'ammonium / HMF ou furfural, malgré le fractionnement et la purification des composés inhibiteurs de ce système modèle par SPE et l'application de différentes techniques analytiques, l'identification de la structure du ou des composés responsables de l'inhibition de l'activité PPO n'a pas été possible. Plusieurs difficultés peuvent expliquer cet échec. Notamment la faible volatilité des composés des fractions inhibitrices s'opposant à leur analyse en chromatographie gazeuse. L'analyse en HPLC-MS s'est également montrée infructueuse pour l'étude de ces composés faiblement ionisables. Cependant, la cinétique lente de formation des composés, l'élution des composés inhibiteurs avec de fortes concentrations en acétonitrile en phase inverse, avec des temps d'élutions relativement longs, la présence de ratio m/z élevés dans la zone des composés inhibiteurs, l'augmentation du PI au cours de la lyophilisation, la faible volatilité des composés ou encore l'absence de stabilité lors de la congélation, sont autant d'indices qui pourraient indiquer des structures polymériques issues de liaisons faibles ou de réactions d'équilibres chimiques dans lequel l'eau interviendrait.

2.3. Cinétique d'inhibition des PPO par des mélanges HMF ou furfural / cystéine chauffée – comparaison avec les PRM

2.3.1. Effet direct de l'ajout du mélange cystéine chauffée / HMF et cinétique d'inhibition de l'activité PPO d'aubergine

Afin de caractériser l'inhibition du mélange cystéine chauffée / HMF (0,07 ; 0,7 et 1,1 µM en cuve), l'influence de la concentration en 4-MC (0,5 – 20 mM) sur l'inhibition a été étudiée à pH 4,5. D'après la **figure 63**, en se basant sur les hypothèses du quasi-équilibre et de réversibilité du complexe PPO-inhibiteur, l'inhibition de la PPO d'aubergine par le mélange est de type non compétitif vis-à-vis du 4-MC. Ce type d'inhibition, qui avait été montré par **Brun-Mérimée *et al.* (2004)** sur la PPO de pomme en utilisant des PRM fructose-glutathion (0,25 M – 90 °C , 15 h), a également été montré pour le PRM glucose-cystéine (1 / 0,25 M – pH 2 – 115 °C ; 200 min) sur la PPO d'aubergine (**Cheriot *et al.*, 2006**). Les valeurs de K_{iapp} trouvées pour ces deux systèmes modèles sont très faibles (0,7 et 2,3 µM pour le mélange et le PRM respectivement) comparées à celle de l'acide *t*-cinnamique (100 µM) décrit comme l'inhibiteur compétitif le plus puissant pour le même extrait enzymatique et dans les mêmes conditions de dosage.



Encart : graphe secondaire exprimant K_m/V_m en fonction de la concentration en cuve du mélange permettant d'établir la valeur de la constante d'inhibition apparente (K_{iapp})
Le témoin (0 µM - x) est réalisé sans mélange.

<u>Figure 63</u> : Inhibition de l'activité PPO d'aubergine par un mélange cystéine chauffée (115 °C - 200 min) / HMF à différentes concentrations : 0,07 (■) ; 0,7 (●) et 1,1 (▲) µM en cuve, en faisant varier la concentration en 4-MC (pH 4,5)

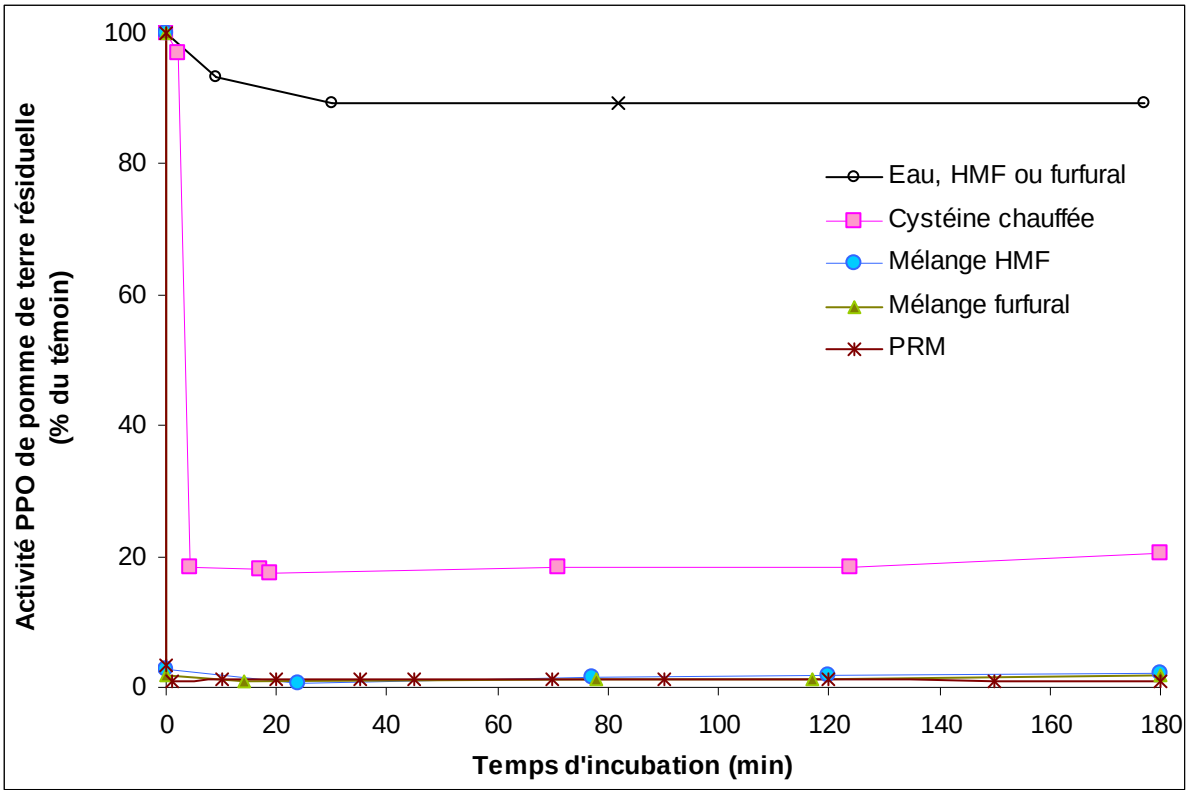
Le fait que l'inhibition soit non compétitive pour le mélange cystéine-chauffée / HMF comme pour les PRM supporte l'hypothèse selon laquelle les produits responsables de l'inhibition pourraient avoir dans les deux cas, des structures et un mécanisme d'inhibition de l'enzyme comparables.

2.3.2. L'inhibition de l'activité PPO est-elle réversible ?

D'après les expériences menées sur la PPO d'aubergine (**Cheriot *et al.*, 2006**), une faible fraction (20 %) de l'inhibition est réversible lorsque le PRM est directement introduit dans l'extrait enzymatique, mettant ainsi en évidence une inactivation partielle et irréversible de l'enzyme. Pour vérifier l'éventuelle inactivation de la PPO par les PRM et les mélanges, la PPO de pomme de terre, moins sensible à l'inhibition, a été incubée pendant 3 h à 0 °C, dans un ratio volumique de 90 % d'extrait enzymatique / 10 % d'inhibiteur avec :

- le PRM C
- la cystéine chauffée (20 mM ; 115 °C – 200 min)
- le mélange cystéine chauffée / HMF (20 mM)
- le mélange cystéine chauffée / furfural (20 mM)
- le HMF et le furfural (20 mM).

L'activité PPO résiduelle dans ces incubats (2 µL) a été mesurée au cours des trois heures d'incubation et comparée avec celle d'un incubat PPO / eau (90 / 10) dans les mêmes conditions (**figure 64**). Lorsque la PPO de pomme de terre et incubée avec de l'eau la perte en activité résiduelle correspond à la dilution de l'enzyme. De la même façon, les composés aldéhydiques seuls n'entraînent pas de perte d'activité PPO au cours des trois heures d'incubation avec l'enzyme. Dans ces mêmes conditions, la cystéine chauffée entraîne une perte rapide (< 5 min) d'environ 80 % d'activité PPO. Ce taux d'inhibition reste stable au cours des 3 h d'incubation. Ce taux d'inhibition, s'élève rapidement à 98 % pour les mélanges cystéine chauffés / HMF ou furfural et atteint 99 % pour le PRM et reste stable au cours de l'incubation.



Le témoin (○) est incubé avec de l'eau dans le même rapport de volume.

<u>Figure 64</u> : Effet de la cystéine chauffée (115 °C – 200 min ; 20 mM ; □), du PRM (glucose-cystéine : 1 / 0,25 M – pH 2 – 115 °C ; 200 min ; ●), de mélanges (20 mM) cystéine chauffée / HMF (x) ou cystéine chauffée / furfural (▲), du furfural et du HMF (20 mM ; ○) sur l'activité PPO de pomme de terre (90 / 10 v/v) au cours du temps d'incubation à 0 °C.

Afin de déterminer si l'inhibition de l'activité PPO de pomme de terre au cours de son incubation avec les composés inhibiteurs est réversible, les systèmes incubés ont été dialysés (seuil de coupure : 12 000 – 14 000 Da) pendant 24 h à 4 °C contre une solution tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 additionnée de 0,2 M en sulfate d'ammonium (solution d'élution de l'activité PPO de pomme de terre au cours de la purification par chromatographie d'interactions hydrophobes). La **figure 65** montre qu'après dialyse, seulement environ 20 % d'activité PPO est recouvrée dans les incubats avec le PRM ou les mélanges cystéine chauffée / composés carbonylés. Ce phénomène est plus marqué pour la cystéine chauffée dont l'incubat avec la PPO de pomme de terre recouvre 50 % d'activité supplémentaire après dialyse. Des résultats comparables ont été obtenus avec la PPO d'aubergine.

Il apparaît donc que l'inhibition de la PPO par la cystéine chauffée est partiellement réversible indiquant qu'elle met sans doute en jeu de petites molécules pouvant être éliminées lors de la dialyse. En comparaison, la très forte inhibition de la PPO par les PRM ou les produits néoformés issus de la

réaction entre les produits de chauffage de la cystéine et des composés carbonylés, est quasiment irréversible, suggérant une dénaturation de la protéine ou la formation des complexes au niveau du site actif de l'enzyme et ne pouvant pas être dissociés lors de la dialyse.

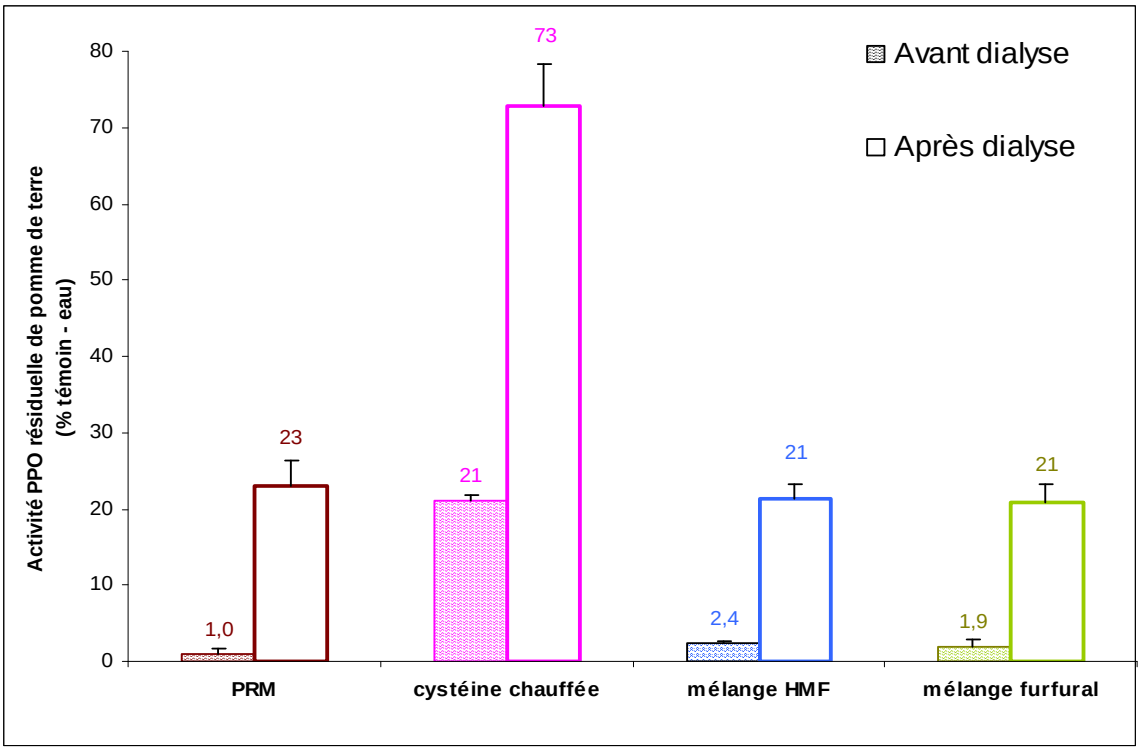
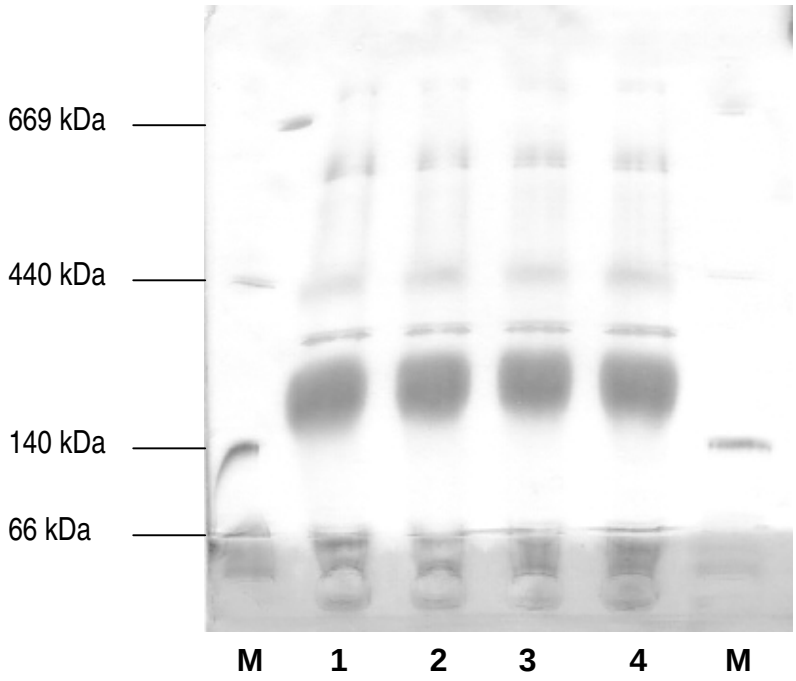


Figure 65 : Réversibilité de l'inhibition de l'activité PPO de pomme de terre après dialyse des incubats (3 h à 0 °C) constitués de 90 % de PPO et 10 % de PRM, de cystéine chauffée, du mélange cystéine chauffée - HMF, ou du mélange cystéine chauffée – furfural

2.3.3. La PPO est-elle dénaturée par les PRM et les produits néoformés ?

Afin d'étudier les modifications éventuelles de la structure de la PPO par les PRM, nous avons conduit quelques expériences d'électrophorèse. Pour cela, des incubats identiques à ceux utilisés pour l'étude de la réversibilité ont été réalisés en utilisant 900 µL d'extrait enzymatique de PPO de pomme de terre additionnée de 100 µL :

- d'eau (témoin).
- de cystéine chauffée (20 mM – 115 °C ; 200 min),
- de PRM glucose-cystéine (1 / 0,25 M – pH 2 – 115 °C ; 200 min) appelé PRM C,
- du mélange cystéine chauffée / HMF (20 mM) noté $Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF,\ 20\ mM}$,



M : Marqueurs de hauts poids moléculaires
1 : Incubat témoin PPO / eau (90 / 10)
2 : Incubat PPO / cystéine chauffée (90 / 10)
3 : Incubat PPO / PRM C (90 / 10)
4 : Incubat PPO / $Mel_{Cys\Delta\text{- HMF, 20 mM}}$ (90 / 10)

Figure 66 : Gel d'électrophorèse (polyacrylamide 8-25 %) d'échantillons traités en condition non dénaturante (Native Page) – révélation par le nitrate d'argent

Quel que soit l'échantillon déposé, l'électrophorèse réalisée en conditions non dénaturantes ne montre pas de différence de migration des bandes protéiques (**figure 66**). Un résultat similaire a été obtenu en conditions dénaturantes (traitement des échantillons par le SDS en milieu réducteur et migration en présence de SDS). Il est vraisemblable que la dénaturation protéique induite par les PRM (ou le mélange ou la cystéine chauffée) ne provoque de changement suffisant de taille ou de charge de la protéine pour être observée dans nos conditions électrophorétiques.

2.4. Propriétés antioxydantes du mélange cystéine chauffée / HMF et des PRM inhibiteurs de l'activité PPO

Les PRM et le mélange cystéine chauffée / HMF sont très efficaces pour inhiber l'activité PPO. Cependant, les expériences d'incubation entre ces produits inhibiteurs et les protéines actives n'ayant pas permis d'élucider le mécanisme d'inhibition, différentes mesures du pouvoir antioxydant (piégeage de radicaux libres et chélation du cuivre) ont été effectuées afin d'éventuellement mettre en évidence les voies d'inactivation de l'enzyme.

2.4.1. Propriétés antiradicalaires

Le pouvoir piégeur de radicaux libres du PRM glucose-cystéine (1 / 0,25 M – pH 2 – 115 °C ; 200 min) a été comparé à celui du mélange cystéine chauffée / HMF ou furfural. Les composés purs (HMF, furfural et cystéine) et la cystéine chauffée seule ont également été examinés. Les résultats des deux types de tests sont synthétisés dans le **tableau 29**.

Tableau 29 : Temps d'inhibition (test AAPH°) et CE 50 (test DPPH°) des différents composés antioxydants testés

	Test AAPH°	Test DPPH°
	temps d'inhibition (min. mM^{-1})	1 / CE 50 (mM^{-1})
cystéine	3,7 ± 0,2	1,0 ± 0,2
cystéine chauffée (115 °C - 200 min)	3,4 ± 0,2	0,8 ± 0,2
mélange cystéine chauffée (115 °C - 200 min) / furfural	2,3 ± 0,1	non mesuré
mélange cystéine chauffée (115 °C - 200 min) / HMF	2,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2
PRM glucose-cystéine (1 / 0,25 M - pH 2 ; 115 °C - 200 min)	1,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1

Quel que soit le test utilisé, la cystéine non chauffée montre le plus fort pouvoir piégeur de radicaux libres lipidiques (test AAPH° – **figure 67**) et DPPH° (test DPPH° – **figure 68**). Le pouvoir antioxydant de la cystéine, diminué par le chauffage est sans doute responsable du pouvoir antioxydant mesuré pour les mélanges cystéine chauffée / HMF ou furfural et le PRM. Ceci confirme les résultats de **Morales et Babbel (2002)** et de **Maillard *et al.* (2007)** qui attribuent le pouvoir antioxydant de PRM glucose-cystéine au groupement thiol de la cystéine.

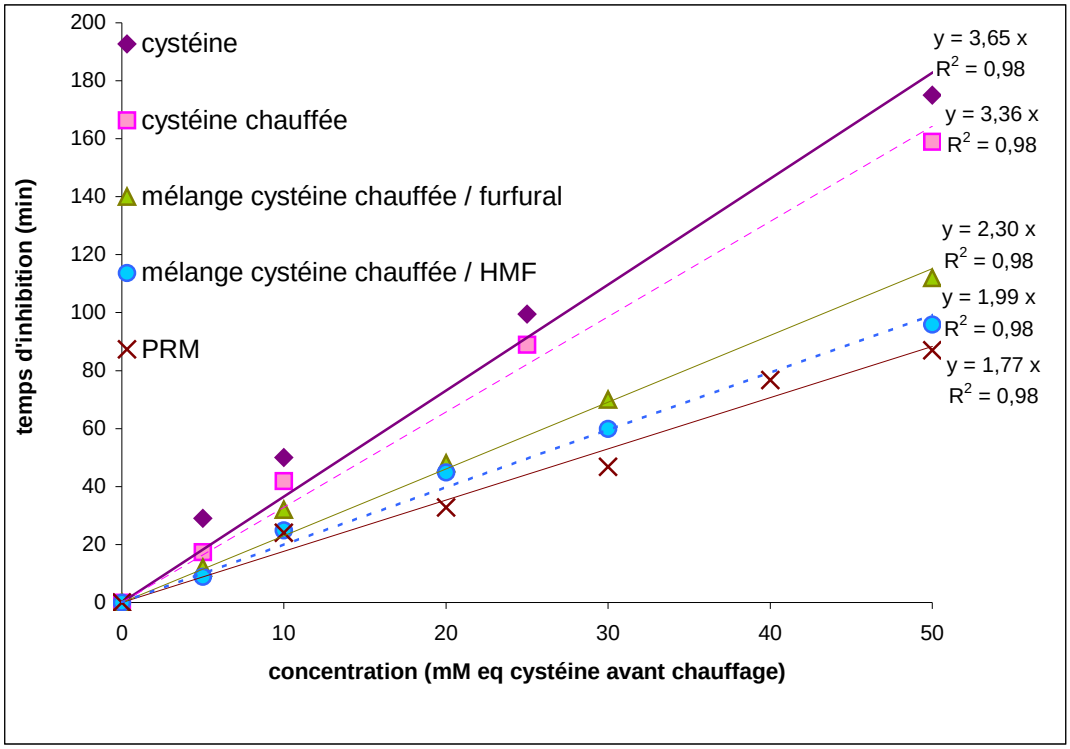


Figure 67 : Temps d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique en présence d'AAPH° et des différents composés antioxydants testés en fonction de leurs concentrations

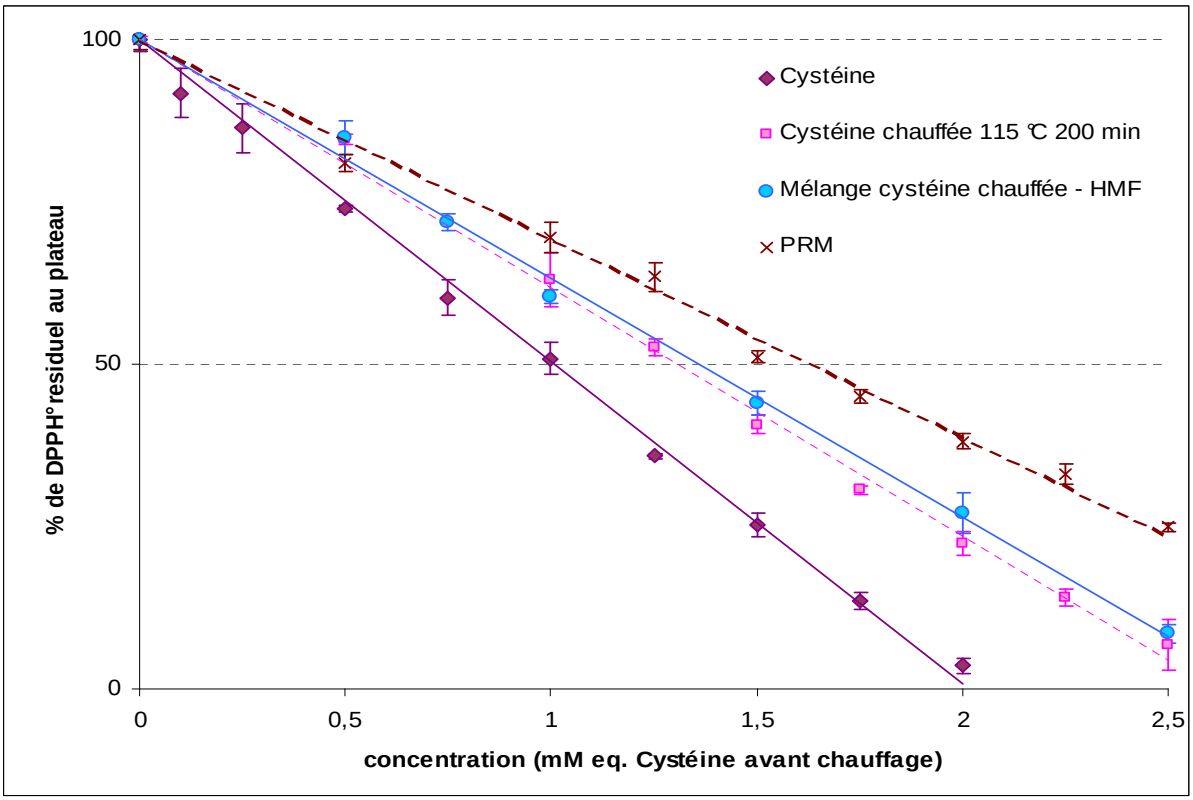
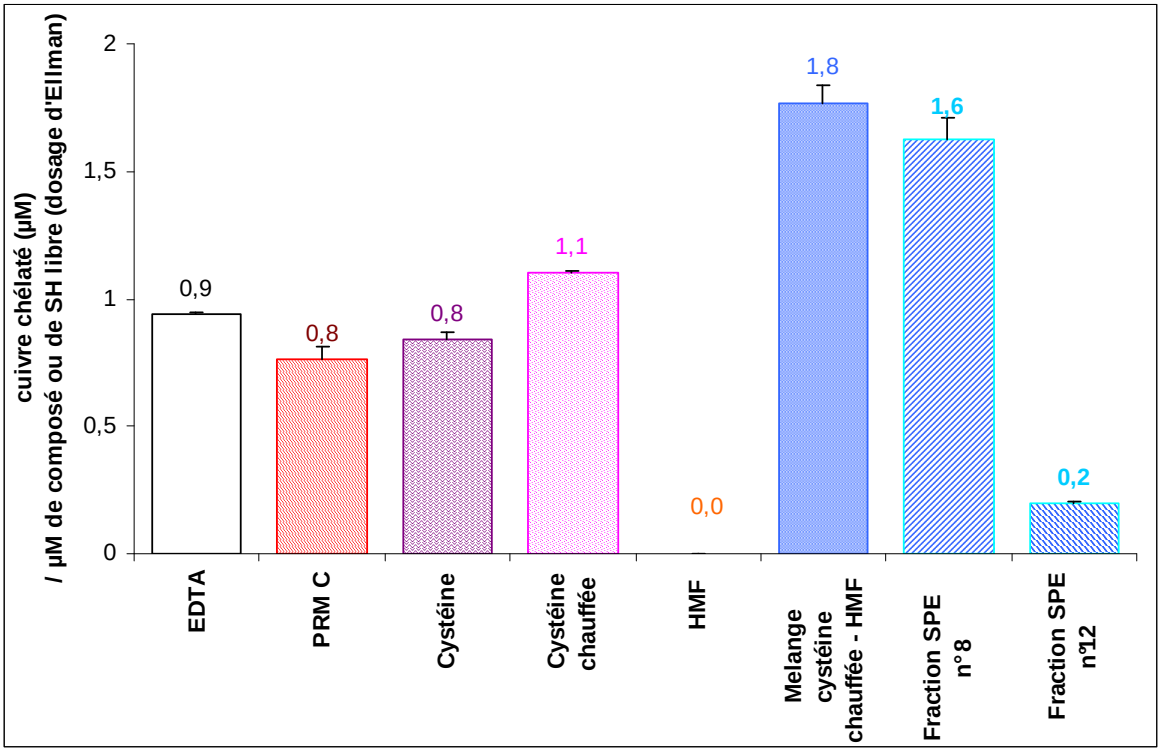


Figure 68 : Pourcentage de DPPH° résiduel au temps final (t_f - plateau) en fonction de la concentration en différents composés antioxydants testés

La cystéine seule n'a qu'un très faible effet sur l'activité PPO, le pouvoir piégeur de radicaux libres n'est sans doute pas à la base des mécanismes d'inhibition / d'inactivation de l'enzyme par ces produits.

2.4.2. Propriétés chélatrices vis-à-vis du cuivre

La PPO est une enzyme qui possède en son site actif deux atomes de cuivre Cu (II) dont la réduction en Cu(I) est à la base du mécanisme de la catalyse enzymatique. On peut donc supposer que l'inhibition de l'activité PPO peut se faire par la chélation des atomes du cuivre du site actif. Pour vérifier cette hypothèse, le pouvoir chélateur du cuivre des produits néoformés a été comparé à ceux de l'EDTA, des réactifs du mélange (HMF et cystéine chauffée) (**figure 69**). Le pouvoir chélatant des produits est exprimé en µM de cuivre chélaté par µM de composé (HMF, EDTA) ou par µM de fonction thiol libre mesurée par le dosage d'Ellman pour les composés soufrés. Dans le cas de l'EDTA, une pente proche de 1 est obtenue. Le pouvoir chélateur du cuivre des PRM est comparable à celui de la cystéine. Comme observé par **Maillard *et al.*** (**2007**) avec des PRM issus de composés thiolés, ce dernier serait majoritairement du à la présence de groupement thiol libre du réactif initial.



Les fractions n°8 et n°12 sont obtenues par fractionnement du mélange cystéine chauffée / HMF décrit dans le paragraphe 2.2.7. du chapître « résultats et discussions »
* fraction comportant 20 % de méthanol, dans laquelle le HMF est majoritairement élué
** fraction comportant 60 % de méthanol, dans laquelle le pouvoir inhibiteur est majoritairement élué

<u>Figure 69</u> : Effet chélatant vis-à-vis du $CuSO_4$ (50 µM) en présence de TMM (1 mM) du PRM C comparé aux effets de la cysteine (non chauffée ou chauffée 115 °C – 200 min), du HMF, du mélange cystéine chauffée - HMF et de fractions de ce mélange.

Alors que le HMF ne montre pas de pouvoir de chélation, et que la cystéine chauffée affiche une valeur de pente proche de 1, le mélange cystéine chauffée – HMF montre un très fort pouvoir chélateur du cuivre avec une pente égale à 1,8. On pourrait alors émettre l'hypothèse que le PI du mélange est lié à la chélation du cuivre du site actif de l'enzyme. Cette hypothèse est démentie par la mesure du pouvoir chélateur dans les fractions du mélange obtenues selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.2.2.7. En effet, près de 90 % de pouvoir chélateur est présent dans la fraction n°8, dépourvue de PI, alors que la fraction inhibitrice (fraction n°12) ne présente qu'environ 10 % du pouvoir chélateur déposé. Ceci est particulièrement inattendu dans la mesure où la particularité de la fraction n°8 est sa haute teneur en HMF lui-même dépourvu de pouvoir chélateur du cuivre. On peut supposer que des composés très chélateurs du cuivre sont élués dans la fraction n°8, en même temps que le HMF, mais que ces composés chélateurs, ne sont que très partiellement responsables de l'inhibition de l'activité PPO. Ces données appuient les résultats de **Maillard *et al.*** (**2007**), de **Brun-Mérimée *et al*** (**2004**) et de **Roux *et al.*** (**2003**) montrant que le PI des PRM n'est que partiellement du à leur pouvoir chélateur du cuivre. On

peut alors émettre l'hypothèse que le mécanisme d'inhibition de l'activité PPO par les PRM ou les produits néoformés fait intervenir une modification des résidus histidine liés aux atomes de cuivre sur le site actif de l'enzyme. Cette hypothèse a été proposée par **Oszmianski et Lee (1990)** pour expliquer l'inactivation de la PPO par le miel. **Kubo et Kinst-Hori** (**1998a ; 1998b**) suggèrent quant à eux, que certains composés aldéhydiques (cuminaldéhyde et anisaldéhyde) peuvent former des bases de Schiff avec les groupes amines primaires de l'enzyme, expliquant ainsi la perte d'activité enzymatique. Cette hypothèse n'est pas confirmée dans nos conditions expérimentales dans la mesure où le HMF (et d'autres composés carbonylés) n'ont pas d'effet sur l'activité des PPO végétales étudiées.

2.5. Propriétés mutagènes du mélange cystéine chauffée / HMF et du PRM comparées à celles des réactifs

Différents échantillons ont été envoyés à l'université de Vienne pour en analyser les propriétés mutagènes et anti-mutagènes sous la direction du Prof. Karl-Heinz Wagner.

- Le PRM C décrit par **Cheriot *et al.* (2006)** comme étant le plus inhibiteur de la PPO d'aubergine, consiste en un système modèle (glucose : 1 M / cysteine : 0,25 M ; pH = 2) chauffé à 115 °C pendant 200 min puis lyophilisé.
- Le mélange (HMF 100 mM / cystéine chauffée 115 °C 200 min 100 mM) ayant réagi 24 h à 4 °C puis lyophilisé.

Afin de mieux comprendre la part de mutagénicité occasionnée par les produits de réactions, les réactifs initiaux du mélange ont également été testés :

- HMF,
- cystéine,
- cystéine chauffée (100 mM ; 115 °C – 200 min) lyophilisée.

Le choix des concentrations des produits appliquées dans ces tests suit les recommandations de **Mortelmans et Zeiger** (**2000**) selon lesquels au moins 5 concentrations doivent être testées avec une concentration maximale supérieure ou égale à 5 mg / boîte de Pétri de produit solubilisé. Cette dernière consigne a posé des difficultés pour la cystéine chauffée qui contient de la cystine très peu soluble. Le

choix de doubler les volumes de solutions d'échantillons mis en œuvre (200 au lieu de 100 µL / boite de Pétri) a permis de respecter cet impératif de concentration.

2.5.1. L'absence de mutagénicité sur les souches TA 98 et TA 102 pour les produits inhibiteurs de l'activité PPO

Les éventuels effets mutagènes des PRM, du mélange et des témoins ont été testés en utilisant deux souches différentes de *S. typhimurium* – TA 98 et TA 102 – avec et sans activation métabolique. Le **tableau 30** présente l'ensemble des résultats obtenus dans ce test d'incorporation des substances dans les boîtes de Pétri après incubation (25 min à 37 °C) des bactéries avec les composés testés.

Aucun effet mutagène visible n'a été montré pour ce test pour le PRM, le mélange ou le HMF. Cela est inattendu dans la mesure où une étude récente de **Wagner *et al.*** (**2007**) a montré que certains PRM issus de systèmes modèles glucose-cystéine chauffés pendant des temps très courts ont un pouvoir mutagène pour des concentrations supérieures à 1 %.

Concernant le HMF, **Janzowski *et al.* (2000**) ont montré que ce composé est potentiellement mutagène *in vitro* à des concentrations élevées qui sont déjà modérément cytotoxiques. L'étude récente de **Kitts *et al.*** (**2006**) montre que les produits de caramélisation du saccharose induisent des substitutions de paires de bases dans la souche *S. typhimurium* TA 100, des conversions de gène chez *Saccharomyces cerevisiae* D7 et des mutations chromosomiques dans les cellules ovariennes de hamster chinois. L'ajout de S9 diminue généralement la mutagénicité des composés, laquelle est attribuée par les auteurs à la fraction de faible poids moléculaire non volatile des produits de caramélisation. Le HMF est même par ailleurs suspecté d'être un composé promoteur de cancer du colon (**Zhang *et al.*, 1993**). Cependant, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, d'après les résultats de l'étude réalisée ici, le HMF, dans les concentrations testées ne montre pas de propriétés mutagènes pour aucune des deux souches testées, en présence et en absence d'activateur métabolique. Ceci est sans doute dû aux différences de concentrations utilisées dans les tests : **Janzowski *et al.*** (**2000**) observent un effet mutagène du HMF à de très hautes concentrations (120 mM). Par ailleurs, d'autres études mettent en évidence l'absence d'effet mutagène (**Aeschbacher *et al.*, 1981** ; **Florin *et al.*, 1980**) ou toxique (**Wieslander *et al.*, 1995**) du HMF. En revanche, contrairement aux études de **Kim *et al.*** (**1987**) et de **Kong *et al.*** (**1989**), il n'a pas été trouvé de pouvoir anti-mutagène à ce niveau du test.

<u>Tableau 30</u> : Nombres de colonies his$^+$-révertantes (moyenne ± écart-type) avec les souches TA 98 et TA 102, en absence (S9$^-$) et en présence (S9$^+$) d'activateur métabolique

		TA 98	TA 98 S9$^+$	TA 102	TA 102 S9$^+$
	(mg / boîte)	(colonies révertantes / boîte : moyenne ± écart-type)			
Contrôle négatif		22 ± 6	43 ± 7	606 ± 32	656 ± 33
PRM	5	26 ± 5	52 ± 6	638 ± 60	640 ± 46
	1	18 ± 5	52 ± 8	583 ± 82	673 ± 78
	0.5	20 ± 4	49 ± 7	636 ± 37	631 ± 81
	0.1	18 ± 6	44 ± 8	589 ± 27	571 ± 54
	0.05	22 ± 6	41 ± 5	617 ± 56	620 ± 60
Mélange	5	24 ± 7	47 ± 2	578 ± 87	641 ± 69
	1	23 ± 5	45 ± 3	601 ± 88	553 ± 41
	0.5	27 ± 8	39 ± 8	566 ± 50	663 ± 71
	0.1	23 ± 7	45 ± 3	560 ± 36	537 ± 44
	0.05	18 ± 5	33 ± 7	551 ± 31	611 ± 18
Cystéine	5	55 ± 6 [(a)]	67 ± 7 [(a)]	1826 ± 378 [(b)]	3922 ± 126 [(b)]
chauffée	1	27 ± 5	55 ± 6	639 ± 58	828 ± 61
	0.5	23 ± 5	41 ± 5	619 ± 48	643 ± 32
	0.1	20 ± 5	40 ± 7	587 ± 71	583 ± 11
	0.05	19 ± 6	37 ± 5	558 ± 30	493 ± 43
Cystéine	5	63 ± 10 [(a)]	92 ± 3 [(a)]	2210 ± 207 [(b)]	4915 ± 246 [(b)]
	1	39 ± 8	43 ± 5	788 ± 142	857 ± 30 [(a)]
	0.5	30 ± 8	41 ± 8	605 ± 68	628 ± 92
	0.1	28 ± 5	49 ± 7	600 ± 34	504 ± 70
	0.05	25 ± 8	42 ± 3	606 ± 39	570 ± 71
HMF	5	19 ± 5	46 ± 6	573 ± 53	599 ± 33
	1	28 ± 6	40 ± 7	583 ± 46	710 ± 16
	0.5	23 ± 3	49 ± 2	577 ± 36	666 ± 52
	0.1	23 ± 4	44 ± 3	601 ± 43	675 ± 95
	0.05	25 ± 6	38 ± 4	509 ± 62	545 ± 44
Contrôle positif		422 ± 87	858 ± 6	2820 ± 179	1979 ± 101

[(a)] : supérieur au contrôle négatif ($p < 0.05$)

[(b)] : supérieur au double du contrôle négatif ($p < 0.05$)

A contrario, et de façon surprenante, la cystéine chauffée et non chauffée montrent des effets mutagènes. Pour la souche TA 98, en l'absence et en présence d'activation métabolique, aux concentrations les plus élevées (5 mg / boîte), le nombre de colonies révertantes par boîte est significativement ($p < 0,05$) supérieur à celui observé pour le contrôle négatif en présence d'eau. Par

ailleurs, dans chaque condition de test, une relation entre la concentration et le nombre de colonies revertantes a pu être établie (R > 70 % pour le modèle de régression linéaire). Cela indique une tendance de ces deux composés à être mutagène. Cette tendance observée avec la souche TA 98 se renforce avec la souche TA 102, considérée comme plus sensible aux mutations. En effet, aux concentrations maximales de ce test, en présence de cystéine chauffée et non chauffée, le nombre de colonies revertantes est significativement ($p < 0,05$) supérieur au double du nombre de colonies observées dans le contrôle négatif. Par ailleurs une très forte relation concentration – nombre de colonies a été observée ($R^2 > 92,5$ % pour le modèle de régression linéaire). Ceci indique clairement un effet mutagène de la cystéine également observé avec la cystéine chauffée sans doute en raison de la cystéine résiduelle dans cet échantillon.

La cystéine étant un acide aminé, sa mutagénicité a été peu étudiée. Les études de **Glatt** (**Glatt et Protic-Sabljic, 1983** ; **Glatt, 1989**) et de **Yamaguchi et Yamashita** (**1981**) montrent un effet mutagène de la L-cystéine et du glutathion sur différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les auteurs notent également que la mutagénicité de ces composés thiolés est accrue en présence d'activateur métabolique comme le S9, en accord avec nos observations. Ils supposent que ces résultats sont dus à des interactions métaboliques et aucune autre explication n'a été fournie à l'heure actuelle pour expliquer ce phénomène. Néanmoins, la L-cystéine n'entraînant pas de mutations génétiques dans les cellules de mammifères (cellules V 79 de Hamster chinois), **Glatt *et al.*** (**1990**) suggèrent qu'il existe dans les cellules de mammifères un système de protection efficace contre cet acide aminé.

2.5.2. Pouvoir antioxydant des produits inhibiteurs de l'activité PPO dans le test d'Ames en utilisant la souche TA 102

Les propriétés antioxydantes des échantillons ont été testées dans les mêmes concentrations que leurs propriétés mutagènes : 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 mg / boîte en utilisant la souche TA 102 comme marqueur des oxydations de l'ADN (**tableau 31**). Les solutions d'échantillons aux différentes concentrations ont été mélangées à de l'H_2O_2 (60 mM) juste avant l'incubation (25 min à 37 °C) avec les cultures cellulaires en absence ou en présence d'activateur métabolique (S9-mix).

Tableau 31 : Nombres de colonies his$^+$-révertantes (moyenne ± écart-type) avec la souche TA 102 en présence H_2O_2, en absence (S9$^-$) et en présence (S9$^+$) d'activateur métabolique

		TA 102 H_2O_2+		TA 102 H_2O_2+ S9+	
	(mg / boîte)	(révertants / boîte : moyenne ± écart-type)			
Contrôle négatif		1542 ± 174		779 ± 107	
PRM	5	1429 ± 255		1407 ± 76	(a)
	1	1545 ± 190		777 ± 41	
	0.5	1761 ± 131		785 ± 44	
	0.1	1751 ± 186		840 ± 191	
	0.05	1604 ± 188		880 ± 183	
Mélange	5	811 ± 172	(c)	1121 ± 43	
	1	1302 ± 66		813 ± 62	
	0.5	1342 ± 75		798 ± 57	
	0.1	1301 ± 163		703 ± 16	
	0.05	1316 ± 76		716 ± 2	
Cystéine	5	1583 ± 237		4214 ± 240	(b)
chauffée	1	1396 ± 83		1343 ± 62	(a)
	0.5	1529 ± 129		984 ± 41	
	0.1	1523 ± 124		675 ± 41	
	0.05	1497 ± 163		619 ± 12	
Cystéine	5	1606 ± 191		4800 ± 242	(b)
	1	1396 ± 119		1446 ± 386	(a)
	0.5	1529 ± 120		933 ± 129	
	0.1	1438 ± 141		797 ± 70	
	0.05	1422 ± 59		837 ± 38	
HMF	5	794 ± 64	(c)	615 ± 52	
	1	1001 ± 82	(c)	607 ± 74	
	0.5	1003 ± 76	(c)	820 ± 111	
	0.1	1023 ± 51	(c)	686 ± 63	
	0.05	1012 ± 54	(c)	678 ± 48	
Contrôle positif		3267 ± 387		1946 ± 89	

(a) : supérieur au contrôle négatif ($p < 0.05$)

(b) : supérieur au double du contrôle négatif ($p < 0.05$)

(c) : inférieur au contrôle négatif ($p < 0.05$)

Le peroxyde d'hydrogène est un métabolite cellulaire normal formé lors de plusieurs réactions catalysées ou non par des enzymes (**Halliwell et Clement, 2000**) qui possède une très forte perméabilité aux membranes cellulaires. L'H_2O_2 en soit, est chimiquement faiblement réactif et agit

comme un oxydant faible mais n'oxyde pas la plupart des molécules biologiques (lipides, ADN, protéines) sauf si ces molécules possèdent des groupes réactifs thiolés ou des résidus méthionine (**Hampton et Orrenius, 1997**). C'est seulement lorsque l'H_2O_2 se convertit en radical hydroxyle (OH°) sous l'action des rayonnements UV ou par interaction avec des métaux de transition (réaction de Fenton) que l'H_2O_2 atteint son pouvoir oxydant (**Ueda *et al.*, 1996**). Par ailleurs, la mutagénicité induite par H_2O_2 peut être réduite par des mécanismes antiradicalaires (**Grey et Adlercreutz, 2003**).

Concernant la cystéine et la cystéine chauffée, la mutagénicité observée précédemment, disparaît en présence d'H_2O_2 : en l'absence d'activation métabolique ($S9^-$), il n'y a pas de différence ($p < 0,05$) entre le nombre de colonies his^+-révertantes observées pour les échantillons de cystéine ou de cystéine chauffée et le contrôle négatif. Ce phénomène, observé par **Glatt** (**1989**) en ajoutant de la glucose-oxydase dans le test d'Ames, s'explique sans doute par l'oxydation spontanée de la cystéine en cystine en présence d'H_2O_2 décrite dans plusieurs publications (**Cardey et Enescu, 2007** ; **Luo *et al.*, 2005**) et représentée **figure 70**. L'observation d'un précipité blanc lors du mélange des solutions les plus concentrées de cystéine et de cystéine chauffée avec la solution d'H_2O_2 (60 mM) avant l'incorporation de ces solutions au test d'Ames, supporte cette hypothèse : ce précipité pourrait être la cystine, insoluble soluble à froid et formant des précipités blancs. Ainsi, la cystéine sous forme de cystine insoluble, ne serait plus perméable aux membranes cellulaires et perdrait son pouvoir mutagène (**Stark *et al.*, 1987**). Pourtant, en présence d'activateur métabolique, la cystéine chauffée et non chauffée montre un pouvoir mutagène significatif : le nombre de colonies revertantes observées est significativement ($p < 0,05$) supérieur au double de colonies observées dans le contrôle négatif pour les concentrations les plus fortes (5 mg / boîte). Il y a par ailleurs une forte corrélation entre la concentration de l'échantillon et le nombre de colonies révertantes ($R^2 > 98$ % pour le modèle de régression linéaire). Ceci indique que la mutagénicité de la cystéine, perdue en présence d'H_2O_2 est rétablie en présence d'activateur métabolique. Dès **1962**, **Patrick** décrit la réduction de la cystine en présence de $NADH_2$ catalysée par la cystine réductase (EC 1.8.1.6) présente dans le foie. Nous n'avons pas pu observer l'éventuelle disparition du précipité blanc de cystine après ajout de l'extrait de foie en raison de son opacité. Mais il est possible, tous les éléments étant réunis, que la réduction de la cystine ait lieu, que ces enzymes aient régénéré la cystéine, pouvant expliquer ainsi la réapparition de colonies révertantes en présence d'échantillons de cystéine et cystéine chauffée.

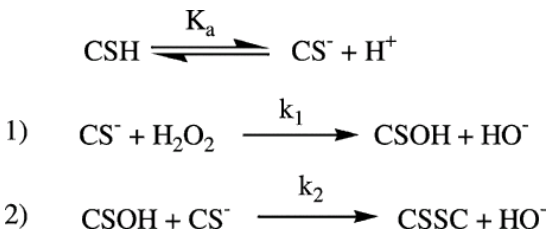


Figure 70 : Réaction d'oxydation de la cystéine en cystine en présence de peroxyde d'hydrogène (d'après Luo *et al.*, 2005)

Le mélange montre, en absence et en présence d'activateur métabolique (S9), une résultante des effets des deux constituants. Sans S9, à la plus haute concentration, on observe un faible effet antioxydant : le nombre de colonies révertantes est significativement ($p < 0,05$) inférieur à celui observé pour le contrôle négatif. Il y a par ailleurs un effet dose ($R^2 > 70$ % pour le modèle de régression linéaire). Cette tendance antioxydante, observée en l'absence d'activation métabolique, est sans doute due à la présence de HMF résiduel dans le mélange. En présence d'activateur métabolique, le mélange montre un faible effet mutagène à sa plus haute concentration. Cet effet ne devient significatif qu'à $p < 0,075$. On ne peut donc pas considérer que le mélange a un réel pouvoir antioxydant ou mutagène.

En présence de peroxyde d'hydrogène et en l'absence d'activation métabolique, le PRM testé n'a pas d'effet. Il n'est ni antioxydant ni mutagène. En revanche, en présence d'activateur métabolique, une tendance à la mutagénicité apparaît : à la plus haute concentration, le nombre de révertants est statistiquement supérieur à celui observé dans le contrôle négatif et il y a un effet dose-dépendant ($R^2 > 75$ % pour le modèle de régression linaire). Alors que l'activation métabolique est en général utilisée pour mimer les mécanismes détoxifiants des organismes supérieurs, les PRM voient au contraire leur mutagénicité ou capacité pro-oxydante augmentée en présence d'activation métabolique. Ceci a également été observé par **Wagner *et al.*** (**2007**), pour des PRM issus de systèmes modèles cystéine-glucose ou cystéine-fructose.

En conclusion, selon les résultats des tests d'Ames effectués sur ces échantillons, compte tenu des concentrations utilisées pour l'inhibition de la PPO *in vitro* et lors de l'inhibition du brunissement enzymatique dans les mesures de couleur, il n'y a pas d'effet mutagène du mélange, et une tendance mutagène du PRM seulement aux fortes concentrations en présence de peroxyde d'hydrogène et d'activation métabolique. L'utilisation du mélange et du PRM dans des procédés alimentaires semble donc envisageable à de faibles concentrations. Cependant, il est important de noter que le test d'Ames n'est qu'une première étape dans l'établissement de la non-toxicité de produits à destination des

industries agro-alimentaires. Afin d'établir plus entièrement l'absence de risques liés à l'utilisation de ces produits, d'autres tests sur d'autres cultures cellulaires, sur des cellules d'organes (CACO Cell), des études sur les voies métaboliques de ces produits … devront être réalisées.

2.6. Mise en œuvre des PRM et des mélanges pour inhiber le brunissement enzymatique

L'apparition du brunissement enzymatique de broyats de fruits ou de légumes se traduit principalement par une diminution de la luminance (*L**) (**Hicks *et al.*, 1996**). La modification des paramètres colorimétriques *a** et b* indiquent un changement de la couleur : une augmentation du paramètre *a** indique une coloration plus rouge ou moins verte tandis qu'une augmentation du paramètre *b** indique une coloration plus jaune ou moins bleue. Ce dernier paramètre colorimétrique (*b**) semble être moins adapté à la description du changement de couleur dans le cas du brunissement enzymatique : il est rarement significatif ni représentatif de l'échantillon étudié, il n'est donc pas considéré dans cette étude qui met en œuvre différents fruits ou légumes. De grandes difficultés ont été rencontrées lors de l'utilisation d'aubergine pour ces essais de mesures de couleur. Si les paramètres de variabilités couramment rencontrés tels que la saisonnalité, la variété ou encore le type de culture (hors sol, sous serre, plein champ…) peuvent être contrôlés, de grandes différences des capacités de brunissement enzymatique ont été observées au sein de lots identiques d'aubergine. C'est pourquoi l'efficacité des PRM, des produits néoformés et des sulfites n'est pas présenté pour l'inhibition du brunissement enzymatique des aubergines. Pour les autres produits testés (pomme et pomme de terre), la répétabilité des mesures a été vérifiée. Cependant, afin de limiter la variance intra-groupe des mesures, les expériences sont réalisées sur une seule journée par lot de fruit ou légume identique et par concentration d'additif.

Les broyats témoins de pomme montrent un fort brunissement se traduisant par une rapide diminution de la luminance lors des premières minutes suivant le broyage. Ensuite, la luminance atteint une valeur stable environ 20 min après le broyage. La perte de luminance observée pour le broyat témoin de pomme est d'environ 20 %. La perte de luminance est inférieure à 10 % pour le broyat témoin de

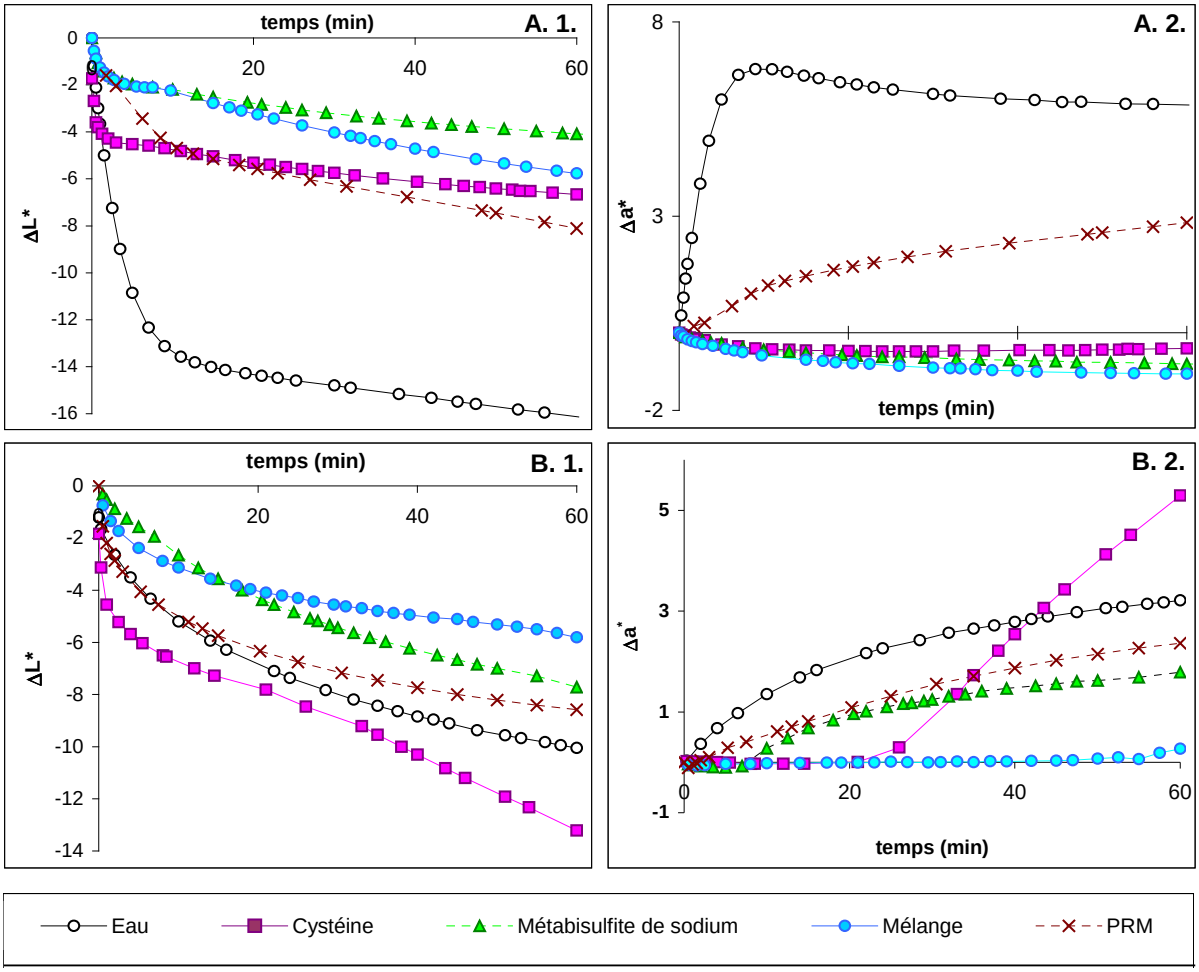
pomme de terre qui est moins sensible au brunissement enzymatique. Cependant la vitesse de brunissement enzymatique est plus faible et la luminance ne se stabilise qu'après 30 min de cinétique.

2.6.1. Comparaison de l'efficacité molaire des différents additifs

Dans un premier temps, les PRM et mélanges sont directement introduits à l'état de solution. Les concentrations molaires employées sont identiques dans les différents broyats. Les concentrations en métabisulfite de sodium sont indiquées en équivalent sulfite, celles des PRM et mélange équimolaire (cystéine chauffée – HMF) sont indiquées en équivalent cystéine avant chauffage. Le HMF a par ailleurs été testé dans les mêmes concentrations que les autres additifs. On observe alors un brunissement comparable au broyat témoin. Les broyats de pomme ou de pomme de terre en présence de HMF ne sont donc pas présentés.

La **figure 71** représente les résultats obtenus pour les broyats de pomme (variété Red Chief) en utilisant des solutions à 2 mM (A) et pour les broyats de pomme de terre (variété charlotte) en utilisant des solutions d' additifs à 1 mM (B).

Les changements de luminance (**figue 71 A.1**.) et de couleur (vert→ rouge ; **figure 71 A.2**.) montrent que tous les additifs (2 mM) ont un effet sur le brunissement enzymatique des broyats de pomme. Cependant, l'effet du PRM semble limité : le broyat pomme – PRM devient plus sombre (ΔL^*_{60min} = - 8) et plus rouge (Δa^*_{60min} = 2) au cours du temps. Concernant les autres additifs, si le métabisulfite semble être le plus efficace pour limiter la diminution la luminance, la couleur des échantillons traités avec de la cystéine ou le mélange reste stable au cours du temps.



Le mélange est constitué de cystéine chauffée (115 °C – 200 min) / HMF ayant réagi pendant 24 h à 4 C°. Le PRM est constitué de glucose (1 M) / cystéine (0,25 M) chauffés à pH 2 pendant 200 min à 115 °C.

<u>Figure 71</u> : Effet de différents additifs sur l'évolution de la luminance (ΔL* - 1) et de l'écart sur l'axe vert→rouge (Δa* - 2) de broyats de pomme de terre (A – additifs à 1 mM) et de pomme (B – additifs à 2 mM)

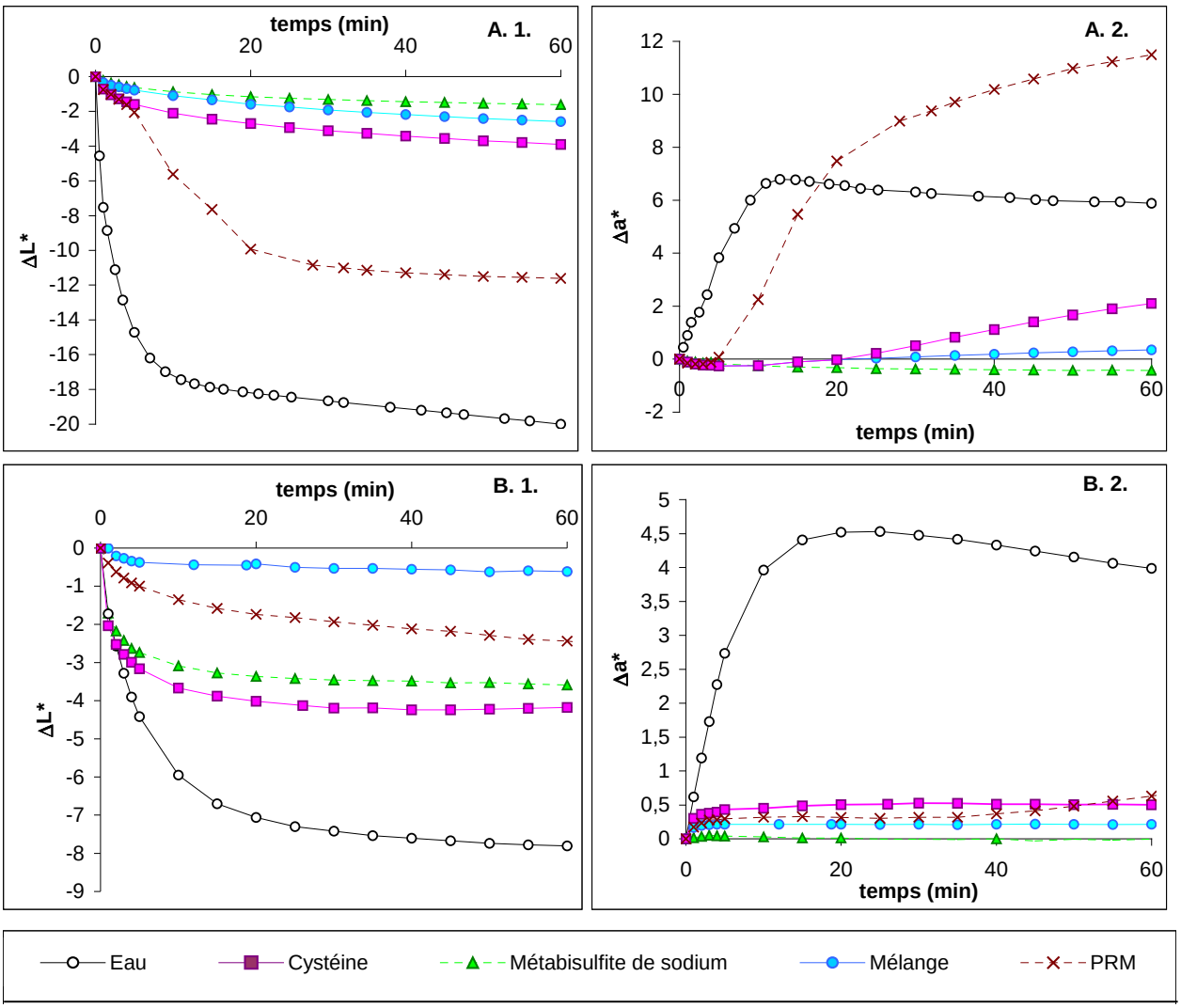
Concernant les broyats de pomme de terre, tous les échantillons subissent une diminution de la luminance (**figure 71 B.1.**) lorsque les additifs sont introduits à la concentration de 1 mM. Cette diminution est la moins marquée pour le broyat traité avec le mélange alors que l'introduction de cystéine aggrave le brunissement et produit un broyat plus foncé (ΔL^*_{60min} = -13,2) que le broyat témoin (ΔL^*_{60min} = - 9). Ce changement de couleur dans l'échantillon traité avec la cystéine s'accélère 25 min après broyage : l'échantillon devient plus rouge (Δa^*_{60min} = 5,3) que le témoin (Δa^*_{60min} = 3,2) après 40 min de mesures à température ambiante. (**figure 71 B.2.**). L'apparition de composés rouges-roses dans les échantillons traités à la cystéine est attribuée par **Richard-Forget *et al.*** (**1992**) à la régénération du phénol. L'utilisation du métabisulfite de sodium entraîne également une diminution de la luminance mais si l'échantillon rougit également, bien que la phase de latence soit plus courte (10 min), l'évolution de la

couleur est moins rapide qu'avec la cystéine et la couleur de l'échantillon tend à se stabiliser. Le PRM, plus efficace que la cystéine pour inhiber le brunissement enzymatique des broyats de pomme de terre, ne parvient cependant pas à atteindre les performances des sulfites pour limiter les changements de couleurs. En revanche, le mélange cystéine chauffée / HMF se montre le plus efficace pour prévenir le brunissement enzymatique des broyats de pomme de terre tant au niveau de la luminance (ΔL^*_{60min} = -5,8) que de la couleur des échantillons (Δa^*_{60min} = 0,3).

Cette première série d'expériences a montré que le mélange cystéine chauffée – HMF, se montre efficace pour inhiber le brunissement enzymatique de broyat de pomme et de pomme de terre en utilisant des procédés proches de ceux rencontrés dans l'industrie agro-alimentaire. Cependant, l'introduction de solutions de molarités identiques, s'adapte peu à une utilisation des produits dans des procédés technologiques de transformations de fruits et de légumes. C'est pourquoi, ces produits ont été lyophilisés avant d'être testés en comparant des concentrations massiques.

2.6.2. Comparaison de l'efficacité massique des différents additifs

Les produits dont la mutagénicité a été testée ont été mis en œuvre après lyophilisation dans des broyats de pomme (1 $g.L^{-1}$) et de pomme de terre (0,5 $g.L^{-1}$). L'ensemble des résultats est présenté **figure 72**.



Le mélange (100 mM) est constitué de cystéine chauffée (115 °C – 200 min) / HMF ayant réagi pendant 24 h à 4 °C°. Le PRM est constitué de glucose (1 M) / cystéine (0,25 M) chauffés à pH 2 pendant 200 min à 115 °C. Ces deux échantillons ont été lyophilisés pendant 48 h

Correspondance des concentrations massiques ($g.L^{-1}$) et molaires (mM ou mM équivalent cystéine avant chauffage) des composés testés :

	cystéine	Métabisulfite de sodium	$Mel_{Cys\Delta\text{-}HMF}$	PRM C
1 $g.L^{-1}$	8,3	5,3	2,7	1,1
0,5 $g.L^{-1}$	4,1	2,6	1,3	0,6

Figures 72 : Effet de différents additifs sur l'évolution de la luminance (ΔL* - 1) et de l'écart sur l'axe vert→rouge (Δa* - 2) de broyats de pomme (A – additifs à 1 $g.L^{-1}$) et de pomme de terre (B – additifs à 0,5 $g.L^{-1}$).

Les broyats de pomme traités avec 1 $g.L^{-1}$ de cystéine, de mélange et de sulfites montrent une luminance stable par rapport au témoin pendant 60 min (**figure 72 A.1.**). En revanche, les PRM se montrent beaucoup moins efficaces pour inhiber le brunissement enzymatique tant au niveau de la

luminance (ΔL^*_{60min} = - 11,6) que du paramètre colorimétrique (Δa^*_{60min} = 11,5). (**figure 72 A.2.).** Par ailleurs, après une phase de latence, le broyat traité à la cystéine tend également à rougir (Δa^*_{60min} = 2,1) mais dans une moindre mesure que le PRM. Le mélange cystéine chauffé / HMF introduit dans le broyat de pomme entraîne une coloration comparable à celle obtenue pour le composé sulfité.

Les broyats de pomme de terre ont des comportements différents vis-à-vis des différents additifs testés. La cystéine, qui stabilise la luminance dans les broyats de pomme, se révèle beaucoup moins efficace dans le cas de la pomme de terre (ΔL^*_{60min} = - 4,2). Il en est de même pour les sulfites (ΔL^*_{60min} = - 3,6). Les concentrations massiques de ces deux composés correspondent à des concentrations molaires plus élevées que celle montrées dans le précédent paragraphe. Leur efficacité est largement améliorée : la cystéine, qui entraîne un changement de coloration notable du broyat de pomme de terre à 1 mM, voit cet effet négatif s'estomper à 4 mM ≈ 0,5 g/L). Pour ces deux composés, une augmentation de leur concentration se traduit par un meilleur contrôle du brunissement enzymatique. Le PRM (ΔL^*_{60min} = - 2,4) et le mélange (ΔL^*_{60min} = - 0,6) se montrent très efficaces pour limiter le brunissement des broyats de pomme de terre.

Les concentrations d'additifs testées correspondent à une concentration (g / 100 g de broyat) dans le produit final de 0,05 % dans les broyats de pomme et 0,025 % dans les broyats de pomme de terre. A ces concentrations, tout en étant efficaces pour limiter le brunissement enzymatique, ces produits n'ont pas montré de propriétés mutagènes. Cependant, afin de pouvoir les utiliser dans des aliments, il faut en demander l'autorisation avec les documents fournissant notamment :

- un dossier technique qui mentionne l'identité de la substance, ses propriétés microbiologiques, le procédé de fabrication, des méthodes de dosage de cette substance dans les matrices alimentaires. Ce dossier doit par ailleurs évoquer les réactions éventuelles avec la matrice alimentaire au cours du procédé de transformation, ainsi que le degré d'exposition des consommateurs vis-à-vis de cette substance.
- un relevé des données toxicologiques comprenant les résultats d'études métaboliques et de toxicité à court et moyen terme (toxicité subchronique, génotoxicité, carcinogénicité…)

Si la demande est acceptée, la Commission demande officiellement à l'EFSA (*European Food Safety Authority*) d'émettre un avis sur la sécurité de la substance pour ses usages prévus. Lorsqu'une demande d'avis a été acceptée par l'EFSA, elle est incluse dans le registre des demandes d'avis où il est possible de suivre son statut, notamment la date de réception et la date prévue de finalisation et d'adoption. La procédure d'autorisation d'un additif à des fins d'application alimentaire est longue et

complexe : la finalisation du projet d'incorporation des PRM ou des mélanges dans les produits alimentaires n'en est qu'à ses prémices mais les résultats présentés ici se montrent plutôt encourageants.

En conclusion sur l'étude du rôle des PRM dans l'inhibition de l'activité PPO, la méthodologie des plans d'expériences a permis l'optimisation des paramètres physico-chimiques de la réaction de Maillard et l'obtention de composés très inhibiteurs. L'analyse des PRM a mené à la simplification de ce système modèle renfermant un grand nombre de composés en un mélange plus simple de composés néoformés à partir de HMF et de cystéine chauffée ou de sulfure d'ammonium. L'étude des caractéristiques de ce mélange a conduit à l'obtention de composés environ 3 fois plus efficaces que le PRM pour inactiver l'activité PPO de différentes origines végétales. Ces composés se sont montrés aussi efficaces que les sulfites pour inhiber le brunissement enzymatique de purées de fruits et de légumes dans des conditions technologiques proches des procédés utilisés dans l'industrie agro-alimentaire. Le mécanisme d'inhibition de ces composés n'a pas pu être mis en évidence. Les propriétés antioxydantes et chélatrices du cuivre ne semblent pas être impliquées dans l'inhibition de l'activité PPO. Par ailleurs, malgré la réussite du fractionnement et l'isolation des composés inhibiteurs issus du mélange, l'identification des structures du ou des composés responsables de l'inhibition n'a pas encore abouti. Les structures les plus vraisemblables pourraient comporter des fonctions thioesters et des groupements aromatiques. Un mécanisme d'inhibition semblable à celui évoqué par **Klabunde *et al.* (1998)** pour l'inhibition de la tyrosinase par la phénylthiourée pourrait expliquer le fort pouvoir inhibiteur de ces composés. Les études portant sur les structures de ces composés ainsi que sur les mécanismes d'inhibition de l'activité PPO devront être approfondies. De même que la toxicité de ces produits néoformés et leur impact sensoriel lors de leur utilisation dans des produits alimentaires devront être examinés.

3. ACTION DES PRM SUR L'OXYDATION ENZYMATIQUE DES LIPIDES

La lipoxygénase (LOX) est une enzyme très étudiée et largement distribuée dans le règne animal et végétal. Elle catalyse l'oxydation des AGPI contenant une unité cis,cis-1,4-pentadiène en acides hydroperoxydièniques conjugués. La LOX a des applications alimentaires dans la fabrication du pain ou la production de composés aromatiques mais a de nombreuses implications négatives sur les apports nutritionnels, la couleur, les arrières goûts de rance, notamment sur les produits d'origine végétale. L'utilisation de PRM pour inhiber cette enzyme est envisagée ici en utilisant la LOX extraite de farine de fève et la LOX commerciale de Soja comme modèles d'étude.

3.1. Optimisation de l'inhibition de l'oxydation enzymatique des lipides

3.1.1. Criblage des facteurs du plan d'expériences

Criblage des acides aminés

D'après l'analyse de la variance du PI vis-à-vis de la LOX extraite de farine de fève des différents PRM testés, la nature de l'acide aminé, la durée de chauffage et l'interaction entre ces deux paramètres ont un effet significatif ($p < 0,05$). Le test des étendues multiples sur la valeur du PI révèle 4 groupes homogènes de PRM en fonction de l'acide aminé (**tableau 32 – A**) et de la durée de chauffage (**tableau 32 –B**).

<u>Tableau 32</u> : Tests des étendues multiples pour le PI vis-à-vis de la LOX de farine de fève (2,5 nkat) par acides aminés (A) et temps de chauffage (B)

A			
Acide aminé	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
GSH	0,03	0,020	X
pro	0,03	0,020	X
gly	0,03	0,020	X
ala	0,05	0,020	X
cys	0,05	0,020	X
his	0,33	0,020	X
arg	0,82	0,024	X
lys	1,19	0,020	X

B			
temps de chauffage (h)	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
0	0,07	0,016	X
1	0,23	0,016	X
5	0,38	0,016	X
10	0,43	0,016	X
14	0,46	0,018	X

Concernant les acides aminés, il apparaît que les PRM issus du mélange glucose – lysine, arginine ou histidine ont des effets statistiquement significatifs sur l'activité LOX de fève. On peut noter que les PRM glucose – lysine ou arginine démontrent par ailleurs un pouvoir anti-radicalaire (**Maillard *et al.*, 2007**). Cependant alors que les PRM issus de cystéine ou de glutathion se montrent également anti-radicalaires et très inhibiteurs de l'activité PPO, ils se révèlent incapables d'inhiber l'activité LOX de fève.

La durée de chauffage à 103 °C des systèmes modèles montre un effet statistique significatif dans les 10 premières heures de traitement thermique. Au-delà, il n'y a pas de différences significatives entre le chauffage pendant 10 et 14 h sur la formation de composés inhibiteurs, pour l'ensemble des acides aminés testés. On peut supposer qu'un optimum de formation de composés inhibiteurs est atteint entre 10 et 14 h de chauffage et qu'un chauffage plus long pourrait éventuellement entraîner une diminution du PI. Ces conclusions doivent cependant être nuancées par l'analyse des résultats représentés **figure 73** : les composés non inhibiteurs, ne voient pas leur PI augmenter avec la durée de chauffage. En revanche, les PRM issus de l'histidine et de l'arginine montrent une augmentation du PI au cours de la durée de chauffage alors que ceux issus de la lysine montrent un PI maximal dès 5 h de chauffage. Ceci suggère des mécanismes et des voies réactionnelles de formation des produits inhibiteurs différents selon l'acide aminé impliqué.

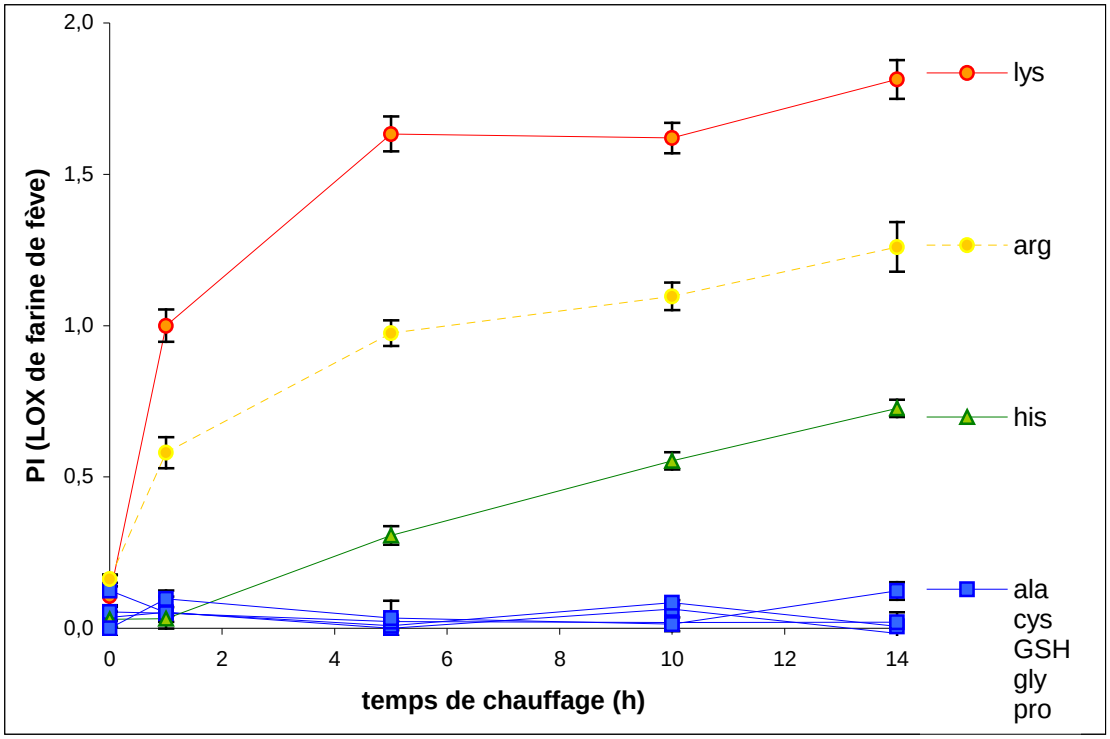


Figure 73 : Evolution du PI de PRM à base de glucose (0,25 M) vis-à-vis de la LOX de fève (2,5 nkat) en fonction de l'acide aminé (0,25 M) et du temps de chauffage à 103 °C

Il est important de noter que des résultats statistiques identiques ont été obtenus lors du traitement statistique de la réponse y = activité résiduelle (%) : la transformation mathématique de l'activité résiduelle en PI n'entraîne pas de changement dans les résultats des tests de comparaisons de moyennes.

Concernant l'inhibition de la LOX commerciale de soja, lors du chauffage à 103 °C pendant 0 à 14 h de systèmes modèles préparés avec du glucose et ces mêmes acides aminés, des résultats en partie comparables sont obtenus (**figure 74**) :

- les PRM préparés avec de la lysine, de l'arginine, dans une moindre mesure de l'histidine, et du glucose sont inhibiteurs de l'activité LOX de soja ;
- le PI des PRM n'est pas ou peu augmenté par une de durée de chauffage (103 °C) supérieure à 5 h ;
- les PI maximaux de ces PRM observés vis-à-vis de la LOX de soja sont du même ordre de grandeur (PI ≈ 2) que ceux observés lors de l'inhibition de la LOX de farine de fève.

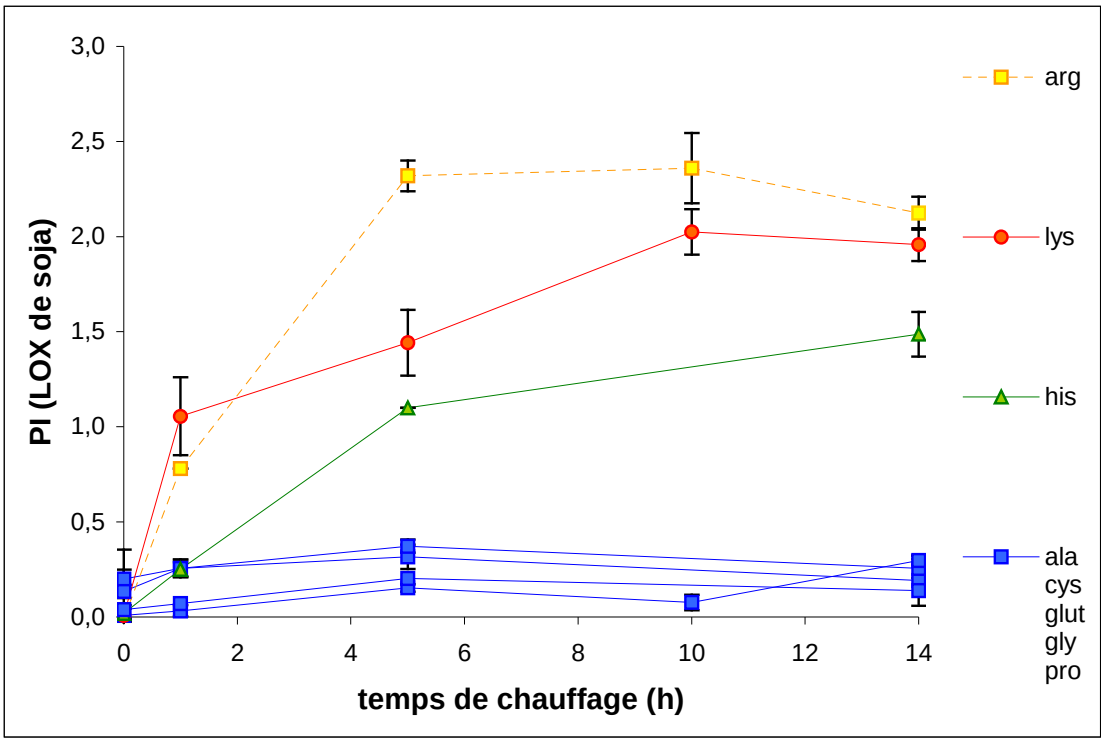


Figure 74 : Evolution du PI de PRM à base de glucose (0,25 M) vis-à-vis de la LOX de soja (2,5 nkat) en fonction de l'acide aminé (0,25 M) et du temps de chauffage à 103 °C

Compte tenu des similitudes observées pour l'inhibition de la LOX de soja et de farine de fève, cette dernière sera utilisée comme modèle pour les déterminations ultérieures des paramètres de la réaction de Maillard permettant la formation d'un maximum de composés inhibiteurs.

Criblage du sucre réducteur

En utilisant les deux acides aminés montrant un fort PI (lysine et arginine), d'autres systèmes modèles équimolaires (0,25 M) chauffés à 103 °C pendant 0, 5 à 14 h, ont été préparés avec du glucose ou du fructose.

L'analyse de la variance montre que si la nature de l'acide aminé et la durée de chauffage ont un effet significatif sur le PI vis-à-vis de la LOX de farine de fève de ces PRM, la nature du sucre réducteur est sans effet (**tableau 33)**. Par ailleurs, les interactions entre les différents facteurs testés ont des effets significatifs. Le glucose étant très souvent utilisé dans les systèmes modèles, il sera plus particulièrement utilisé au cours des expériences ultérieures.

Tableau 33 : Analyse de la variance du PI de PRM glucose ou fructose / arginine ou lysine (10 µL) vis-à-vis de l'activité LOX de fève (2,5 nkat) en fonction du sucre réducteur, de l'acide aminé et du temps de chauffage à 103 °C

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Effets principaux					
A : Sucre	0,000075	1	0,000075	0,002	0,901
B : Temps de chauffage (h)	16,4	2	8,20	1741	0,000
C : acide aminé	3,55	1	3,55	754	0,000
Interactions					
AB	0,393	2	0,196	41,7	0,000
AC	0,567	1	0,567	120	0,000
BC	1,87	2	0,936	199	0,000
ABC	0,201	2	0,101	21,4	0,000
Résidu	0,113	24	0,0047		
Total Corrigé	23,10	35			

Le graphique des interactions (**figure 75**) construit en considérant la moyenne des valeurs de PI obtenues avec les deux acides aminés pour un même sucre réducteur, confirme que l'effet de la durée de chauffage de ces systèmes modèles sur leur PI est faible entre 5 et 14 h.

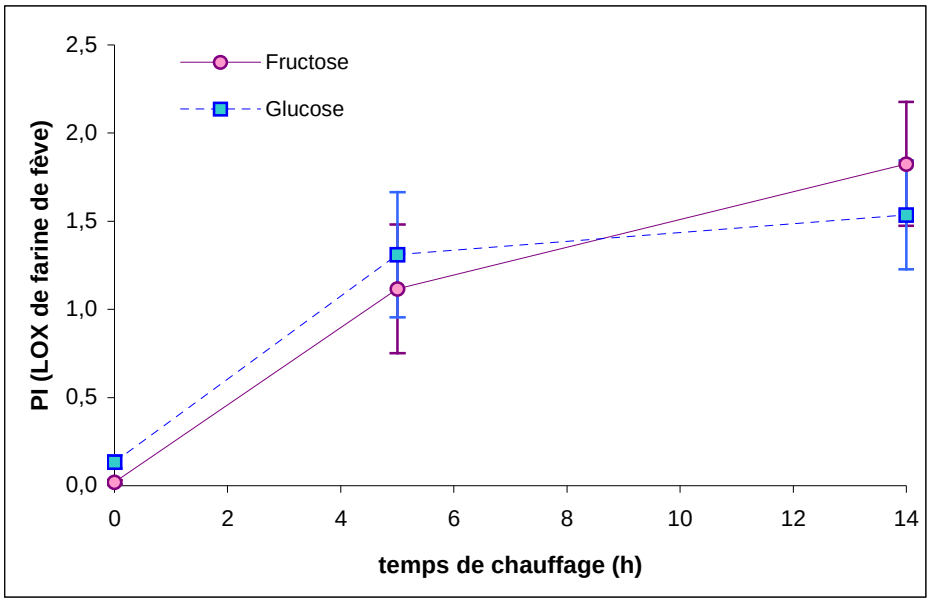


Figure 75 : Graphique des interactions temps de chauffage x nature du sucre réducteur sur le PI vis-à-vis de la LOX de farine de fève lors du chauffage de systèmes modèles à base de lysine et d'arginine à 103 °C

Concentration et ratio des réactifs

Afin d'appréhender les concentrations de réactifs à mettre en œuvre, le PI vis-à-vis de la LOX de fève de systèmes modèles chauffés 14 h à 103 °C dont la concentration en lysine est fixée (0,25 M) et la concentration en glucose variable (0 ; 0,25 ; 0,5 et 0,75 M) a été mesuré. Il a également été ajouté un mélange glucose / lysine (0,25 / 0,5 M).

D'après la **figure 76**, montrant le PI de ces différents PRM, un excès de sucre réducteur entraîne une diminution significative ($p < 0,05$) du PI. Au contraire un excès de lysine favorise la formation de composés inhibiteurs de l'activité LOX de fève lors de la réaction de Maillard.

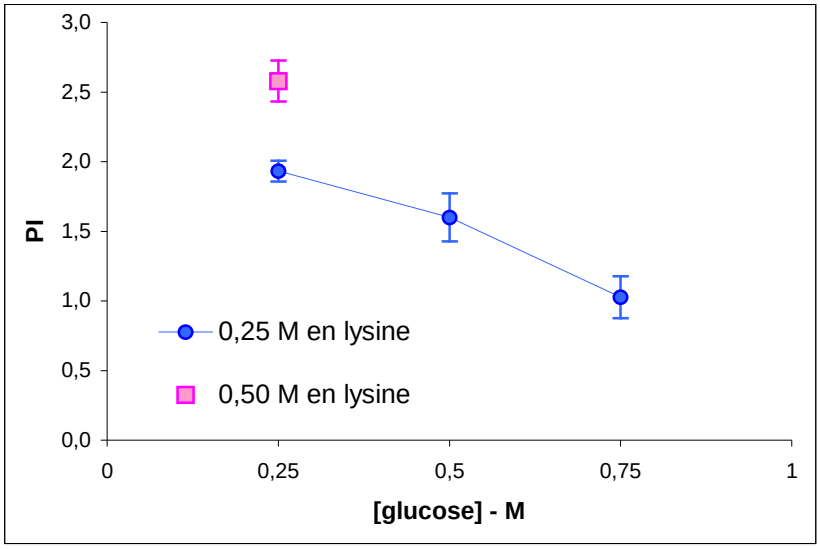


Figure 76 : Effet de la concentration en glucose sur le PI de PRM (103 °C - 14 h) à base de lysine

3.1.2. Effets du pH initial, de la concentration en réactifs (glucose et lysine) et de la durée de chauffage à 103 °C sur l'apparition de produits colorés, le pH final des PRM et l'activité LOX résiduelle

Au cours d'un premier plan d'expériences, les systèmes modèles étudiés sont chauffés à 103 °C entre 0,5 et 18,5 h et sont constitués de glucose et de lysine dont la concentration varie de 0,2 à 1 M. L'ensemble des résultats obtenus est présenté en **Annexe 2.**

Coloration des PRM au cours du chauffage en fonction des paramètres physico-chimiques des systèmes modèles

La coloration des PRM a été suivie par la mesure de l'absorbance à 350, 420 et 450 nm correspondant aux longueurs d'onde d'absorbance maximale généralement attribuées aux produits intermédiaires (350 nm) et finaux (420 et 450 nm) de la réaction de Maillard. Les **figures 77 (A, B, C)** représentent, sous la forme de diagrammes de Pareto, l'analyse de la variance de ces 3 longueurs d'ondes en fonction des paramètres expérimentaux.

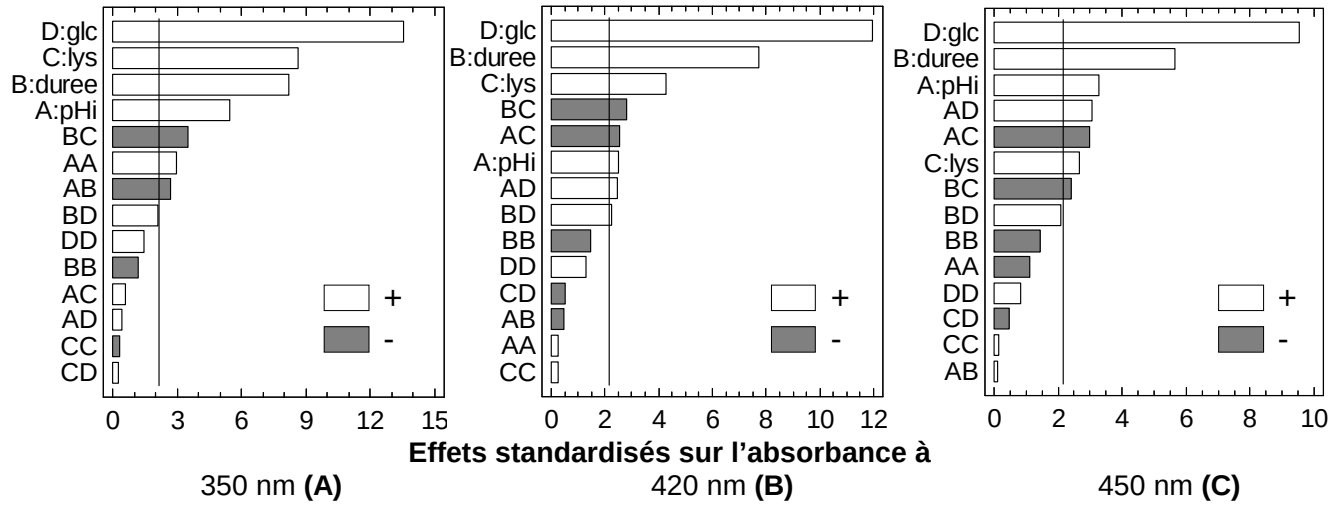


Figure 77 : Graphiques de Pareto standardisés représentant les effets des variables du plan d'expériences sur l'absorbance à 350 (A), 420 (B) et 450 nm (C)

Ces diagrammes montrent que la concentration initiale en glucose tout comme la durée de chauffage ont un effet positif significatif prépondérant sur la coloration des PRM quelle que soit la longueur d'onde mesurée. La concentration en lysine a un effet positif significatif sur l'absorbance des PRM, cependant, cet effet, tout en restant significatif, est moins élevé lorsque la longueur d'onde de mesure d'absorbance augmente. Ceci signifierait que si la concentration en lysine a un effet important sur la formation des composés intermédiaires, son effet est moindre sur la formation des composés finaux de la réaction de Maillard.

Le pH a un effet positif significatif sur la coloration des PRM. Les valeurs de l'effet standardisé du pH sont plus importantes sur l'absorbance à 350 et 450 nm : 6 et 3,5 respectivement. Cette observation corrobore celles d'**Ajandouz et Puigserver** (**1999**) indiquant que la réaction de Maillard, dont le développement est souvent déterminé par la coloration des systèmes modèles, est favorisée par des

milieux alcalins, avec un optimum à pH 10. D'un point de vue chimique, les pH élevés favorisent la formation des pyrazines au cours du chauffage (**Bernis-Young *et al.*, 1993**).

Variation du pH au cours de la réaction de Maillard entre glucose et lysine à 103 °C (LOX de farine de fève)

Quelles que soient les concentrations initiales des deux réactifs et la durée du chauffage, le pH diminue systématiquement au cours de la réaction de Maillard confirmant ainsi les observations de **Renn et Sathe** (**1997**). Par ailleurs, l'analyse de la variance du pH final montre que seul le pH initial a un effet positif significatif ($p < 0,05$) sur le pH final (**figure 78**).

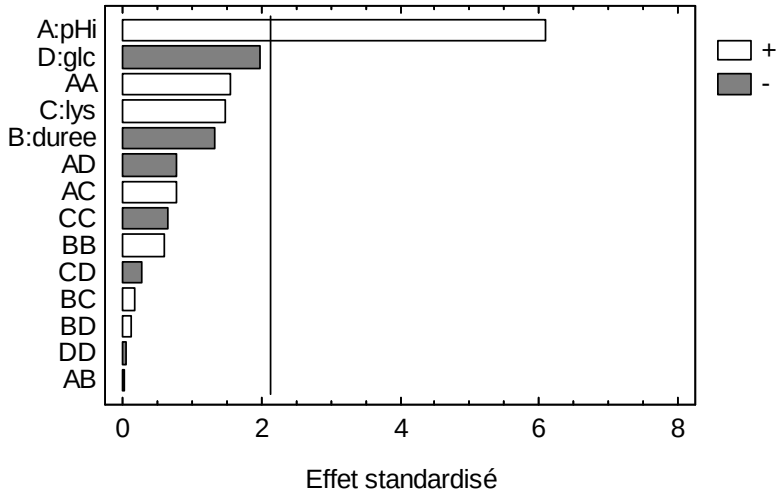
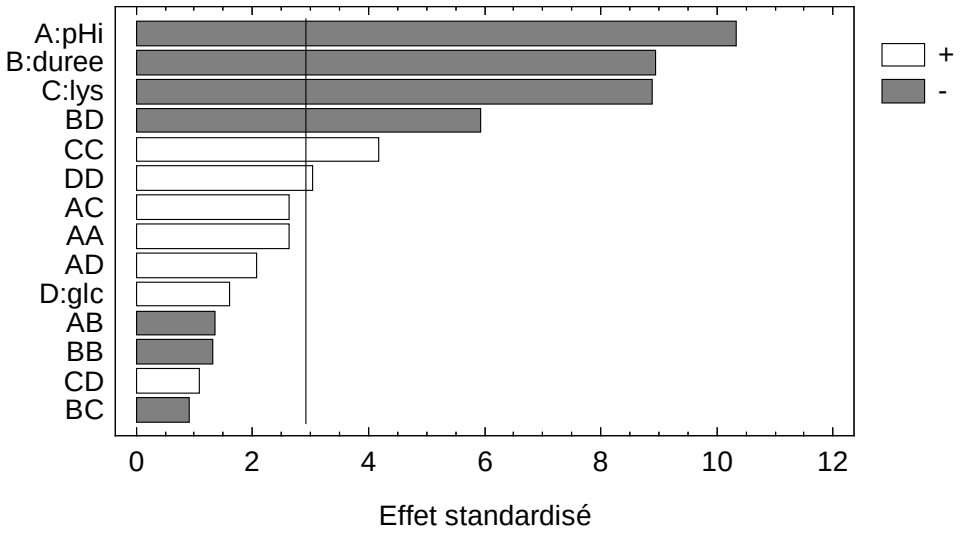


Figure 78 : Graphiques de Pareto standardisés représentant les effets standardisés des variables du plan d'expériences sur le pH final des PRM

Optimisation des conditions de la réaction de Maillard afin d'obtenir le système modèle le plus inhibiteur

L'analyse de la variance de l'activité résiduelle de LOX de fève en présence de 2 µL de PRM en cuve, représenté **figure 79** par le diagramme standardisé de Pareto montre que les effets linéaires du pH initial, de la durée de chauffage et de la concentration en lysine sont significatifs et négatifs. L'effet de l'interaction entre la durée de chauffage et la concentration en glucose, est également significatif et négatif. Les effets quadratiques positifs des concentrations en lysine et en glucose sont aussi significatifs.



<u>Figure 79</u> : Graphique de Pareto standardisé pour l'activité résiduelle de LOX de fève (%) en fonction du pHi, de la durée de chauffage (h) et de la concentration (M) en lysine et en glucose

Le modèle du second degré s'ajuste bien avec la réalité : R^2 = 97 % des variations de l'activité résiduelle sont expliquées par le modèle. Ce modèle permettant de décrire la valeur de l'activité résiduelle en fonction des différentes variables expérimentales est donné dans l'**équation 12** :

Ar (%) = 210,5

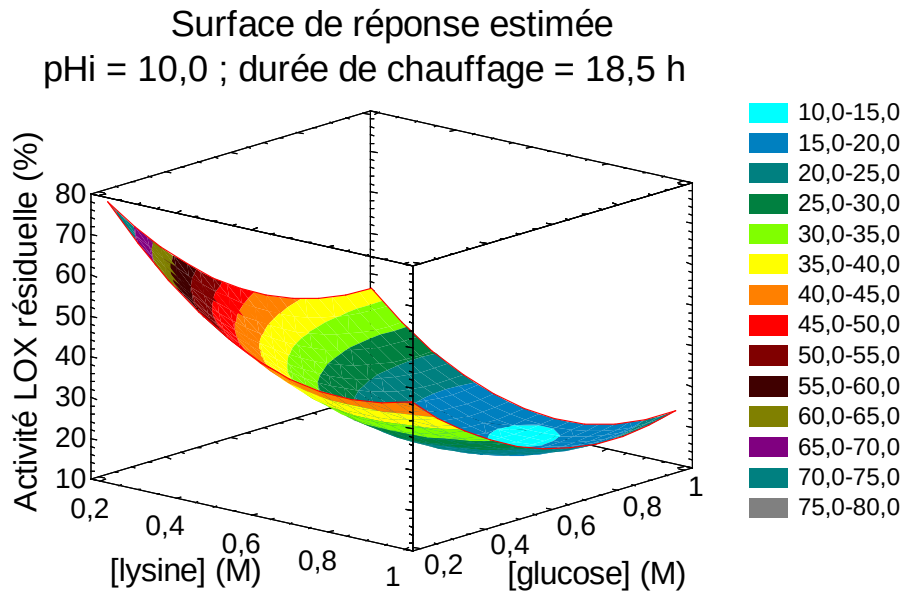
- 18,6.pH_i + 5,0.t - 206,9.[lysine] - 62,0.[glucose]

+ 0,55.pH_i^2 - 0,05.t^2 **+ 90,7.[lysine]² + 65,4.[glucose]²**

- 0,15.pH_i.t + 7,16.pH_i.[lysine] + 5,54.pH_i.[glucose] - 1,06.t.[lysine] **- 6,92.t.[glucose]** + 29,6.[lysine].[glucose]

L'activité résiduelle minimale est déduite de l'équation du modèle de régression. Ainsi, dans le domaine expérimental étudié et pour un chauffage à 103 °C, le PRM le plus inhibiteur (PRM_{opt1}) est obtenu lors du chauffage pendant 18,5 h d'un mélange glucose / lysine (0,70 / 0,85 M) dont le pH est ajusté à 10,35. La valeur d'activité résiduelle prévue par le modèle est de 14,4 %. Ce PRM confirme la tendance observée dans les expériences préliminaires : un excès de glucose n'est pas favorable à la formation des composés inhibiteurs.

Bien que les paramètres fixés soient en limite du domaine expérimental, l'activité résiduelle prédite par le modèle représenté graphiquement en **figure 80**, est vérifiée puisque la réalisation du PRM_{opt1} conduit à une activité résiduelle de 14,1 ± 1,4 %.



<u>Figure 80</u> : Représentation graphique en surface de réponse de l'activité résiduelle de LOX de farine de fève (%) estimée d'après le modèle en fonction de la concentration en lysine et en glucose (M) lorsque le pH est fixé à 10,0 et la durée de chauffage à 18,5 h

A des fins pratiques, le PRM_{opt1} a été simplifié dans les expériences ultérieures : sans ajustement du pH, la solution de glucose – lysine (0,8 / 0,8 M) a un pH proche du pH optimum (pH ≈ 10). Pour ces paramètres expérimentaux, l'activité résiduelle prévue par le modèle est de 15,4 %. La réalisation de ce PRM montre une activité résiduelle expérimentale de 15,2 ± 1,1 %. Tout en étant un moins bon inhibiteur que le PRM_{opt1}, ce PRM, rapide à préparer, inhibe efficacement l'activité LOX de farine de fève.

L'ajout en cuve d'un volume 10 fois supérieur (20 µL au lieu de 2) de PRM dilué (au 10ème) avant ou après chauffage a été envisagé. Il a été vérifié qu'une activité résiduelle comparable était alors mesurée (**tableau 34**). Ainsi, l'utilisation de systèmes dilués en quantité plus importante sera généralisée par la suite.

<u>Tableau 34</u> : Comparaison de l'efficacité de PRM dilués sur l'activité LOX de fève

volume en cuve (µL)	système modèle pH 10 - 103 ℃ 18,5 h	Ar (%)	σ
2	glucose / lysine (0,8 M)	15,2	1,1
20	glucose / lysine (0,8 M) dilué au 10ème	15,1	1,2
20	glucose / lysine (0,08 M)	17,8	1,4

La durée du traitement thermique est souvent en interaction avec la température appliquée. C'est pourquoi le traitement thermique des PRM issus de systèmes modèles glucose – lysine (0,08 M – pH non ajusté) a été optimisé afin de déterminer le couple temps / température entraînant la formation d'un maximum de composés inhibiteurs.

3.1.3. Etude des effets du traitement thermique

L'optimisation du traitement thermique est réalisée pour des durées de chauffage variant de 5 à 24 h et des températures comprises entre 90 et 120 °C. Les résultats obtenus sont donnés en **annexe 3**.

Variations du pH et des absorbances en fonction du traitement thermique

L'analyse de la variance du pH final en fonction du traitement thermique montre que les effets linéaires négatifs et quadratiques positifs de la température et de la durée de chauffage sont significatifs ($p < 0,05$). Ainsi, dans le domaine expérimental étudié, la plus forte diminution du pH est observée pour des temps de chauffage longs et une température élevée.

Concernant les effets des paramètres du chauffage sur les absorbances (**tableau 35**), la température a systématiquement un effet significatif positif prépondérant sur la valeur d'absorbance des PRM. L'interaction durée * température de chauffage a un effet négatif et significatif sur la valeur d'absorbance. De ce fait, quelle que soit la longueur d'onde de mesure, l'absorbance maximale est obtenue à 120 °C (température maximale du domaine expérimental). En revanche, la durée de chauffage permettant d'obtenir une absorbance maximale augmente avec la longueur d'onde de mesure.

Tableau 35 : Effets estimés des variables sur les valeurs d'absorbance (294, 320, 350 et 420 nm) – Couple temps*température entraînant une absorbance maximale à ces longueurs d'onde

Effet	Effets estimés pour l'absorbance à							
	294 nm		320 nm		350 nm		420 nm	
	Estimation	Erreur-type	Estimation	Erreur-type	Estimation	Erreur-type	Estimation	Erreur-type
moyenne	144	4	128	2	87,7	1,5	23,4	0,3
A:durée (h)	10,9	7,9	**13,6**	**3,5**	**13,5**	**2,6**	**4,33**	**0,49**
B:température (°C)	**27,4**	**7,8**	**24,4**	**3,5**	**25,1**	**2,6**	**11,1**	**0,5**
AA	**-21,7**	**9,0**	**-10,3**	**4,0**	**-8,1**	**3,0**	**-3,05**	**0,55**
AB	**-33,1**	**11,2**	**-19,2**	**5,0**	**-15,9**	**3,7**	0,12	0,69
BB	-3,12	8,58	-0,67	3,85	-1,60	2,83	**1,54**	**0,53**

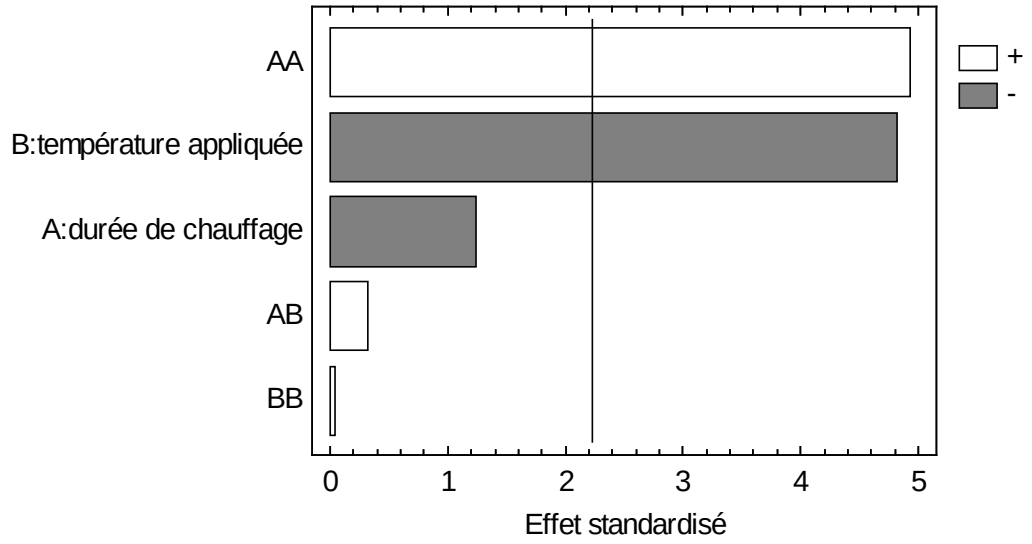
durée optimale	9 h	10 h 15 min	11 h	19 h 40 min
température optimale	120 °C	120 °C	120 °C	120 °C

Les valeurs en gras indiquent les effets significatifs ($p < 0,05$) sur les mesures d'absorbance

Optimisation du chauffage afin d'obtenir des PRM très inhibiteurs de l'activité LOX de fève

D'après l'analyse de la variance représentée par le diagramme de Pareto en **figure 81**, l'effet linéaire négatif de la température et l'effet quadratique positif de la durée de chauffage sont significatifs sur l'activité résiduelle de LOX de fève. Le modèle de régression linéaire s'ajuste à 84 % aux mesures expérimentales d'activités résiduelles de LOX de fève. La modélisation de l'activité résiduelle en fonction de la température (T en°C) et de la durée de chauffage (t en h) pour un mélange glucose – lysine (0,08 M – pH 10,0) est donnée par l'**équation 13** suivante :

$$Ar\ (\%) = 195,0 - 8,0\ t \mathbf{- 1,1\ T} + \mathbf{0,22\ t^2} + 0,0006\ T^2 + 0,011\ t.T \qquad (\mathbf{13})$$



<u>Figure 81</u> : Graphique de Pareto standardisé pour l'activité résiduelle de LOX de fève (%) en fonction de la température et de la durée de chauffage (h)

La valeur optimale calculée d'après le modèle est de 18,8 % d'activité LOX de fève résiduelle pour 20 µL de PRM glucose-lysine (0,08 M, pH non ajusté) chauffé à 120 °C pendant 15 h. La valeur réelle mesurée pour un système modèle identique est de 18,3 % ± 1,1 %. La modélisation est par ailleurs validée par la réalisation de trois autres points expérimentaux (**tableau 36**) dont la valeur de l'activité résiduelle ± l'écart-type est comprise dans l'intervalle de confiance (5 %) des valeurs calculées.

<u>Tableau 36</u> : Validation du modèle par comparaison des valeurs d'activités résiduelles de LOX de fève calculées et réelles

durée de chauffage (h)	température (°C)	Valeurs calculées			Valeurs mesurées		
		borne inférieure	**Ar (%)**	borne supérieure	borne inférieure	**Ar (%)**	borne supérieure
18	105	31,3	**32,9**	34,6	32,2	**35,0**	37,8
11	94	42,9	**45,2**	47,4	44,8	**48,4**	52,0
11	105	33,6	**35,3**	37,1	27,5	**30,2**	32,9

Ainsi, un mélange équimolaire (0,08 M) de glucose – lysine à pH non ajusté et chauffé à 120 °C pendant 15 h (PRM_{opt2}) est très inhibiteur de l'activité LOX de fève.

Il peut paraître aberrant que la seconde série d'expériences, permettant l'optimisation du traitement thermique, détermine un PRM_{opt2} (PI = 4,4) apparemment moins inhibiteur que le PRM_{opt1} (PI = 4,6). Par

ailleurs, un des points du second plan (105 °C, 18 h), très proche de PRM_{opt1}, montre 35 % d'activité LOX de fève résiduelle là où le PRM_{opt1} montre 17,8 % lors de la première série d'expériences. Ces deux séries d'expériences sont totalement indépendantes et ont été réalisées avec deux extraits enzymatiques différents de LOX de farine de fève. Pour s'assurer du gain de PI réalisé par l'optimisation du traitement thermique, l'activité résiduelle en présence des deux PRM optimum (PRM_{opt1} et PRM_{opt2}) a été mesurée sur un même extrait de LOX de farine de fève purifié (**tableau 37**).

Tableau 37 : Comparaison de l'activité résiduelle de LOX de farine de fève purifiée en présence du PRM_{opt1} et du PRM_{opt2}

	Ar (%)	SD	PI
PRM_{opt1}	30,9	1,6	2,2
PRM_{opt2}	18,2	1,1	4,5

Ainsi le **tableau 37** montre bien une amélioration du pouvoir inhibiteur des PRM_{opt2} par rapport aux PRM_{opt1} puisque l'activité résiduelle est de 18,2 % pour les premiers et de 30,9 % pour les seconds sur la LOX de fève purifiée. Le fait que la LOX de fève purifiée semble moins sensible à l'inhibition que la forme non purifiée (C_{50}) reste à expliquer (composition en isoformes de LOX différentes, présence dans l'extrait non purifiée de composés agissant en synergie avec les PRM pour inhiber la LOX etc.)

Bien que la température optimale de formation des composés inhibiteurs corresponde à celle entraînant une coloration maximale des PRM, il n'a pas été observé de corrélation entre l'absorbance aux différentes longueurs d'onde et l'activité résiduelle. Il a été montré que le pouvoir anti-radicalaire de PRM issus de systèmes modèles, et notamment glucose-lysine, n'était pas lié au brunissement (absorbance à 420 nm, mesures CIELab) mais plutôt à des composés fluorescents (**Morales et Jimenez-Perez, 2001**).

3.1.4. Vérification de l'effet de la nature du sucre réducteur sur le PI du PRMopt2

Après l'optimisation des différents paramètres physico-chimiques de la réaction de Maillard pour former un maximum de composés inhibiteurs de l'activité LOX, les résultats des expériences de criblage indiquant que la nature de l'ose réducteur n'avait pas d'effet sur le PI des PRM ont été vérifiés sur le PRM_{opt2}. Ainsi, la **figure 82** présentant le PI de systèmes modèles (0,08 M) ose-lysine chauffés 115 °C

pendant 15 h indique que la nature du sucre réducteur n'a pas d'effet significatif ($p < 0,05$; tests des étendues multiples) sur le PI.

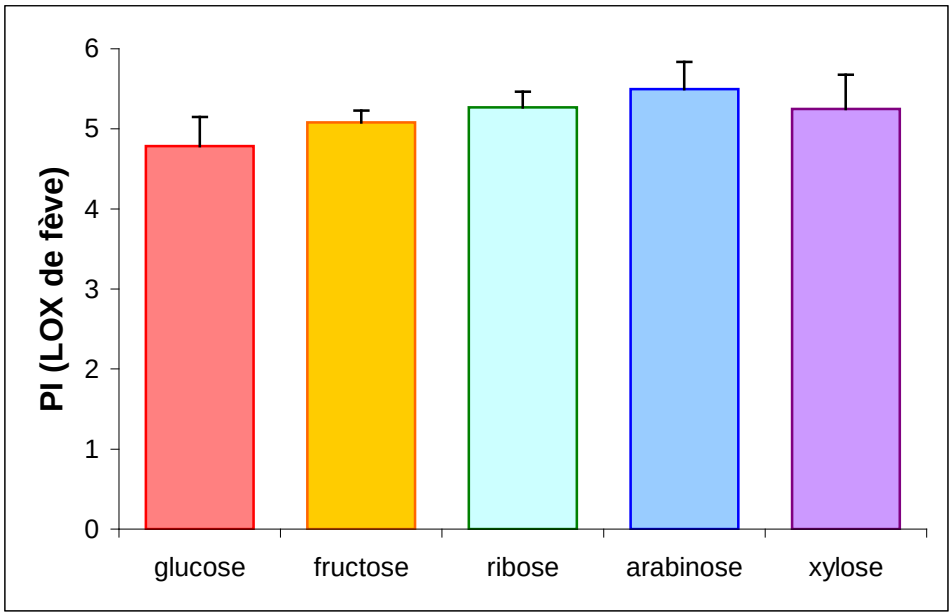


Figure 82 : Absence d'effet significatif ($p < 0,05$) de la nature du sucre réducteur sur le PI des PRM_{opt2} (20 µL) vis-à-vis de la LOX de farine de fève (2,8 nkat)

3.2. Effet direct et cinétique d'inhibition de l'activité LOX de farine de fève par les PRM_{opt2}

Avant d'étudier les propriétés inhibitrices de l'activité LOX, il a été vérifié que l'ajout de PRM_{opt2} dans la cuve ne modifiait pas la mesure de consommation d'oxygène. En effet, les PRM étant généralement des composés réducteurs, ils sont capables de consommer l'oxygène pouvant se traduire au niveau de la mesure par

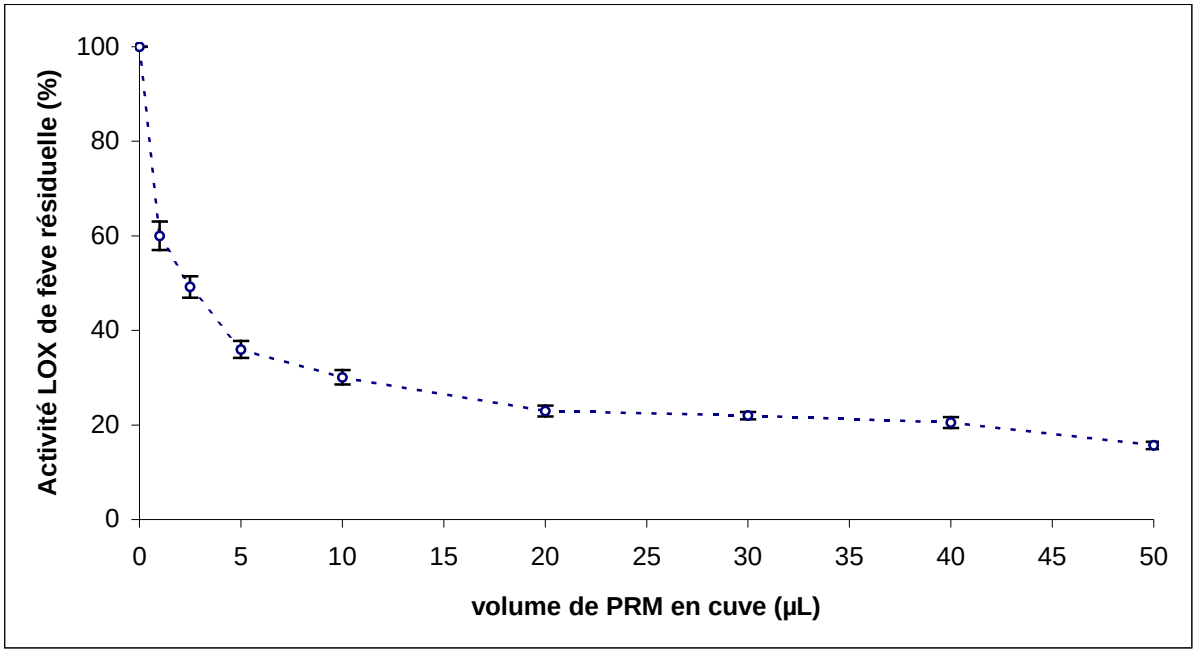
- Une diminution de la quantité d'oxygène dissous nécessaire à l'oxydation de l'acide linoléique catalysé par la LOX, entraînant ainsi une sous-estimation de la vitesse de réaction,
- Une surestimation de la vitesse de consommation d'oxygène causée par la consommation directe de l'oxygène par le PRM.

Le volume maximum de PRM incorporé en cuve (50 µL) entraîne une consommation rapide mais succincte (moins de 10 s) de 15 % de l'oxygène total en cuve. La consommation d'oxygène entraînée

par l'addition de 20 µL de PRM_{opt2} entraîne une diminution de 8 % seulement de l'oxygène et n'interfère donc pas avec la mesure de l'activité LOX en présence de PRM. En pratique, après ajout du PRM et stabilisation de la teneur en oxygène, le volume d'enzyme nécessaire à la mesure est introduit en cuve. Ainsi, il n'y a pas addition des deux vitesses de consommation d'oxygène et aucun risque d'interférence n'est possible entre les deux réactions de consommation d'oxygène.

3.2.1. Effet de l'ajout d'un volume croissant de PRM en cuve

Une première série d'expériences vise à étudier l'effet de l'ajout de volumes croissants de PRM sur l'activité LOX de fève (**figure 83**). L'ajout de 20 µL de PRM_{opt2} entraîne une perte d'environ 80 % d'activité LOX. Ce taux d'inhibition est maximal : l'ajout de volumes de PRM_{opt2} supérieurs n'entraîne pas une diminution de l'activité résiduelle puisqu'il subsiste ~ 20 % d'activité résiduelle mêmes aux fortes concentrations en PRMs (50 µL). L'absence d'inhibition totale de l'activité enzymatique malgré une forte concentration en PRM inhibiteur a déjà été constatée lors de l'étude de l'inhibition de la PPO de pomme par des systèmes modèles à base de cystéine (**Roux *et al.*, 2003**).



L'activité LOX est mesurée en présence de 20 µL d'extrait enzymatique purifié correspondant à 2,6 nkat d'activité témoin totale en cuve

Figure 83 : Activité résiduelle de la LOX de fève (%) en fonction de différents volumes de PRM_{opt2} incorporé dans le milieu réactionnel

Il a par ailleurs été vérifié que les réactants seuls (glucose d'une part, lysine d'autre part) non chauffés ou chauffés à 120 °C pendant 15 h, ou encore chauffés séparément puis re-mélangés après refroidissement des solutions, sont sans effet sur l'activité LOX de fève.

3.2.2. Cinétique d'inhibition de l'activité LOX de fève par les PRM_{opt2}

La série d'expériences précédentes a permis de retenir trois niveaux de concentrations de PRM_{opt2} (2 µL, 2,5µL, et 5 µL en cuve) pour étudier le mode d'inhibition de la LOX de fève, en faisant varier la concentration en acide linoléique (1 – 15 mM – pH 6,5). Les résultats présentés en double inverse (**figure 84**) montrent que l'inhibition de la LOX de fève par le PRM_{opt2} est de type non compétitif vis-à-vis de l'acide linoléique, si les hypothèses de réversibilité dans la formation des complexes enzyme-inhibiteur et enzyme-substrat-inhibiteur, sont vérifiées. Ainsi, le pourcentage d'inhibition de la LOX par les PRM est indépendant de la concentration en substrat. Ce mode d'inhibition a déjà été observé pour l'inhibition de la polyphénoloxydase d'aubergine par des PRM issus de solutions aqueuses glucose / cystéine (**Cheriot *et al.*, 2006**).

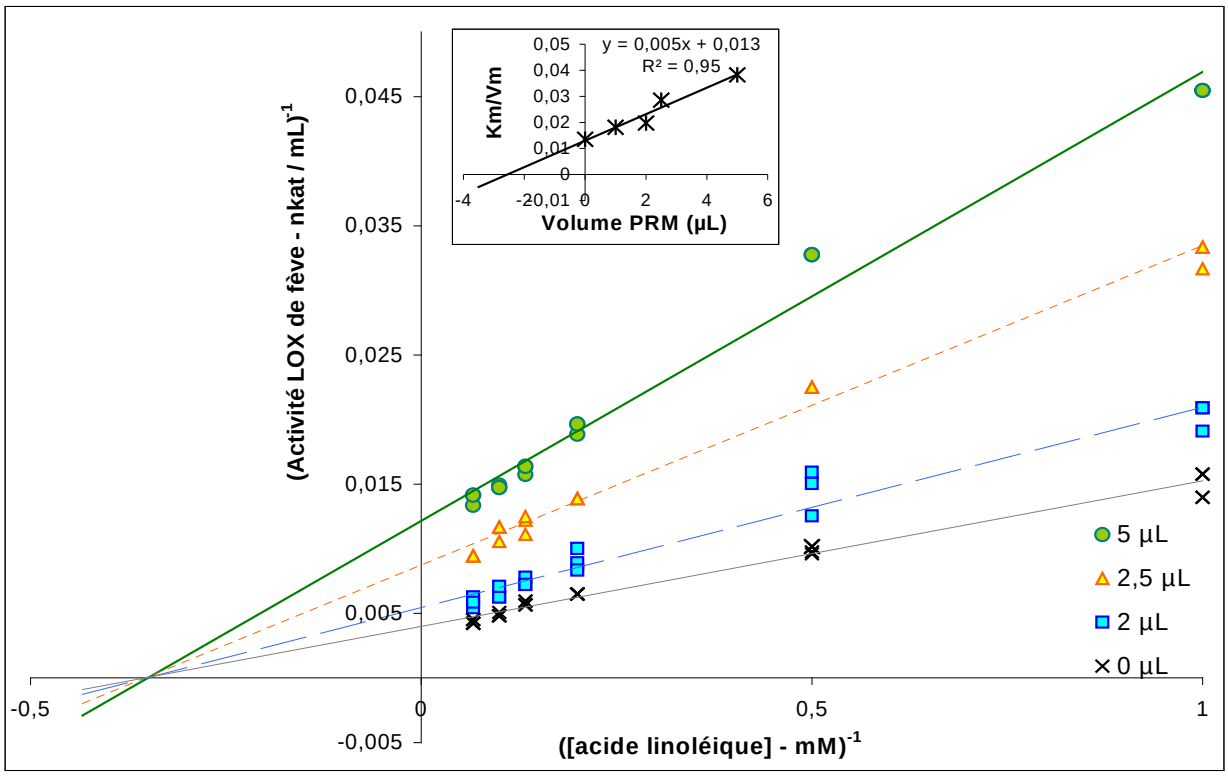


Figure 84 : Cinétique d'inhibition de la LOX de fève par le PRM_{opt2}

La constante d'inhibition apparente (K_{iapp}) calculée d'après le graphe secondaire (encart de la **figure 83**) est proche de 2,3 µL de PRM_{opt2} en cuve soit 0,12 mM en concentration initiale des réactants dans le système modèle avant chauffage. Cette constante d'inhibition est très faible si on considère les travaux de **Richard-Forget *et al.*** (**1995**) indiquant que l'acide phénolique le plus inhibiteur, l'acide protocatéchique, a un K_{iapp} = 0,6 mM.

3.3. Mode d'inhibition de l'activité LOX par les PRM_{opt2}

3.3.1. Effet de l'incubation de l'extrait enzymatique avec les PRM à différentes concentrations

De la même façon que pour l'étude de l'inhibition de la PPO par les PRM et les produits néoformés, pour vérifier une inactivation possible de la LOX de fève par les PRM, cette enzyme a été incubée pendant 3 h à 0 °C avec le PRM_{opt2} dans différentes proportions volumiques (0 - 20 % de PRM_{opt2} dans l'extrait enzymatique). Cette température de 0 °C a été choisie pour mieux maîtriser la température d'incubation tout en conservant l'activité enzymatique des incubats.

L'activité LOX résiduelle dans ces incubats (20 µL) a été mesurée au cours des trois heures d'incubation et comparée avec celle d'un incubat témoin avec de l'eau dans les mêmes conditions (**figure 85**). Quelle que soit la teneur en PRM présente dans l'incubat, l'activité LOX au cours du temps d'incubation diminue progressivement (1ère phase) et atteint un minimum après environ 30 min d'incubation où elle se stabilise (seconde phase). L'activité LOX de fève résiduelle mesurée en fin d'incubation est de 0 et 30 % pour l'incubat à 20 et 5 % de PRM_{opt2} respectivement par rapport à l'activité LOX incubée.

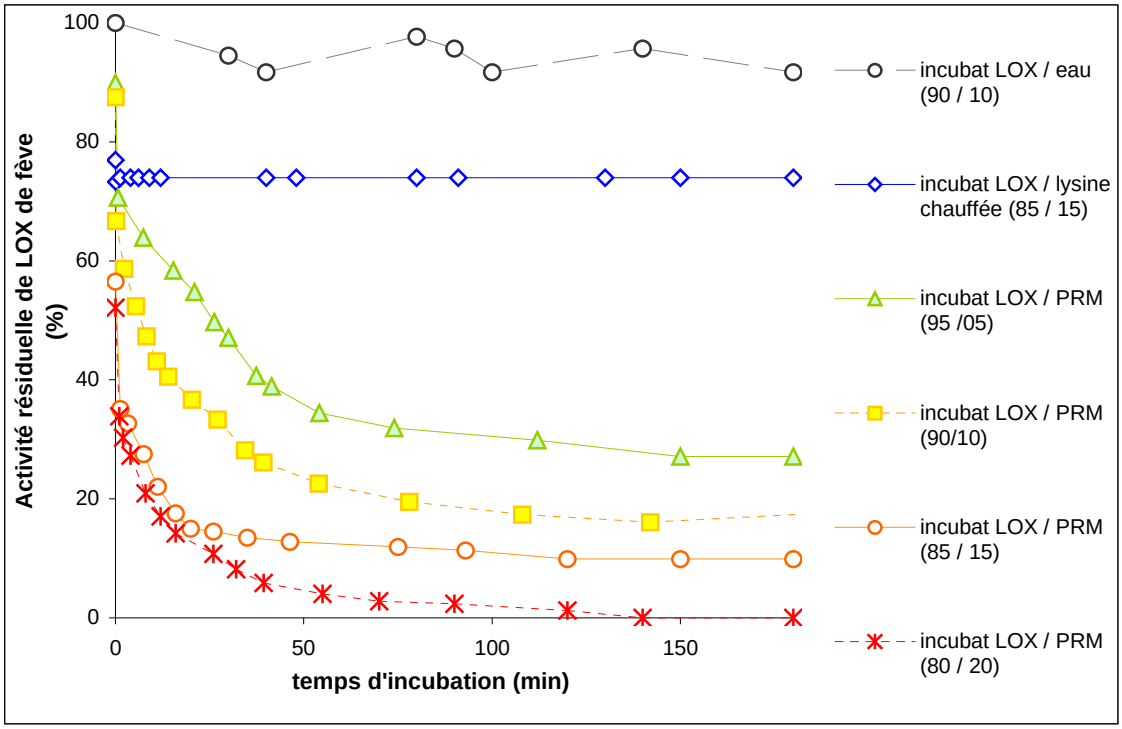


Figure 85 : Effet du temps d'incubation à 0 °C de la LOX de fève avec le PRM_{opt2}, et de la lysine (0,08 M) chauffée seule (15 h à 120 °C) sur l'activité résiduelle de LOX de fève

L'activité LOX de fève est stable au cours du temps d'incubation dans 10 % d'eau et la perte d'activité LOX de fève dans le témoin est comparable au facteur de dilution. On observe une faible inhibition (74 % d'activité résiduelle) lorsque l'enzyme est incubée avec 15 % d'une solution de lysine (0,08 M) chauffée pendant 15 h à 120 °C.

Les constantes de vitesse initiale d'inactivation (k) ont été déterminées d'après le graphique représentant le logarithme de l'activité LOX résiduelle en fonction du temps d'incubation au cours de la première phase des cinétiques d'incubation. La **figure 86** représente la valeur des constantes (k) en fonction du facteur de dilution des PRM dans les incubats. Ces constantes (k) des vitesses initiales d'inactivation ont ensuite été reportées, en fonction du ratio volumique PRM / LOX (encart de la **figure 86**). L'alignement des points indique la proportionnalité entre la vitesse d'inactivation et la concentration en composés inhibiteurs des PRM et donc, dans la phase initiale du phénomène, une réaction d'inactivation du premier ordre.

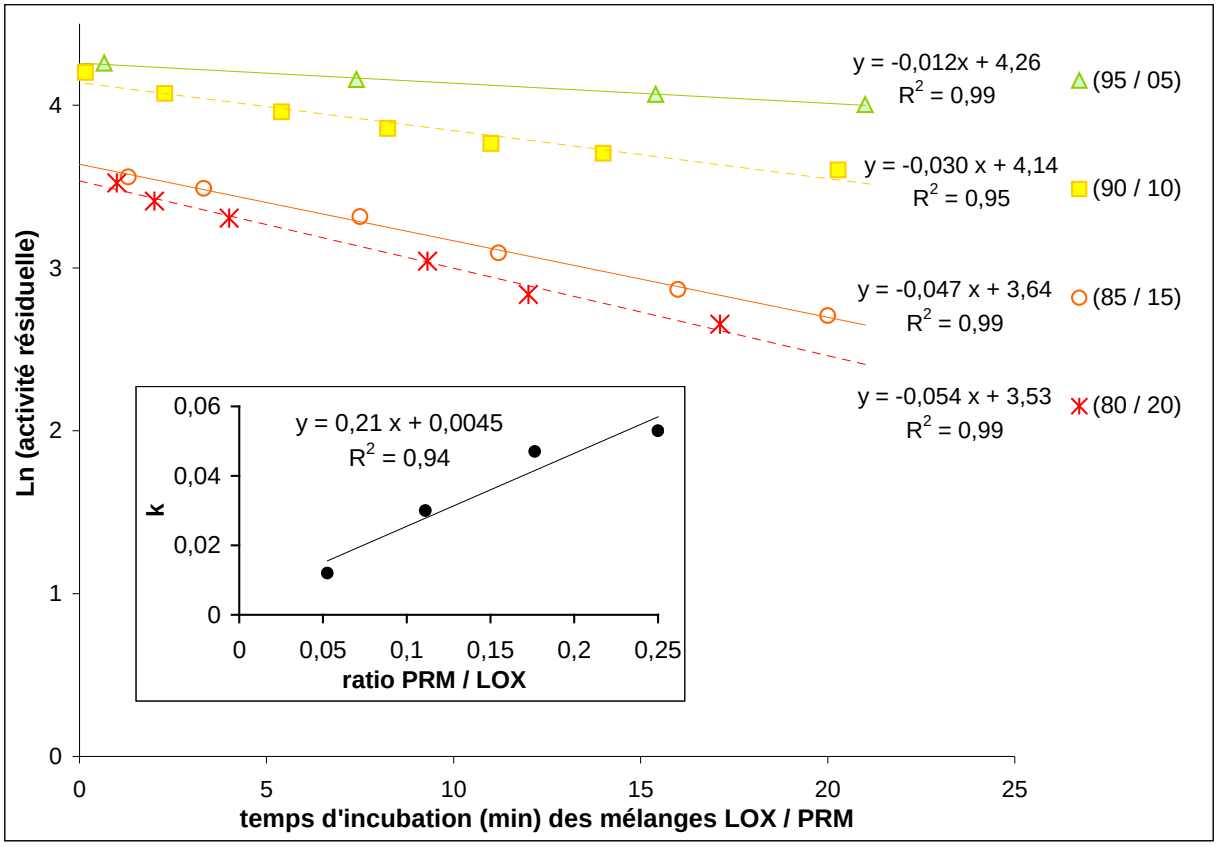


Figure 86 : Détermination des constantes d'inactivation de l'activité de LOX de fève par le PRM_{opt2} - Effet de la concentration du PRM_{opt2}.

3.3.2. L'inhibition est-elle réversible ?

La réversibilité de l'inactivation de la LOX de fève a été étudiée après dialyse (seuil de coupure : 12 000 – 14 000 Da) contre une solution de tampon acétate pH 5,6 (1 M en sulfate d'ammonium) pendant 12 h à 4 °C des mélanges (85 / 15) de LOX (2,6 nkat) / PRM ou eau préincubés à 0 °C pendant 3 h.

L'activité LOX de fève résiduelle, exprimée en % du témoin non incubé (**figure 87**) montre une perte d'environ 20 points d'activité résiduelle (%), au cours de la dialyse du témoin incubé dans l'eau. L'incubat LOX / PRM (85 / 15) porteur d'une activité LOX résiduelle d'environ 11 % avant la dialyse ne montre aucune régénération d'activité après la dialyse.

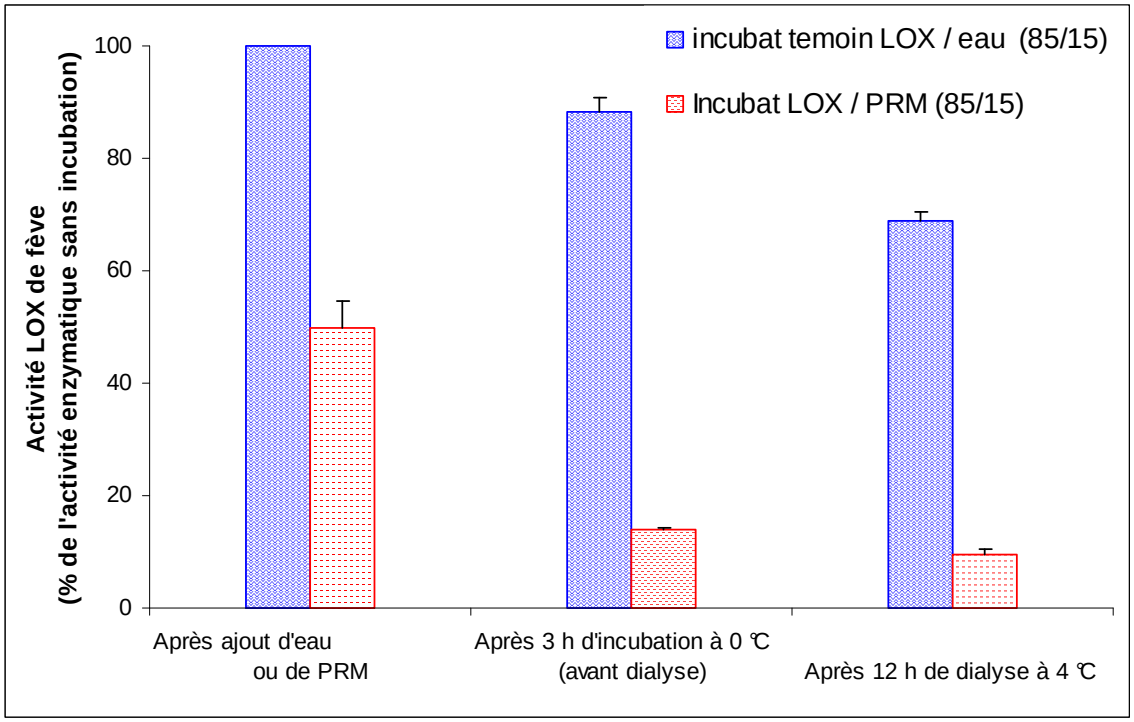


Figure 87 : Effet de la dialyse à 4 °C sur la LOX de fève partiellement inactivée par le PRM_{opt2}

L'inhibition de la LOX de fève par le PRM_{opt2} n'est pas réversible, et serait donc, non pas une inhibition de type non-compétitive vis-à-vis de l'acide linoléique, mais une inactivation irréversible de l'activité catalytique de la LOX. On peut supposer différents mécanismes d'inactivation enzymatique tels que la modification irréversible de la conformation de l'enzyme ou la chélation de l'atome de fer du site actif de l'enzyme. Une autre hypothèse pourrait impliquer le pouvoir antiradicalaire / piégeur de radicaux libres, démontré pour ces PRM, bloquant ainsi les étapes radicalaires de la catalyse enzymatique.

3.4. Stabilité du PRM au cours du stockage dans différentes conditions

Afin de pouvoir appliquer le PRM_{opt2} dans des procédés alimentaires, il est important de vérifier la stabilité de son pouvoir antioxydant. L'évolution du pouvoir inhibiteur de ce PRM vis-à-vis de la LOX de fève a été suivie sur plus de 14 semaines lors d'un stockage à trois différentes températures (- 20 °C, 4 °C, 25 °C) à l'abri de la lumière (**figure 88**). Les mesures ont été réalisée par polarographie avec 20 µL de PRM_{opt2}.

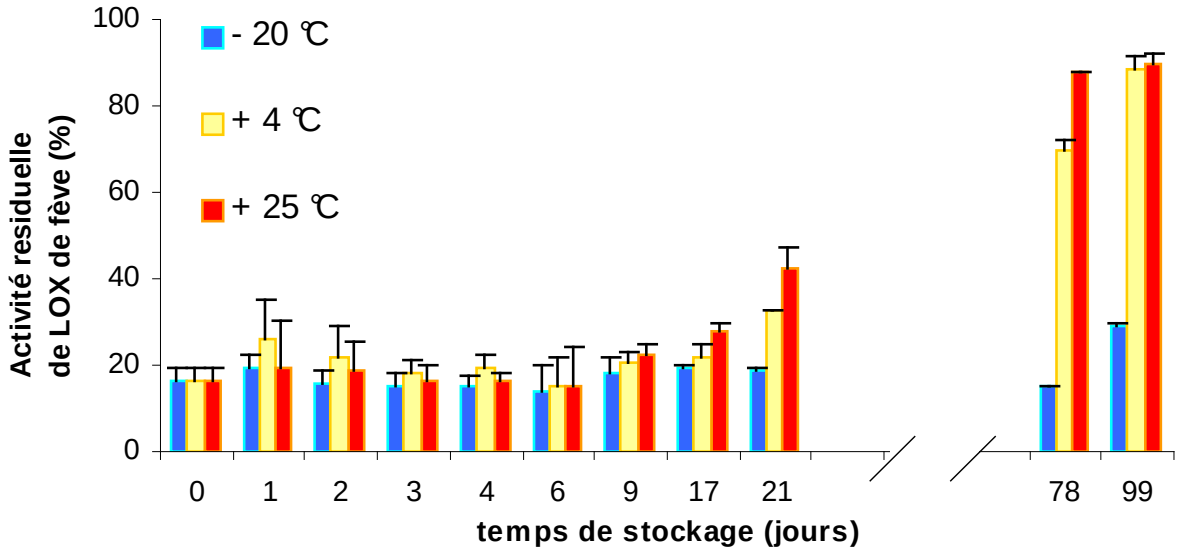


Figure 88 : Stabilité du pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité LOX de fève du PRM_{opt2} stocké 99 jours à – 20, 4 et 25 ℃

Initialement, l'activité résiduelle après ajout du PRM_{opt2} est proche de 18 %. Cette valeur évolue peu au cours des trois premières semaines quelle que soit la température de stockage : Le PRM_{opt2} est donc stable 2 semaines même à la température du laboratoire. Une perte de pouvoir inhibiteur est observée à 4 et 25 °C pour des durées de stockage supérieures. En revanche, Le pouvoir inhibiteur du PRM reste stable plus de trois mois lorsqu'il est conservé à l'état congelé.

Ainsi, le PRM_{opt2} est un puissant inactivateur de la LOX de fève dont le pouvoir inhibiteur est stable au moins 3 semaines à 4 et 25 °C et plus de trois moins lorsqu'il est congelé.

Après le criblage des paramètres expérimentaux de la réaction de Maillard à considérer et la détermination du domaine expérimental à utiliser, l'optimisation des conditions de la réaction de Maillard a permis d'obtenir des PRM très inhibiteurs de l'activité LOX de farine de fève. Ces PRM inactivent l'enzyme et se montrent particulièrement stables au cours du temps de stockage, ce qui en fait de bons candidats pour une utilisation dans les procédés alimentaires. Cependant, il faudra, avant d'envisager une éventuelle mise en œuvre de ces PRM, vérifier leur innocuité mais aussi leur capacité à lutter contre l'oxydation des lipides lorsque celle-ci n'est pas catalysée par des enzymes. Ceci conduirait à des applications intéressantes en technologie alimentaire pour remplacer les molécules antioxydantes peu efficaces ou posant des problèmes d'ordre toxicologique.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était de montrer la possibilité d'utiliser les produits de la réaction de Maillard (PRM) pour inhiber les réactions d'oxydations des polyphénols et des lipides respectivement catalysées par les polyphénoloxydases (PPO) et les lipoxygénases (LOX). En effet, ces phénomènes oxydatifs ont des effets néfastes sur des produits alimentaires : l'oxydation des phénols catalysée par la PPO en présence d'oxygène est principalement responsable du brunissement enzymatique des fruits et légumes tandis que l'oxydation des lipides par LOX entraîne notamment l'apparition de faux goûts et une décoloration des aliments. Actuellement, des antioxydants et des conservateurs synthétiques sont utilisés plus ou moins efficacement pour prévenir ces phénomènes mais l'emploi de ces composés tend à être réduit du fait de la réglementation faisant suite à la découverte de leur nocivité, mais aussi du fait de la volonté des consommateurs qui s'orientent désormais vers des additifs plus naturels. La finalité de cette étude est donc la recherche d'inhibiteurs d'oxydations enzymatiques qui soient non toxiques et applicables aux produits alimentaires, en vue du remplacement des additifs actuels. La mise au point de traitements alternatifs à l'utilisation de ces composés synthétiques constitue actuellement un axe de recherche en expansion en sciences et technologies alimentaires.

La première étape fut donc la sélection, la purification et l'étude des systèmes enzymatiques responsables des réactions d'oxydation. Concernant l'oxydation enzymatique des phénols, une attention particulière a été portée aux PPO provenant d'aubergines et de pommes de terre en raison de la grande propension à brunir des premières et du grand nombre d'applications des secondes. La PPO de pomme ayant déjà été étudiée (**Janovitz-Klapp *et al.*, 1989 ; Janovitz-Klapp *et al.*, 1990**) et celle de champignon, étant disponible sous forme commerciale, ces deux enzymes ont également servi à cette étude. Concernant l'oxydation enzymatique des lipides, la farine de fève, très riche en activité LOX et utilisée comme auxiliaire de panification, a été choisie comme source principale d'activité LOX. La LOX de soja, disponible commercialement et très étudiée, a également été utilisée dans nos travaux.

Les premiers temps de l'étude des systèmes enzymatiques ont été consacrés à la mise au point et à la réalisation des protocoles de purification des systèmes enzymatiques mettant principalement en œuvre des étapes de purification fractionnée par le sulfate d'ammonium et une chromatographie d'interactions hydrophobes ou de gel filtration pour la PPO de pomme de terre et la LOX extraite de la farine de fève respectivement. Les protocoles proposés ne permettent pas la purification jusqu'à homogénéité des isoformes enzymatiques mais les extraits enzymatiques ainsi obtenus sont au contraire représentatifs des activités globales recherchées dans les échantillons. De plus, ces procédés permettent l'obtention rapide d'extraits enzymatiques stables plusieurs mois sous forme congelée. Les études menées sur les systèmes enzymatiques purifiés nous ont permis de déterminer les conditions optimales de dosage en terme de pH du milieu réactionnel, de la concentration et de la nature du substrat, et ainsi mieux aborder l'étude de leur inhibition par les PRM.

A l'issue de la caractérisation des systèmes enzymatiques, la deuxième partie de ce travail de thèse a concerné l'étude du rôle des PRM dans l'inhibition de l'activité PPO. La littérature et les recherches menées antérieurement au laboratoire montraient en effet un fort pouvoir inhibiteur des PRM issus du chauffage de composés thiolés (glutathion ou cystéine) vis-à-vis de l'activité PPO (**Tan et Harris, 1995 ; Billaud *et al.*, 2003 ; Roux *et al.*, 2003 ; Billaud *et al.*, 2004 ; Brun-Mérimée *et al.*, 2004**). La méthodologie des plans d'expériences a été adoptée pour déterminer les paramètres physico-chimiques de la réaction de Maillard entre le glucose et la cystéine entraînant la formation d'un maximum de composés très inhibiteurs de l'activité PPO. En vue de la caractérisation des PRM, les dosages des réactants résiduels et d'un marqueur de la réaction de Maillard (5-hydroxyméthylfurfural : HMF) par des techniques chromatographiques ont permis la simplification du système modèle très complexe que représente le PRM en un mélange de composés néoformés à partir de HMF et de cystéine chauffée ou de sulfure d'ammonium.

La réaction de formation des composés inhibiteurs a été méthodiquement étudiée. L'étude des relations entre l'apparition des composés inhibiteurs et la nature des réactants (carbonylés et soufrés) a notamment mis en évidence la présence nécessaire d'une fonction carbonyle libre et d'un noyau aromatique présentant des doubles liaisons conjuguées. Après optimisation des conditions de mélange, les vitesses de formation des précurseurs des composés inhibiteurs en fonction de la température de chauffage de la cystéine ont été déterminées. Le ratio molaire cystéine chauffée / HMF en vue de la formation d'un maximum de pouvoir inhibiteur a été défini statistiquement proche de 1 : 1. Les propriétés inhibitrices du mélange semblent stable lorsqu'il est stocké en milieu acide et à l'abri de la

lumière. La lyophilisation permet également la stabilisation des produits inhibiteurs et favoriserait même leur formation. Le fractionnement du mélange a permis la séparation des composés inhibiteurs en vue de leur analyse. La comparaison des composés inhibiteurs présents dans les PRM avec ceux issus des mélanges cystéine chauffée / HMF montre d'une part qu'il s'agit d'inhibiteurs non compétitifs de la PPO ($K_{iapp,\ PRM}$ = 2,3 µM ; $K_{iapp,\ mel}$ = 0,7 µM) entraînant une faible réversibilité (≈ 20 %) de l'inhibition et que les produits inhibiteurs du mélange sont environ 3 fois plus efficaces que les PRM pour inactiver l'activité PPO de différentes origines végétales. L'étude des propriétés antioxydantes (tests DPPH° et AAPH°) et chélatrices du cuivre, de même que les expériences préliminaires d'électrophorèse, n'ont pas permis de préciser le mécanisme d'inhibition de la PPO par ces composés.

Aux concentrations utilisées pour prévenir le brunissement de purées de fruits et de légumes (tests L*,a*,b*), les mélanges, plus efficaces que les sulfites, n'ont montré aucun effet mutagène d'après les tests d'Ames réalisés sur les souches TA 98 et TA 100 en présence et en l'absence d'activateur métabolique et / ou de peroxyde d'hydrogène.

Concernant l'inhibition de l'oxydation enzymatique des lipides, après le criblage des paramètres de la réaction de Maillard ayant un effet sur la formation de composés inhibiteurs de la LOX, le domaine expérimental (durée de chauffage à 103 °C, pH initial du PRM et concentrations en glucose et en lysine) a été construit. La méthodologie des plans d'expériences a permis l'optimisation des conditions de la réaction de Maillard et la détermination d'un premier PRM optimal (PRM_{opt1}). Ensuite, afin d'affiner cette optimisation, les conditions de chauffage ont plus particulièrement été déterminées lors d'un second plan d'expériences aboutissant à l'optimisation PRM_{opt2}. L'inhibition de la LOX de farine de fève par ce PRM_{opt2} est non compétitive vis-à-vis de l'acide linoléique avec un $K_{iapp,\ PRMopt2}$ = 0,12 mM. De la même façon que pour les PRM à base de cystéine et inhibiteurs de la PPO, l'inhibition de la LOX de farine de fève par les PRM à base de lysine n'est pas réversible. De plus, ces PRM se montrent particulièrement stables : le pouvoir inhibiteur de ces PRM ne montre pas d'évolution significative au cours des deux premiers mois de conservation sous forme congelée.

Ainsi, les travaux que nous avons menés se montrent plutôt encourageant quant à l'utilisation possible des PRM dans l'industrie agro-alimentaire. Cependant, avant d'envisager leur emploi, de nombreux travaux complémentaires seraient à réaliser afin d'approfondir nos connaissances sur les rôles des PRM concernant l'inhibition de l'oxydation des phénols et des lipides.

Concernant l'inhibition de ces enzymes par les PRM, il sera important de déterminer, dans un premier temps, les mécanismes d'inhibition mis en jeu par ces composés. Lors de l'étude de l'inhibition de la PPO par les PRM à base de cysteine, nous n'avons pas pu montrer d'action des PRM au niveau du cuivre du site actif ni sur une modification de la structure protéique de l'enzyme. On peut alors émettre plusieurs hypothèses quant aux mécanismes d'inhibition. Certains auteurs (**Kubo et Kinst-Hori, 1998a ; Kubo et Kinst-Hori, 1998b**) envisagent la formation de bases de Schiff entre certains composés aldéhydiques (cuminaldéhyde et anisaldéhyde) et les groupes amines primaires de l'enzyme, expliquant la perte d'activité enzymatique. Cette hypothèse peut être envisagée dans le cadre de notre étude si les composés inhibiteurs possèdent une fonction carbonyle libre. Cependant, on peut alors s'interroger sur l'absence d'inhibition observée en présence des composés carbonylés seuls et sur la nécessité de mettre ces composés carbonylés en présence de composés soufrés pour voir apparaître un pouvoir inhibiteur. Une autre hypothèse impliquerait une réaction entre les composés inhibiteurs et la PPO au niveau de la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl du site actif. Selon cette hypothèse, principalement suggérée par la vitesse de réaction entre la cystéine chauffée et le HMF et l'action de l'eau sur le pouvoir inhibiteur, on pourrait penser qu'il y a compétition entre la liaison thio-éther du site actif et une réaction composés inhibiteurs / cystéine impliquée dans la liaison thio-éther. Une troisième hypothèse pourrait faire intervenir une modification des résidus histidine liés aux atomes de cuivre sur le site actif de l'enzyme. Cette hypothèse a été proposée par **Oszmianski et Lee (1990)** pour expliquer l'inactivation de la PPO par le miel. Pour vérifier cette hypothèse, on pourrait par exemple envisager d'étudier différents milieux incubation renfermant la PPO ± PRM ± l'histidine et de mesurer l'activité PPO et l'histidine libre dans ces différents incubats. Les hypothèses formulées quant à l'inhibition de la LOX par les PRM sont différentes et seraient sans doute liées aux propriétés antiradicalaires de ces PRM. Là encore, beaucoup de recherches restent à mener pour identifier les mécanismes d'inhibition de l'oxydation enzymatique des lipides.

Un autre aspect de cette étude concerne l'identification des structures chimiques impliquées dans les inhibitions. En effet, les PRM sont des mélanges complexes de molécules hautement fonctionnalisées. L'identification d'un composé ayant les propriétés particulières recherchées est un défi scientifique en soi, tout en étant indispensable à une meilleure compréhension des phénomènes observés. Les développements récents de nouvelles techniques séparatives et analytiques puissantes et les simplifications des systèmes modèles de PRM responsables de l'inhibition des PPO tend à laisser penser que de telles découvertes sont possibles. Concernant les PRM inhibiteurs de l'activité LOX, des expériences d'ultrafiltration, de tamisage moléculaire ou de précipitation des composés de hauts poids

moléculaires (mélanoïdines) par l'éthanol sont des exemples de procédures à suivre pour purifier puis identifier les PRM impliqués dans ces inhibitions.

L'identification des molécules responsables du pouvoir inhibiteur faciliterait la vérification de l'innocuité de ces composés. Les effets des PRM sur la santé sont actuellement très controversés. Si l'étude de la mutagénicité des composés responsables de l'inhibition des PPO, présentée dans cette thèse, tend à montrer que les PRM étudiés ne sont pas mutagènes, il est important de noter que le test d'Ames n'est qu'une première étape dans l'établissement de la non-toxicité de produits. Afin d'établir plus entièrement l'absence de risque lié à l'utilisation de ces produits, d'autres tests sur des cultures cellulaires et sur des animaux devraient être envisagés. En outre, l'établissement du degré d'exposition des consommateurs aux PRM peut se révéler être un exercice particulièrement difficile et pourtant indispensable à l'obtention de l'autorisation d'utilisation d'un nouvel additif alimentaire.

Ce rapport d'autorisation d'additif alimentaire doit également mentionner les interactions éventuelles entre l'additif (PRM ou mélange aldéhyde – cystéine chauffée dans notre cas) et la matrice alimentaire ou les procédés de transformation du produit. En effet, l'application de PRM dans les produits alimentaires peut avoir des effets recherchés ou au contraire néfastes à la qualité des produits. On peut s'interroger quant aux effets de tels ajouts : quels sont les effets organoleptiques de l'ajout de PRM ? De plus, compte tenu de la très grande réactivité de ces produits, ils peuvent entraîner la perte de fonctionnalité d'autres additifs. Au contraire, ces PRM sont peut être doués d'autres propriétés, anti-microbiennes par exemple (**Chevalier *et al.*, 2001**), ce qui permettrait le remplacement d'autres additifs dans les formulations alimentaires. On peut également s'attendre à ce que les PRM inhibiteurs de l'oxydation enzymatique des lipides puissent également prévenir l'autoxydation des lipides ce qui élargirait ainsi considérablement leur potentiel d'utilisation et pourrait permettre le remplacement des molécules antioxydantes actuellement utilisées qui posent des problèmes toxicologiques. En parallèle de ces considérations toxicologiques se posent les questions relatives au métabolisme des PRM. En effet, si la réaction de Maillard peut se produire *in vivo* et causer de nombreuses pathologies, les PRM ingérés, bien que majoritairement excrétés, peuvent également avoir des effets physiologiques néfastes (**Faist et Erbersdobler, 2001 ; Somoza, 2005 ; Tuohy *et al.*, 2006**). Par ailleurs, l'ingestion de PRM modifie le métabolisme d'autres nutriments ou micronutriments tels que le zinc (**Furniss *et al.*, 1989**), le cuivre (**Delgado-Andrade *et al.*, 2002**), le magnésium (**Delgado-Andrade *et al.*, 2007**) et les protéines (**Öste *et al.*, 1986 ; Öste *et al.*, 1987**). Des efforts sont donc à poursuivre en vue d'établir les voies métaboliques de certains composés marqueurs de la réaction de Maillard et pouvoir déterminer le devenir des PRM après leur ingestion.

Une autre perspective de l'utilisation des propriétés antioxydantes des PRM dans les produits alimentaires pourrait être la conception de produits qui incluraient dès leur formulation, les réactifs nécessaires à la formation des PRM actifs *in situ* (**Chevalier *et al.*, 2001**). Ainsi les produits alimentaires participeraient d'eux-mêmes à leur conservation ou seraient doués de propriétés antioxydantes acquises au cours de leur traitement thermique. Par ailleurs, de nombreux aliments sont traités thermiquement au cours de leur fabrication et font alors apparaître des PRM (**Pellegrini *et al.*, 2003**). Il serait donc judicieux de pouvoir étendre les mesures des pouvoirs antioxydants ou inhibiteurs à des PRM issus, non plus de systèmes modèles, mais de matrices alimentaires comme c'est actuellement le cas pour le café, la bière, le vin ou encore la croûte de pain. Il serait sans doute alors beaucoup plus facilement envisageable d'ajouter des extraits de ces produits pour inhiber les réactions d'oxydations dans d'autres produits alimentaires. Ceci permettrait de répondre aux attentes des consommateurs qui ont beaucoup évolué cette dernière décennie pour pouvoir leur proposer des produits sans dangers, naturels, bons pour la santé et pratiques.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Liste des produits chimiques utilisés

Extraction, précipitation et purification de la PPO - préparation des solutions tampon

acide citrique	> 99,5 %	Merck-Eurolab
dihydrogénophosphate monosodique	> 99,5 %	Merck-Eurolab
hydrogénophosphate disodique	> 99 %	Merck-Eurolab
polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	-	Fluka
éthylène glycol	Normapur	Merck-Eurolab
cystéine	> 98 %	Sigma-Aldrich
acide L-ascorbique	> 99,5 %	Sigma-Aldrich
sulfate d'ammonium	99,5 %	Merck

Substrats PPO

4-méthylcatéchol	> 95 %	Sigma-Aldrich
(+) catéchine	> 98 %	Sigma-Aldrich
(-) épicatéchine	> 98 %	Sigma-Aldrich
acide chlorogénique	> 95 %	Sigma-Aldrich
acide caféique	> 98 %	Sigma-Aldrich
acide hydrocaféique	> 98 %	Sigma-Aldrich
pyrocatéchol	> 98 %	Sigma-Aldrich
acide dihydroxyphénylacétique	> 95 %	Sigma-Aldrich
acide protocatéchique	> 97 %	Sigma-Aldrich
pyrogallol	> 98 %	Sigma-Aldrich

L-tyrosine	98%	Sigma-Aldrich
p-crésol	> 99 %	Sigma-Aldrich
p-phénylènediamine, HCl	> 95 %	Sigma-Aldrich

Inhibiteurs PPO

acide benzoïque	> 99,5 %	Sigma-Aldrich
acide *t*-cinnamique	> 99 %	Sigma-Aldrich
acide *p*-coumarique (hydroxycinnamique)	-	Sigma-Aldrich
acide sorbique	> 99 %	Sigma-Aldrich
4-hexylrésorcinol	99 %	Sigma-Aldrich

Substrats LOX

acide linoléique	> 99 %	

Dosage des thiols

tris-(hydroxyméthyl)aminométhane	Normapur	Prolabo
acide chlorhydrique	Normapur	Prolabo
acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoique) (DTNB)	> 98 %	Sigma-Aldrich

Synthèse des produits de la réaction de Maillard

D-glucose	> 99 %	Sigma-Aldrich
L-alanine	> 99 %	Merck - Eurolab
L-arginine	> 99,5 %	Sigma-Aldrich
L-cystéine	> 98 %	Sigma-Aldrich
glutathion (γ glu-cys-gly)	> 98 %	Sigma-Aldrich
L-glycine	> 99 %	Sigma-Aldrich
L-histidine	> 99 %	Sigma-Aldrich
L-lysine	> 98 %	Sigma-Aldrich
L-proline	> 99 %	Sigma-Aldrich
acide phosphorique (liquide)	85 %	VWR International
soude	> 98 %	VWR International

Etude nature / activité du mélange

2,3-butanedione	97 %	Sigma-Aldrich
2-furylméthylcétone	> 99 %	Sigma-Aldrich
2-furanone	98 %	Sigma-Aldrich
5-hydroxyméthylfurfural (HMF)	> 99 %	Sigma-Aldrich
acétaldéhyde	99 %	Sigma-Aldrich
acide 2-furoique	98 %	Sigma-Aldrich
p-anisaldéhyde	> 99,5 %	Sigma-Aldrich
m-anisaldéhyde	> 97 %	Sigma-Aldrich
benzèneacetaldéhyde	99 %	Sigma-Aldrich
benzaldéhyde	> 99 %	Sigma-Aldrich
cinnamaldéhyde	> 98 %	Sigma-Aldrich
cuminaldéhyde	> 98 %	Sigma-Aldrich
cyclohexane carboxaldéhyde	97 %	Sigma-Aldrich
cyclopentanone	> 99 %	Sigma-Aldrich
éthylvanilline	> 99 %	Sigma-Aldrich
formaldéhyde	37 %	Sigma-Aldrich
furfural (FF)	> 99 %	VWR International
furfuryl alcool	98 %	Sigma-Aldrich
glutaraldéhyde	50 %	Sigma-Aldrich
glyoxal	40 %	Sigma-Aldrich
p-hydroxybenzaldéhyde	> 95 %	Sigma-Aldrich
salicylaldéhyde	> 98 %	Sigma-Aldrich
vanilline	≥ 98%	Sigma-Aldrich
acide 3-mercaptopropionique	99 %	Sigma-Aldrich
acide cystéique	99 %	Sigma-Aldrich
acide thiolactique	95 %	Sigma-Aldrich
cystéamine	~95 %	Sigma-Aldrich
cystéine	> 98 %	Sigma-Aldrich
L-cystéine méthylester	98 %	Sigma-Aldrich

homocystéine	95 %	Sigma-Aldrich
L-méthionine	> 98 %	Sigma-Aldrich
sulfure d'ammonium	> 50 %	Sigma-Aldrich

Test d'Ames

2,4,7-trinitro-9-fluorénone (TNF)		
acide citrique	> 99,5 %	Sigma-Aldrich
agar n° 1	-	Oxoid
ampicilline tryhydrate	> 96 %	Sigma-Aldrich
D-biotine	> 99 %	Sigma-Aldrich
bouillon nutritif n° 2 (CM 67)	-	Oxoid
chlorure de potassium	> 99 %	Sigma-Aldrich
chlorure de magnésium	> 99 %	Sigma-Aldrich
chlorure de sodium	-	Sigma-Aldrich
D-glucose	> 99,5 %	Sigma-Aldrich
diméthylsulfoxyde (DMSO)	> 99,5 %	Sigma-Aldrich
homogénéisat de foie de rat (S9)	-	Biomedica / ICN
L-histidine - HCl	> 98 %	Sigma-Aldrich
NADP	~98 %	Sigma-Aldrich
peroxyde d'hydrogène	30%	Riedle-de Haën
phosphate de potassium dibasique	> 98 %	Sigma-Aldrich
tampon phosphate (20 mM pH 7,4 stérile - PBS)	-	PAA Labor.
tétracycline - HCl	> 95 %	Sigma-Aldrich

Mesures du pouvoir antioxydant et chélation du cuivre

sels d'ammonium de tétraméthylmurexide	-	Sigma-Aldrich
2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochlorure (AAPH°)	97%	Sigma-Aldrich
2,2-diphényl-1picrylhydrazyl (DPPH°)	-	Sigma-Aldrich

ANNEXE 2 : Résultats du plan d'expériences à 4 facteurs et 5 niveaux pour l'optimisation de l'inhibition de la LOX de fève par les PRM issus de lysine (chapitre 3 – § 3.1.2.)

BLOC	pHi	durée de chauffage (h)	[lysine] (M)	[glucose] (M)	Ar %	Absorbance 350 nm	Absorbance 420 nm	Absorbance 450 nm	pHf
1	7	9,5	0,6	0,6	55,5	679	259	205	4,22
1	7	9,5	1	0,6	54,0	940	330	241	4,89
1	9	5	0,8	0,4	43,0	766	172	116	5,76
1	5	14	0,8	0,8	48,0	959	394	280	3,45
1	5	5	0,4	0,4	87,7	211	80	61	3,66
1	7	9,5	0,6	1	72,0	1198	477	353	3,92
1	7	0,5	0,6	0,6	65,0	312	76	58	5,97
1	7	9,5	0,6	0,6	55,0	717	265	209	4,29
1	9	5	0,8	0,8	66,0	1138	382	303	4,77
1	5	14	0,8	0,4	53,0	704	301	211	3,47
1	9	5	0,4	0,4	55,5	474	142	117	4,86
1	9	14	0,4	0,4	52,5	574	195	149	4,57
1	11	9,5	0,6	0,6	48,0	961	290	192	8,53
1	5	5	0,4	0,8	86,0	415	158	104	3,37
1	7	9,5	0,6	0,6	54,0	667	255	195	4,27
1	7	9,5	0,2	0,6	84,0	389	173	141	4,01
1	3	9,5	0,6	0,6	78,8	736	214	118	2,95
1	9	14	0,4	0,8	40,5	1033	548	471	4,08
1	9	14	0,8	0,8	31,0	1204	421	304	4,64
1	5	14	0,4	0,4	86,5	468	171	108	3,3
1	9	5	0,4	0,8	79,0	689	247	200	4,35
1	7	9,5	0,6	0,6	56,0	709	281	202	4,21
1	7	9,5	0,6	0,2	58,0	329	87	67	5,68
1	9	14	0,8	0,4	44,0	702	201	133	5,66
1	5	5	0,8	0,4	66,0	470	186	141	3,75
1	5	5	0,8	0,8	74,0	867	329	225	3,51
1	7	18,5	0,6	0,6	36,0	916	327	235	4,4
1	5	14	0,4	0,8	70,5	1039	379	240	3,17
1	7	9,5	0,6	0,6	50,0	666	236	196	4,17
2	10,35	18,5	0,85	0,7	14,1				
2	10	18,5	0,8	0,8	15,2				

ANNEXE 3 : Résultats du plan d'expériences à 2 facteurs et 5 niveaux pour l'optimisation du traitement thermique des PRM glucose (0,08 M) – lysine (0,08 M) pH ≈10, en vue de l'inhibition de la LOX de fève (Chapitre 3 § 3.1.3.)

BLOC	durée de chauffage (h)	température (°C)	Absorbance 294 nm	320 nm	350 nm	420 nm	pH final	activité LOX (%)
1	14,5	105	143	128	86	23	6,08	34,3
1	7,5	94	110	101	60	15	7,83	52,0
1	14,5	120	174	146	105	33	5,36	15,5
1	14,5	105	143	128	86	23	6,11	33,9
1	21,5	116	115	130	91	30	5,37	29,2
1	5	105	105	102	65	17	7,61	52,0
1	14,5	105	143	127	86	24	6,11	30,3
1	24	105	150	131	94	25	5,70	55,7
1	7,5	116	156	139	98	26	5,83	40,9
1	14,5	105	145	127	89	24	6,08	29,2
1	21,5	94	135	129	84	19	6,83	38,9
1	14,5	90	116	106	67	17	7,83	50,0
1	14,5	105	143	127	89	23	6,08	30,0

BIBLIOGRAPHIE

Adrian J. (1999). Louis Camille Maillard : De la médecine à l'alimentation. Paris, Tec & Doc, Editions médicales internationales. 154 p.

Aeschbacher H. U., Chappuis C., Manganel M., Aeschbach R. (1981). Investigation of Maillard products in bacterial mutagenicity test systems. Prog. Food Nutr. Sci. **5:** 279-294

Ajandouz E. H., Puigserver A. (1999). Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. J. Agric. Food Chem. **47:** 1786-1793

Alais C., Linden G. (1987). Biochimie alimentaire. Paris, Masson Editeur. 224 p.

Almeras E., Stolz S., Vollenweider S., Reymond P., Mene-Saffrane L., Farmer E. E. (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. Plant J. **34:** 205-216

Ames B. N., Lee F. D., Durston W. E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70:** 782-786

Ames J. M., Bailey R. G., Mann J. (1999). Analysis of furanone, pyranone, and new heterocyclic colored compounds from sugar-glycine model Maillard systems. J. Agric. Food Chem. **47:** 438-443

Anese M., Lanciotti R., Sinigaglia M., Massini R. (1998). Response surface methodology applied to the study of some factors affecting the Maillard reaction. Adv. Food Sci **20:** 190-197

Apriyantono A., Ames J. M. (1990). Volatile compounds produced on heating lysine with xylose. *in* Flavour Science and Technology. Y. Bessiere,A.F. Thomas (Eds). Chichester, John Wiley**:** 117-120.

Asakura T., Nakamura Y., Inoue N., Murata M., Homma S. (1990). Characterization of zinc chelating compounds in instant coffee. Agric. Biol. Chem. **54:** 855-862

Ashoor S. H., Zent J. B. (1984). Maillard browning of common amino acids and sugars. J. Food Sci. **49:** 1206-1207

Bailey R. G., Ames J. M., Mann J. (2000). Identification of new heterocyclic nitrogen compounds from glucose-lysine and xylose-lysine Maillard model systems. J. Agric. Food Chem. **48:** 6240-6246

Ballantyne A., Stark R., Selman J. D. (1988). Modified atmosphere packaging of shredded lettuce. Int. J. Food. Sci. Technol. **23:** 267-274

Barbenti D., Mastrocola D., Lerici C. R. (1990). Early indicators of chemical changes in food due to enzymic or non enzymic browning reactions. Part II: Colour changes in heat treated model systems. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. **23:** 494-498

Barone R., Briante R., D'Auria S., Febbraio F., Vaccaro C., Del Giudice L., Borrelli G. M., Di Fonzo N., Nucci R. (1999). Purification and characterization of a lipoxygenase enzyme from durum wheat semolina. J. Agric. Food Chem. **47:** 1924-1931

Bauernfeind J. C., Pinkert D. M. (1970). Food processing with added ascorbic acid. Adv. Food Res. **18:** 219-315

Baynes J. W., Monnier V. M., Ames J. M., Thorpe S. R. (2004). The Maillard Reaction : Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease. Proceedings of the Eighth International Symposium on the Maillard Reaction, Charleston, South Carolina, New York Academy of Sciences.

Beaux Y., Drapron R., Nicolas J., Caillat J. M. (1973). La lipoxygénase de la fève (*Vicia faba L.*). Biochimie **55:** 253-262

Began G., Sudharshan E., Appu Rao A. G. (1999). Change in the positional specificity of lipoxygenase-1 due to insertion of fatty acids into phosphatidylcholine deoxycholate mixed micelles. Biochemistry **38:** 13920-13927

Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2004). Carbohydrates. *in* Food Chemistry (3rd revised ed). Berlin, Springer**:** 245-341.

Bernis-Young G. L., J. H., Bernhard R. A. (1993). Effect of pH on pyrazine formation in glucose-glycine model systerns. Food Chem. **46:** 383-387

Berry R. E., Tatum J. H. (1965). Comparison of orange concentrate and foam-mat powders by chromatographic procedures. J. Agric. Food Chem. **13:** 588

Billaud C., Garcia R., Boivin P., Nicolas J. (1997). Évolution des activité lipoxygénasique et polyphenolxydasique de différentes varités d'orge au cours du maltage. EBC Congress, Maastricht.

Billaud C., Maraschin C., Chow Y.-N., Cheriot S., Peyrat-Maillard M.-N., Nicolas J. (2005). Maillard reaction products as natural "antibrowning agents" in fruit and vegetable technology. Mol. Nutr. Food Res. **49:** 656-662

Billaud C., Maraschin C., Nicolas J. (2004). Inhibition of polyphenoloxidase from apple by Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with L-cysteine under various conditions of pH and temperature. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. **37:** 69-78

Billaud C., Roux E., Brun-Mérimée S., Maraschin C., Nicolas J. (2003). Inhibitory effect of unheated and heated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. I. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods. Food Chem. **81:** 35-50

Blois M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable radical. Nature **4617:** 1199-1200

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72:** 248-254

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. **28:** 25-35

Brash A. R., Ingram C. D., Harris T. M. (1987). Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids. Biochemistry **26:** 5465-5471

Bruins M. E., Thewessen A. J. H., Janssen A. E. M., Boom R. M. (2003). Enzyme inactivation due to Maillard reactions during oligosaccharide synthesis by a hyperthermophilic glycosidase: influence of enzyme immobilisation. J. Molecular Catal. B: Enzymatic **21:** 31-34

Brun-Mérimée S., Billaud C., Louarme L., Nicolas J. (2004). Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple--II. Kinetic study and mechanism of inhibition. Food Chem. **84:** 235-241

Buera P., Chirife J., Resnik S. L., Wetzeler G. (1987). 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 Chem. **52:** 1063-1067

Cabanes J., Chazarra S., Garcia-Carmona F. (2002). Tyrosinase kinetics: a semi-quantative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. J. Theor. Biol. **214:** 321-325

Cabibel M., Nicolas J. (1991). Lipoxygenase from tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* L.). Partial purification, some properties and *in vitro* cooxidation of some carotenoid pigments. Sci. Aliments **11:** 277-290

Cämmerer B., Jalyschko W., Kroh L. W. (2002). Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. J. Agric. Food Chem. **50:** 2083-2087

Cantos E., Tudela J. A., Gil M. I., Espin J. C. (2002). Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. J. Agric. Food Chem. **50:** 3015-3023

Cardey B., Enescu M. (2007). Selenocysteine versus cysteine reactivity: A theoretical study of their oxidation by hydrogen peroxide. J. Phys. Chem. A **111:** 673-678

Cheftel J. C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: overview. *in* High Pressure and Biotechnology. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans,P. Masson (Eds). London, John Libbey Eurotext**:** 195-209.

Chen J. S., Balaban M. O., Wei C. I., Marshall M. R., Hsu W. Y. (1992). Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide. J. Agric. Food Chem. **40:** 2345-2349

Chen L., Mehta A., Berenbaum M., Engeseth N. (1998). The potential use of honey as an inhibitor of enzymatic browning. Presented at Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Atlanta, GA.

Cheriot S. C., Billaud C., Nicolas J. (2006). Use of experimental design methodology to prepare Maillard reaction products from glucose and cysteine inhibitors of polyphenol oxidase from eggplant (*Solanum melongena*). J. Agric. Food Chem. **54:** 5120-5126

Chevalier F., Chobert J.-M., Genot C., Haertle T. (2001). Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β-Lactoglobulin glycated with several sugars. J. Agric. Food Chem. **49:** 5031-5038

Chuyen N. V., Ijichi K., Umestu J. H., Moteki K. (1998). Antioxidative properties of products from amino acids or peptides in the reaction with glucose. *in* Process-induced chemical changes in food. F. Shahidi (Ed.). New York, Plenum Press. **17:** 201-212.

Clotet R., Erruz E., Valero J. (1994). 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 **111:** 667-670

Coseteng M. Y., Lee C. Y. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. J. Food Sci. **52:** 985-989

Craft C. C., Audia W. M. (1962). Phenolic substances associated with wound-barried formation in vegetables. Bot. Gaz. **123:** 211-219

Croft K., Jüttner F., Slusarenko A. J. (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*. Plant Physiol. **101:** 13-24

Decker E. A., Xu Z. (1998). Minimizing rancidity in muscle food. Food Technol. **52:** 54-61

Dehove R. A., Soroste A., Yedikardachian C. (1998). Additifs et auxiliaires technologiques, arômes et nouveaux ingrédients. *in* Lamy Dehove : réglementation des produits, qualité, répression des fraudes. Tome 1. R. A. Dehove. Paris, Lamy SA. **1:** 254-252.

del Castillo M. D., Ferrigno A., Acampa I., Borrelli R. C., Olano A., Martinez-Rodriguez A., Fogliano V. (2007). *In vitro* release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxyl-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. J. Cereal Sci. **45:** 327-334

Delgado-Andrade C., Seiquer I., Navarro M. P. (2002). Copper metabolism in rats fed diets containing Maillard reaction products. J. Food Sci. **67:** 855-860

Delgado-Andrade C., Seiquer I., Navarro M. P. (2007). Effects of consumption of Maillard reaction products on magnesium digestibility and tissue distribution in rats. Food Sci. Technol. Int. **13:** 109-115

Della Longa S., Ascone I., Bianconi A., Bonfigli A., Castellano A. C., Zarivi O., Miranda M. (1996). The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. J. Biol. Chem. **271:** 21025-21030

Dijkstra L., Walker J. R. L. (1991). Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). J. Sci. Food Agric. **54:** 229-234

Doob H., Willmann A., Sharp P. F. (1942). Influence of moisture on browning of dried whey and skim milk. Ind. Eng. Chem. **34**

Duangmal K., Owusu-Apenten R. K. (1999). A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). Food Chem. **64:** 351-359

Edwards A. S., Wedzicha B. L. (1992). Kinetics and mechanism of the reaction between 3-deoxyhexosulose and thiols. Food Add. Cont. **9:** 461-469

Eicken C., Krebs B., Sacchettini J. C. (1999). Catechol oxidase - structure and activity. Curr. Opin. Struct. Biol. **9:** 677-683

El'piner E. A., Sokolskaya A. V., Margulis M. A. (1965). Initiation of chain reactions under ultrasonic waves effects. Nature **208:** 945-946

Ellman G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. **82:** 70-77

Ensminger A. H., Ensminger M. E., Konlande J. E., Robson J. R. K. (1995). The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition. Second edition, Boca Raton, CRC Press. 1178 p.

Espin J. C., Wichers H. J. (1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. J. Agric. Food Chem. **47:** 3518-3525

Faist V., Erbersdobler H. F. (2001). Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. Ann. Nutr. Metab. **45:** 1-12

Fang T. T., Chiang C. P. (1975). Prevention of browning and blemish by postharvest treatments and storage conditions for keeping better quality of fresh mushrooms. J. Chin. Soc. Hortic. Sci. **21:** 274-284

Fayad N., Marchal L., Billaud C., Nicolas J. (1997). Comparison of β-cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different sources. J. Agric. Food Chem. **45:** 2442-2446

Fennema O. R. (1975). Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems. *in* Water relations of foods. R. B. Duckworth (Ed.). New York, Academic Press**:** 397-413.

Ferrer O. J., Otwell W. S., Marshall M. R. (1989). Effect of bisulfite on lobster shell phenoloxidase. J. Food Sci. **54:** 478-480

Feussner I., Wasternack C. (1998). Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. Lipids **100:** 146-152

Finkle B. J., Nelson R. F. (1963). Enzyme reactions with phenolic compounds: effect of o-methyl-transferase on a natural substrate of fruit polyphenolxoidase. Nature **197:** 902-903

Florin I., Rutberg L., Curvall M., Enzell C. R. (1980). Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. Toxicology **18:** 219-232

Frankel E. N., Ed. (**2005**). Lipid oxidation. Dundee, Scotland, The Oily Press Ltd. 486 p.

Frankel E. N., Meyer A. (2000). The Problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J. Sci. Food Agric. **80:** 1925-1941

Frazier P. J. (1979). Lipoxygenase action and lipid binding in breadmaking. Bakers digest**:** 8-29

Friedman M. (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. J. Agric. Food Chem. **45:** 1523-1540

Friedman M., Molnar-Perl I., Knighton D. R. (1992). Browning prevention in fresh and dehydrated potatoes by SH-containing amino acids. Food Add. Contam. **9:** 499-503

Furniss D. E., Vuichoud J., Finot P. A., Hurrell R. F. (1989). The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. Br. J. Nutr **62:** 739-749

Garcia-Borron J. C., Solano F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. Pigment Cell Res. **15:** 162-173

Gardner H. W. (1988). Lipoxygenase pathway in cereals. *in* Advances in cereal sciences and technology. Y. Pomeranz (Ed.). Saint Paul, American association of cereal chemists. **9:** 161-215.

Gardner H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. Biochim. Biophys. Acta **1084:** 221-239

Gerhardt B., Fischer K., Balkenhohl T. J., Pohnert G., Kühn H., Wasternack C., Feussner I. (2005). Lipoxygenase-mediated metabolism of storage lipids in germinating sunflower cotyledons and β-oxidation of (9Z,11E,13S)-13-hydroxy-octadeca-9,11-dienoic acid by the cotyledonary glyoxysomes. Planta **220:** 919-930

German J. B., Kinsella J. E. (1985). Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. J. Agric. Food Chem. **33**

Gerrard J. A. (2006). The Maillard reaction in food: Progress made, challenges ahead--Conference Report from the Eigth International Symposium on the Maillard Reaction. Trends Food Sci. Technol. **17:** 324-330

Glatt H. (1989). Mutagenicity spectra in *Salmonella typhimurium* strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species. Mutagenesis **4:** 221-227

Glatt H. (1990). Endogenous mutagens derived from amino acids. Mutat. Res. **238:** 235-243

Glatt H., Oesch F. (1985). Mutagenicity of cysteine and penicillamine and its enantiomeric selectivity. Biochem. Pharmacol. **34:** 3725-3728

Glatt H., Protic-Sabljic M. (1983). Mutagenicity of glutathione and cysteine in the Ames test. Science **220:** 961-963

Glatt H., Utesch D., Herbst M., Oesch F. (1990). Mutagenicity experiments on L-cysteine and D-penicillamine using V79 cells as indicators and for metabolic activation. Mutat. Res. **243:** 187-193

Goodwin C. O., Morris J. R. (1991). Effect of ultrafiltration on wine quality and browning. Am. J. Enol. Vitic. **42:** 347-353

Greaves E. O., Morgan A. F., Loveen M. K. (1938). The effect of amino acid supplements and variations in temperature and duration of heating upon the biological value of heated casein. J. Nutr. **6**

Grey C. E., Adlercreutz P. (2003). Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. Mutat. Res. **527:** 27-36

Grosch W., Schwarz J. (1980). Enzymic-oxidative improvement of flour. Getreide Mehl Brot **34:** 287-288

Gruber P., Vieths S., Wangorsch A., Nerkamp J., Hofmann T. (2004). Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry. J. Agric. Food Chem. **52:** 4002-4007

Halliwell B., Clement M. V. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Lett. **486:** 10-13

Hampton M. B., Orrenius S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: Implication for apoptosis. FEBS Letters **414**

Harel E., Mayer A. M., Lerner H. R. (1970). Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. J. Sci. Food Agric. **21:** 542-544

Hasegawa D., Johnson R. M., Gould W. A. (1966). Effect of cold storage on chlorogenic acid content of potatoes. J. Agric. Food Chem. **14:** 165-169

Hayase F., Hirashima S., Okamoto G., Kato H. (1989). Scavenging of active oxygens by melanoidins. Agric. Biol. Chem. **53:** 3383-3385

Hayase F., Usui T., Watanabe H. (2006). Chemistry and some biological effects of model melanoidins and pigments as Maillard intermediates. Mol. Nutr. Food Res. **50:** 1171-1179

He Y., Fukushige H., Hildebrand D. F., Gan S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in arabidopsis leaf senescence. Plant Physiol. **128:** 876-884

Henry K. M., Kon S. K., Lea C. H. (1946). Deterioration on storage of skim milk. Nature **158:** 348-349

Henze R. E. (1956). Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione. Science **123:** 1174-1175

Hicks K. B., Haines R. M., Tong C. B. S., Sapers G. M., El-Atawy Y., Irwin P. L., Seib P. A. (1996). Inhibition of enzymatic browning in fresh fruit and vegetable juices by soluble and insoluble forms of β-cyclodextrin alone or in combination with phosphates. J. Agric. Food Chem. **44:** 2591-2594

Hicks K. B., Sapers G. M., Seib P. A. (1990). Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and compositions thereof. U.S.Patent 4,975,293.

Himmelwright R. S., Eickman N. C., Solomon E. I. (1980). Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. J. Am. Chem. Soc. **102**

Hirota N., Kuroda H., Takoi K., Kaneko T., Kaneda H., Yoshida I., Takashio M., Ito K., Takeda K. (2006). Brewing performace of malted lipoxygenase1 null barley and effect on the flavor stability of beer. Cereal Chem. **83:** 250-254

Hodge J. E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. J. Agric. Food Chem. **1:** 928-943

Hofmann T. (1998). 4-alkylidene-2-imino-5-[4-alkylidene-5-oxo-1,3-imidazol-2-inyl]aza- methylidene-1,3-imidazolidine-A novel colored substructure in melanoidins formed by Maillard reactions of bound arginine with glyoxal and furan-2-carboxaldehyde. J. Agric. Food Chem. **46:** 3896-3901

Holtman W. L., Vredenbregt-Heistek J. C., Schmitt N. F., Feussner I. (1997). Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating Barley. Eur. J. Biochem. **248:** 452-458

Hsu A. F., Thomas C. E., Brauer D. (1988). Evaluation of several methods for estimation of the total activity of potato polyphenol oxidase. J. Food Sci. **53:** 1743-1745

Jaenicke E., Decker H. (2004). Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. Micron - XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins **35:** 89-90

Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Goupy P. M., Nicolas J. J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. **38:** 926-931

Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Nicolas J. (1989). Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. Phytochemistry **28:** 2903-2907

Janzowski C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J., Eisenbrand G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. Food Chem. Toxicol. **38:** 801-809

Jing H., Kitts D. D. (2004). Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. Arch. Biochem. Biophys. **429:** 154-163

Jousse E., Jongen T., Agterof W., Russell S., Braat P. (2002). Simplified Kinetic scheme of flavor formation by the Maillard reaction. J. Food Sci. **67:** 2534-2542

Kahn V. (1985). Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. J. Food Sci. **50:** 111-115

Kaïd N., Potus J., Nicolas J. (2000). Development of simultaneous determination thiols, ascorbic acid and their oxidized forms using HPLC with electrochemical detection. Sci. Aliments **20:** 237-252

Keilin D., Mann T. (1940). Some properties of laccase from the latex of Lacquer trees. Nature **145:** 304

Kelly S. H., Finkle B. J. (1969). Action of a ring-cleaving oxygenase in preventing oxidative darkening of apple juices. J. Sci. Food Agric. **20:** 629-632

Kim S. B., Hayase F., Kato H. (1987). Desmutagenic effect of α-dicarbonyl and α-hydroxycarbonyl compounds against mutagenic heterocyclic amines. Mutat. Res. **177:** 9-15

Kitts D. D., Wu C. H., Kopec A., Nagasawa T. (2006). Chemistry and genotoxicity of caramelized sucrose. Mol. Nutr. Food Res. **50:** 1180-1190

Kitts D. D., Wu C. H., Stich H. F., Powrie W. D. (1993). Effect of glucose-lysine Maillard reaction products on bacterial and mammalian cell mutagenesis. J. Agric. Food Chem. **41:** 2353-2358

Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J. C., Krebs B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. Nat. Struc. Biol. **12**

Kong Z.-L., Shinohara K., Mitsuiki M., Murakami H., Omura H. (1989). Desmutagenicity of furan compounds towards some mutagens. Agric. Biol. Chem. **53:** 2073-2079

Kortenska V. D., Yanishlieva N. V., Kasaikina O. T., Totzeva I. R., Boneva M. I., Russina I. F. (2002). Phenol antioxidant efficiency in various lipid substrates containing hydroxy compounds. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **104:** 513-519

Kroh L. W. (1994). Caramelisation in food and beverages. Food Chem. **51:** 373-379

Kubo I., Kinst-Hori I. (1998a). Tyrosinase inhibitors from anise oil. J. Agric. Food Chem. **46:** 1268-1271

Kubo I., Kinst-Hori I. (1998b). Tyrosinase inhibitors from cumin. J. Agric. Food Chem. **46:** 5338-5341

Kühn H., Eggert L., Zabolotsky O. A., Myagkova G. I., Schewe T. (1991). Keto fatty acids not containing doubly allylic methylenes are lipoxygenase substrates. Biochemistry **30:** 10269-10273

Kühn H., Sprecher H., Brash A. R. (1990). On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme. J. Biol. Chem. **265:** 16300-16305

Kuwabara T., Katoh Y. (1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. Plant Cell Physiol. **40:** 1029-1035

Langdon T. T. (1987). Prevention of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. Food Technol. **41:** 64-67

Lax A. R., Vaughn K. C. (1991). Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. Plant Physiol. **96:** 26-31

Layne E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzymology **3:** 447-455

Lee C. Y., Jaworski A. (1988). Phenolics and browning potential of white grapes grown. Am. J. Enol. Vitic. **39:** 337-340

Lee C. Y., Kagan V., Jaworski A. W., Brown S. K. (1990). Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. J. Agric. Food Chem. **38:** 99-101

Lee M.-K. (2007). Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products. Food Chem. **102:** 146-149

Lerch K. (1981). Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine-monooxygenase. *in* Metal ions in biological systems. H. Siegel. New York, Marcel Dekker. **13:** 143-186.

Lerch K. (1982). Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioeher. J. Biol. Chem. **257:** 6414–6419

Lerch K. (1995). Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. *in* Enzymatic Browning and Its Prevention. C. Y. Lee,J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society**:** 64-80.

Li G., Zhang H., Sader F., Vadhavkar N., Njus D. (2007). Oxidation of 4-methylcatechol: implications for the oxidation of catecholamines. Biochemistry **46:** 6978 - 6983

Liavonchanka A., Feussner I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. J. Plant Physiol. **163:** 348-357

Liegeois C., Lermusieau G., Collin S. (2000). Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. J. Agric. Food Chem. **48:** 1129-1134

Lievonen S. M., Laaksonen T. J., Roos Y. H. (2002). Nonenzymatic browning in food models in the vicinity of the glass transition: effects of fructose, glucose, and xylose as reducing sugar. J. Agric. Food Chem. **50:** 7034-7041

Lingnert H., Eriksson E. (1980). Antioxidative Maillard reaction products. I. Products from sugars and free amino acids. J. Food Process. Preserv. **4:** 161-172

Lingnert H., Waller G. R. (1983). Stability of antioxidants formed from histidine and glucose by the Maillard reaction. J. Agric. Food Chem. **32:** 27-30

Luo D., Smith S. W., Anderson B. D. (2005). Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. J. Pharm. Sci. **94:** 304-316

Ma S. X., Silva J. L., Hearnsberger J. O., Garner J. O. J. (1992). Prevention of enzymatic darkening in frozen sweet potatoes [*Ipomoea batatas (L.) Lam*.] by water blanching: Relationship among darkening, phenols, and polyphenol oxidase activity. J. Agric. Food Chem. **40:** 864-867

Maccarrone M., Van Aarle P. G. M., Vedlink G. A., Vliegenthart J. F. G. (1994). In vitro oxygenation of soybean membranes by lipoxygenase-2. Biochim. Biophys. Acta **1190:** 164-169

Madero C. F., Finne G. (1982). Properties of phenoloxidase isolated from gulf shrimp. *in* Proceedings of the Seventh Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas. New Orleans, LA.**:** 328-339.

Madhavi D. L., Salukhe D. K. (1996). Butylated hydroxyanisole (BHA; tert-butyl-4-hydroxyanisole) and butylated hydroxytoluene (BHT; 2,6-di-tert-butyl-*p*-cresol). *in* Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives. D. L. Madhavi, S. S. Deshpande,D. K. Salunkhe, Dekker**:** 267-360.

Maillard L. C. (1912). Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodiques. C.R. Acad. Sci. **154:** 66-68

Maillard M.-N., Billaud C., Chow Y.-N., Ordonaud C., Nicolas J. (2007). Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. **40:** 1434-1444

Maleki S. J., Chung S.-Y., Champagne E. T., Raufman J.-P. (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. J. Allergy Clin. Immunol. **106:** 763-768

Maleki S. J., Yamaki K. (2007). Roasted peanuts are more likely to sensitize mice than raw peanuts. J. Allergy Clin. Immunol. **119 - Supplement 1:** S114

Maria Y., Vaillant P., Delorme N., Moneret-Vautrin D. A. (1989). Les accidents graves liés aux métabisulfites. La Revue de Medecine Interne **10:** 36-40

Maron D. M., Ames B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research **113:** 173-215

Marri C., Frazzoli A., Hochkoeppler A., Poggi V. (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Phytochemistry **63:** 745-752

Martinez M. V., Whitaker J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends Food Sci. Technol. **6:** 195-200

Martins S. I. F. S., van Boekel M. A. J. S. (2003). Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. Food Chem. **83:** 135-142

Matheis G. (1987). Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*) I. Properties of potato polyphenol oxidase. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. **11:** 5-12

Matheis G., Belitz H.-D. (1977). Untersuchung zur enzymatischen Bräunung bei Kartoffeln (*Solanum tuberosum*). Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **163:** 186-190

Matmaroh K., Benjakul S., Tanaka M. (2006). Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose-glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase. Food Chem. **98:** 1-8

Mayer A. M., Harel E. (1979). Phenoloxidase in plants. Phytochemistry **18:** 193-215

Mayer A. M., Harel E. (1991). Phenoloxidases and their significances in fruit and vegetables. *in* Food enzymology. P.F. Fox (Ed.). London, Elsevier Appl. Sci.**:** 323-398.

McEvily A. J., Iyengar R., Otwell W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. Crit. Rev. Food Sci.Nutr. **32:** 253-273

Mecchi E. P., Pippen E. L., Lineweaver H. (1964). Origin of hydrogen sulfide in heated chicken muscle. J. Food Sci. **29:** 393-399

Mesallam A. S., El-Shaarawy M. I. (1987). Quality attributes of honey in Saudi Arabia. Food Chem. **25:** 1-11

Meynier A., Mottram D. S. (1995). The effect of pH on the formation of volatile compounds in meat-related model systems. Food Chem. **52:** 361-366

Michail K., Matzi V., Maier A., Herwig R., Greilberger J., Juan H., Kunert O., Wintersteiger R. (2007). Hydroxymethylfurfural: an enemy or a friendly xenobiotic? A bioanalytical approach. Bioanal Chem **387:** 2801-2814

Minor W., Steczko J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J. T., Walter R., Axelrod B. (1996). Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1,4 Å resolution. Biochemistry **35:** 10687-10701

Monti S. M., Ritieni A., Graziani G., Randazzo G., Mannina L., Segre A. L., Fogliano V. (1999). LC/MS Analysis and antioxidative efficiency of Maillard reaction products from a lactose-lysine model system. J. Agric. Food Chem. **47:** 1506-1513

Morales F. J., Babbel M.-B. (2002). Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. J. Agric. Food Chem. **50:** 4657-4661

Morales F. J., Fernandez-Fraguas C., Jimenez-Perez S. (2005). Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. Food Chem. **90:** 821-827

Morales F. J., Jimenez-Perez S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. Food Chem. **72:** 119-125

Mortelmans K., Zeiger E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research **455:** 29-60

Mottram D. S., Ames J. M., Mlotkiewcz J. A., Copsey J. P., Anderson A. (1998). Flavouring agents., Patent GB98/00796.

Murakami M., Shigeeda A., Danjo K., Ymaguchi T., Takamura H., Matoba T. (2002). Radical-scavenging activity and brightly colored pigments in the early stage of Maillard reaction. J. Food Sci. **67:** 93-96

Nicolas J., Billaud C. (2006). Prévention du brunissement enzymatique. *in* Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado et V. Cheynier Eds. Paris, Tec et Doc. Lavoisier**:** 173-210.

Nicolas J., Drapron R. (1977). Some physicochemical characteristics of horse bean lipoxygenase (*Vicia faba L.*). Ann. Technol. Agric. **26:** 119-132

Nicolas J., Drapron R. (1981). Les lipoxygénases végétales. Etat actuel de nos connaissances. 1 - Aspects biochimiques. Sci. Aliments **1:** 91-168

Nicolas J., Launay B., Roussel P., Drapron R. (1978). Effect of composition kneading, and rest on the destruction of the carotenoid pigments and viscoelastic properties of doughs from flour from soft wheat. Bull. Anc. Eleves Ec. Meun. ENSMIC **287:** 247-262

Nicolas J., Richard-Forget F., Goupy P. M., M.-J.Amiot, Aubert S. Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. Crit. Rev. Food Sci.Nutr. **34:** 109-157

Nicoli M. C., Anese M., Severini C. (1994). Combined effects in preventing enzymatic browning reactions in minimally processed fruit. J. Food Qual. **17:** 221-229

Nishibori S., Kawakishi S. (1994). Formation of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6methyl-4(H)-pyran-4-one from fructose with β-alanine under conditions used for baking. J. Agric. Food Chem. **42:** 1080-1084

O'Sullivan W. J. (1969). Stability constants of metal complexes. *in* Data for biochemical research. R. M. C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot,K. M. Jones. Oxford, England**:** 423-434.

Obata Y., Tanaka H., Agric. Biol. Chem. 1965, 191. (1965). Studies on the photolysis of L-cysteine and L-cystine. Formation of the flavor of cooked rice from L-cysteine and L-cystine. Agric. Biol. Chem. **29:** 191-195

O'Brien J., Morrissey P. A. (1997). Metal ion complexation by products of the Maillard reaction. Food Chem. **58:** 17-27

Op den Camp R. G. L., Przybyla D., Ochsenbein C., Laloi C., Kim C., Danon A., Wagner D., Hideg E., Gobel C., Feussner I., Nater M., Apel K. (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. Plant Cell **15:** 2320-2332

Oste R. E., Brandon D. L., Bates A. H., Friedman M. (1990). Effect of Maillard browning reactions of the Kunitz soybean trypsin inhibitor on its interaction with monoclonal antibodies. J. Agric. Food Chem. **38:** 258-261

Öste R. E., Dahlqvist A., Sjoestroem H., Noren O., Miller R. (1986). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vitro studies. J. Agric. Food Chem. **34:** 355-358

Öste R. E., Miller R., Sjoestroem H., Noren O. (1987). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. J. Agric. Food Chem. **35:** 938-942

Oszmianski J., Lee C. Y. (1990). Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. J. Agric. Food Chem. **38:** 1892-1895

Painter T. J. (2003). Concerning the wound-healing properties of *Sphagnum* holocellulose: the Maillard reaction in pharmacology. J. Ethnopharmacol. **88:** 145-148

Palmieri S., Iori R., Leoni O. (1987). Comparison of methods for determining myrosinase activity. J. Agric. Food Chem. **35:** 617-621

Papazian R. (1996). Sulfites: safe for most, dangerous for some http://www.fda.gov/fdac/features/096_sulf.html. FDA Consumer magazine, US Food and Drug Administration. **consulté le 13 mai 2007**.

Partington J. C., Bolwell G. P. (1996). Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tuber. Phytochemistry **42:** 1499-1502

Pathak S. U., Ghole V. S. (1994). Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from Solanum tuberosum. Phytochemistry **36:** 1165-1167

Patil S. S., Zucker M. (1965). Potato phenolases: purification and properties. J. Biol. Chem. **240:** 3938-3943

Patrick A. D. (1962). The degradative metabolism of L-cysteine and L-cystine *in vitro* by liver in cystinosis. Biochem. J. **83:** 248-256

Patron A. (1950). Recherches sur le brunissement non enzymatique des fruits et des produits en conserve. Fruits d'Outre-Mer **5:** 167-207

Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Rio D. D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. J. Nutr. **133:** 2812-2819

Pendharkar M. B., Nair P. M. (1987). Alteration in phenylpropanoid metabolism in gamma irradiated potatoes. Potato Res. **30:** 589-601

Perez-Gilabert M., Lopez-Nicolas J. M., Garcia-Carmona F. (2001). Purification of a novel lipoxygenase from eggplant (*Solanum melongena*) fruit chloroplasts. Physiol. plantarum **111:** 271-282

Perlick A. M., Albus U., Stavridis T., Frühling M., Küster H., Pühler A. (1996). The *Vicia faba* lipoxygenase gene VfLOX1 is expressed in the root nodule parenchyma. Mol. Plant Microbe Interact. **9:** 860-863

Pots A. M., Gruppen H., Hessing M., van Boekel M. A. J. S., Voragen A. G. J. (1999). Isolation and characterization of patatin isoforms. J. Agric. Food Chem. **47:** 4587-4592

Powrie W. D., Wu C. H., Molund V. P. (1986). Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. Environmental Health Perspectives **67:** 47-54

Prenner B. M., Stevens J. J. (1976). Anaphylaxis after ingestion of sodium bisulfite. Ann. Allergy **37:** 180-182

Rancé I., Fournier J., Esquerré-Tugayé M. T. (1998). The incompatible reaction between *Phytophthora parasitica* var*. nicotianae* race D and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95:** 65554-6559

Reeve R. M., Hautala E., Weaver M. L. (1969). Anatomy and compositional variation within the potatoes. 2. Phenolics, enzymes and other minor components. Am. Potato J. **46:** 374-386

Reinhammar B., Malmström B. G. (1981). "Blue" copper-containing oxidases. *in* Copper Proteins. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons**:** 109-149.

Renn P. T., Sathe S. K. (1997). Effect of pH, temperature, and reactant molar ratio on L-leucine and D-glucose Maillard browning reaction in an aqueous system. J. Agric. Food Chem. **45:** 3782-3787

Richard-Forget F., Gauillard F., Hugues M., Thiry J.-M., Boivin P., Nicolas J. (1995). Inhibition of horse bean and germinated barley lipoxygenases by some phenolic compounds. J. Food Sci. **60:** 1325-1329

Richard-Forget F. C., Goupy P. M., Nicolas J. J. (1992). Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 2. Kinetic studies. J. Agric. Food Chem. **40:** 2108-2113

Rodriguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. J. Biol. Chem. **267:** 3801-3810

Roshal S. (1996). Lipoxygenase in plants: their role in development and stress response. Z. Naturforsch. **51:** 123-128

Roux E., Billaud C., Maraschin C., Brun-Mérimée S., Nicolas J. (2003). Inhibitory effect of unheated and heated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. II. Kinetic study and mechanism of inhibition. Food Chem. **81:** 51-60

Sanchez-Ferrer A., Rodríguez-López J. N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F. (1995). Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. Biochim. Biophys. Acta **1247:** 1-11

Sapers G. M., Hicks K. B., Philips J. G., Garzarella L., Pondish D. L., Matulaitis R. M., McCormack T. J., Sondey S. M., Seib P. A., El-Ataway Y. S. (1989). Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors, and complexing agents. J. Food Sci. **54:** 997-1002, 1012

Sayavedra-Soto L. A., Montgomery M. W. (1986). Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. J. Food Sci. **51:** 1531-1536

Seifert S., Krause R., Gloe K., Henle T. (2004). Metal complexation by the peptide-bound Maillard reaction products N-fructoselysine and N-carboxymethyllysine. J. Agric. Food Chem. **52:** 2347-2350

Sharma V. K., Choi J., Sharma N., Choi M., Seo S.-Y. (2004). *In vitro* anti-tyrosinase activity of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural isolated from *Dictyophora indusiata*. Phytother. Res. **18:** 841-844

Shibamoto T., Bernhard R. A. (1977). Investigation of pyrazine formation pathways in sugar-ammonia model systems. J. Agric. Food Chem. **25:** 609-614

Shidu J. S., Nordin P., Hoseney R. C. (1980). Mixograph studies III. Reaction of fumaric acid with gluten proteins during mixing. Cereal Chem. **57:** 159-163

Shu C. K., Hagedorn M. L., Mookherjee B. D., Ho C. T. (1985). pH Effect on the volatile components in the thermal degradation of cysteine. J. Agric. Food Chem. **33:** 442-446

Sims C. A., Bates R. P., Johnson R. P. (1990). Comparison of pre- and postfermentation ultrafiltration on the characteristics of sulfated and non-sulfated white wines. Am. J. Enol. Vitic. **41:** 182-185

Sims C. A., Johnson R. P., Bates R. P. (1989). Quality of a non-sulfited *Vitis rotundifolia* and a Euvitis hybrid white wine produced from ultrafiltered juice. Am. J. Enol. Vitic. **40:** 272-276

Skrzypczak-Jankun E., Amzel L. M., Kroa B. A., Funk M. O., Jr (1997). Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme. Proteins **29:** 15-31

Skrzypczak-Jankun E., Bross R. A., Caroll R. T., Dunham W. R., Funk Jr M. O. (2001). Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase. J. Am. Chem. Soc. **123:** 10814-10820

Somoza V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. Mol. Nutr. Food Res. **49:** 663-672

Spingarn N. E., Garvie-Gould C. T., Slocum L. A. (1983). Formation of mutagens in sugar-amino acid model systems. J. Agric. Food Chem. **31:** 301-304

Stark A.-A., Zeiger E., Pagano D. A. (1987). Glutathion mutagenesis in *Salmonella Typhimurium* TA 100: dependence on a single enzyme, γ-glutamyl-transpeptidase. Mutation Research **177:** 45-52

Surrey K. (1964). Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. Plant Physiol. **39:** 65-70

Svensson S. (1977). Inactivation of enzymes during thermal processing. *in* Physical, Chemical, and Biological Changes in Food Caused by Thermal Processing. T. Hoyem,O. Kvale (Eds.). London, Applied Science Publishers**:** 202-217.

Tai C.-Y., Ho C.-T. (1998). Influence of glutathione oxidation and pH on thermal formation of Maillard-type volatile compounds. J. Agric. Food Chem. **46:** 2260-2265

Tan B. K., Harris N. D. (1995). Maillard reaction products inhibit apple polyphenoloxidase. Food Chem. **53:** 267-273

Tappel A. L. (1966). Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems. *in* Cryobiology. H. T. Meryman (Ed.). New York, Academic Press**:** 163-177.

Tejero I., Eriksson L. A., Gonzalez-Lafont A., Marquet J., Lluch J. M. (2004). Hydrogen abstraction by soybean lipoxygenase-1. Density functional theory study on active site models in terms of Gibbs free energies. J. Phys. Chem. B **108:** 13831-13838

Thomas P. (1984). Radiation preservation of food of plant origin, Part 1. Potatoes and other tuber crops. Crit. Rev. Food Sci.Nutr. **19:** 327-379

Thomas P. (1986). Radiation preservation of food of plant origin, Part 3. Tropical fruits: bananas, mangoes, and papayas. Crit. Rev. Food Sci.Nutr. **23:** 147-205

Tomasik P., Palasinski M., Wiejak S. (1989). The thermal decomposition of carbohydrates. Part I: The decomposition of mono- di and oligosaccharides. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. **47:** 203-270

Tressl R., Wondrak G. T., Krüger R.-P., Rewicki D. (1998). New melanoidin-like Maillard polymers from 2-deoxypentoses. J. Agric. Food Chem. **46:** 104-110

Tuohy K. M., Hinton D. J. S., Davies S. J., Crabbe M. J. C., Gibson G. R., Ames J. M. (2006). Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota - implications for health. Mol. Nutr. Food Res. **50:** 847-857

U.S. Food and Drug Adminstration (2006). Determination of furan in foods - http://www.cfscan.fsa.gov/~dms/furan.html, Center for food safety and applied nutrition. **consulté le 21/02/2007**.

Ueda J. I., Shimazu Y., Ozawa T., Saito N. (1996). A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. Arch. Biochem. Biophys. **333:** 377-384

Ulbricht R. J., Northup S. J., Thomas J. A. (1984). A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. Fundam. Appl. Toxicol. **4:** 843-853

Vámos-Vigyázó L. (1981). Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Sci.Nutr. **15:** 49-127

van Boekel M. A. J. S. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. Biotech. Adv. **24:** 230-233

van de Lagemaat J., Manuel Silvan J., Javier Moreno F., Olano A., Dolores del Castillo M. (2007). *In vitro* glycation and antigenicity of soy proteins. Food Res. Int. **40:** 153-160

Van Gelder C. W. G., Flurkey W. H., Whichers H. J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. Phytochemistry **45:** 1309-1323

Varoquaux P. (1978). Contribution à l'étude des propriétés de l'*o*-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doctorat. Faculté des sciences de la vie et de l'environnement. Dijon. 131 p.

Vaughn K. C., Duke S. O. (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. Physiol. Plant. **60:** 106-112

Vaughn K. C., Lax A. R., Duke S. O. (1988). Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. Physiol. Plant. **72:** 659-665

Villegas R. J. A., Kojima M. (1986). Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. J. Biol. Chem. **261:** 8729-8733

Vollenweider S., Weber H., Stolz S., Chetelat A., Farmer E. E. (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. Plant J. **24:** 467-476

Wagner K.-H., Derkits S., Herr M., Schuh W., Elmadfa I. (2002). Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model. Food Chem. **78:** 375-382

Wagner K.-H., Reichhold S., Koschutnig K., Chériot S., Billaud C. (2007). The potential antimutagenic and antioxidant effects of Maillard reaction products used as natural antibrowning agents. Mol. Nutr. Food Res. **51:** 494-504

Walker J. R. L., Ferrar P. H. (1995). The control of enzymic browning in foods. Chem. Ind.**:** 836-839

Walker J. R. L., Ferrar P. H. (1998). Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. Biotech. Gen. Eng. Rev. **15:** 457-498

Weast C. A., Mackinney G. (1941). Nonenzymic darkening of fruits and fruit products. Ind. Eng. Chem. **33:** 1408-1412

Weber E., Laskawy F., Grosch W. (1973). Enzymatic carotene destruction in peas, soy beans, wheat and flax seed. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **152:** 324-331

Weber H., Chetelat A., Caldelari D., Farmer E. E. (1999). Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. Plant Cell **11:** 485-494

Whitaker J., Lee C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. *in* Enzymatic browning and its prevention. J. Whitaker,C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society**:** 2-7.

Whitaker J. R. (1972). Effect of pH on rates of enzyme-catalyzed reactions. *in* Principles of enzymology for the Food Sciences. O.R. Fennema (Ed.). New York, Marcel Dekker. **Chapter 10**.

Whitfield F. B., Mottram D. S. (1999). Investigation of the reaction between 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and cysteine or hydrogen sulfide at pH 4,5. J. Agric. Food Chem. **47:** 1626-1634

Wieslander A. P., Andren A., Nilsson-Thorell C., Muscalu N., Kjellstrand P. T., Rippe B. (1995). Are aldehydes in heat-sterilized peritoneal dialysis fluids toxic *in vitro*? Perit. Dial. Int. **15:** 348-352

Wijewickreme A. N., Kitts D. D. (1998). Metal chelating and antioxidant activity of model Maillard reaction products. Adv. Exp. Med. Biol **434:** 245-254

Yamaguchi T., Yamashita Y. (1981). Activating effect of several enzyme-proteins on the mutagenicity of amino-thiol compounds. Agric. Biol. Chem. **45:** 2157-2160

Yamashita N., Murata M., Inoue S., Hiraku Y., Yoshinaga T., Kawanishi S. (1998). Superoxide formation and DNA damage induced by a fragrant furanone in the presence of copper(II). Mutation Research **397:** 191-201

Yaylayan V. A. (1990). In search of alternative mechanisms for the Maillard reaction. Trends Food Sci. Technol. **1:** 20-22

Yaylayan V. A. (1997). Classification of the Maillard reaction: a conceptual approach. Trends Food Sci. Technol. **8:** 13-18

Yaylayan V. A., Kaminsky E. (1998). Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system. Food Chem. **63:** 25-31

Yen G. C., Tsai L. C., Lii J. D. (1992). Antimutagenic effect of Maillard products obtained from amino acids and sugars. Food Chem. Toxicol. **30**

Yilmaz Y., Toledo R. (2005). Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. Food Chem. **93:** 273-278

Ying D., Kevin P., Weihan Z., Xiaoqiang Y., Jianrong H. (2005). 5-(hydroxymethyl)furfural and derivatives as inhibitors of TNFalpha and IL-1beta production. US Patent 20050124684 A1.

Yoshimura Y., Iijima T., Watanabe T., Nakazawa H. (1997). Antioxidative effect of Maillard Reaction products using glucose-glycine model system. J. Agric. Food Chem. **45:** 4106-4109

Youn B., Sellhorn G. E., Mirchel R. J., Gaffney B. J., Grimes H. D., Kang C. (2006). Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed isoforms LOX-1 and LOX-3. Proteins **65:** 1008-1020

Zawistowski J., Biliaderis C. G., Eskin N. A. M. (1991). Polyphenol oxidase. *in* Oxidative enzymes in foods. D. S. R. Robinson,N. A. M. Eskin (Eds.). London, Elsevier Appl. Sci.**:** 217-273.

Zhang X. M., Chan C. C., Stamp D., Minkin S., Archer M. C., Bruce W. R. (1993). Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose. Carcinogenesis **14:** 773-775

Zhang Y., Chien M., Ho C. T. (1988). Comparison of the volatile compounds obtained from thermal degradation of cysteine and glutathione in water. J. Agric. Food Chem. **36:** 992-996

Zheng Y., Brown S., Ledig W. O., Mussinan C., Ho C.-T. (1997). Formation of sulfur-containing flavor compounds from reactions of furaneol and cysteine, glutathione, hydrogen sulfide and alanine/hydrogen sulfide. J. Agric. Food Chem. **45:** 894-897

Zinkernagel V. (1986). Unterchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltan (B*remia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. J. Phytopathol **115:** 257-266

RESUMES DES PUBLICATIONS

S. CHERIOT, C. BILLAUD, S. POCHTRAGER, K.-H. WAGNER J. NICOLAS (2008)

A comparative study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine-glucose derived Maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural. *Proposé à publication dans Food Chemistry le 31 octobre 2007*

It was previously reported that Maillard reaction products (MRP) obtained from glucose with cysteine (1 M/0.25 M) mixtures and compounds generated during the mixing of heated cysteine with HMF (100 mM each) solutions (Mix) were prone to inactivate polyphenoloxidases (PPO). In this study, antioxidant properties of these model systems were compared using in vitro assays (AAPH°, DPPH° and TMM tests) and the mechanism of eggplant inhibition was determined with the Mix. It resulted that antioxidant activity observed in MRP and the Mix could be attributed to the sulfhydryl group of cysteine. The Mix behaved like a non-competitive inhibitor (Ki = 0.7 µM). A highly active fraction devoid of thiol compound and HMF was obtained after fractionation of the Mix on C18 SPE cartridge. Mix was as efficient as metabisulfite in preventing enzymatic browning of apple puree (CIE-La*b*). Under the assay conditions MRP, the Mix and HMF could not be considered as mutagenic in the Salmonella microsome assay using Salmonella typhimurium TA98 and 102 strains.

Keywords: antioxidant; mutagenicity; Salmonella microsome assay; Maillard reaction products; cysteine; hydroxymethylfurfural; enzymatic browning; polyphenoloxidase

K.-H. WAGNER, S. REICHHOLD, K. KOSCHUTNIG, S. CHERIOT, C. BILLAUD. (2007).
The potential antimutagenic and antioxidant effects of Maillard reaction products used as natural antibrowning agents. Molecular Nutrition and Food Research, 51, 496-504

The aim of this study was to investigate the potential antioxidative and antimutagenic effects of Maillard reaction products (MRPs) formed from glucose or fructose and cysteine or glutathione in the Ames Salmonella test and the 2,29-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay. The mixtures were heated for 4 h 20 min or 14 h at 103 or 1108C and tested in five concentrations from 0.05 to 11 mg/plate in strains TA 98 and TA 102 in the plate incorporation assays. In order to promote the formation of mutant revertants the prooxidants hydrogenperoxide (H2O2) and tertiary-butyl hydroperoxide (tBOOH) were used in the TA 102. Tests were conducted with preincubation with (+S9) and without (–S9) metabolic activation. 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) was investigated as carbonyl compound. In TA 98, no effect of the MRPs was shown. The shorter heated samples (4 h 20 min) were in general more active than the longer heated ones (14 h). Up to 1 mg/plate (1%) all the reaction mixtures remained safe, but the 5% and in particular the 11% fractions increased the number of revertants significantly for the shorter heated mixtures. The 14 h mixtures did not show any response for almost all concentrations. No significant difference in the number of revertants could be observed between the cysteine and glutathione mixtures, the fructose mixtures increased revertants number to a higher extent than the glucose mixtures only in the 4 h 20 min heated mixtures for the highest concentration (11%). The highest activity was always observed in the +S9 tests. Antioxidative effects expressed as Trolox equivalents were higher in the 4 h 20 min heated samples. When detectable, HMF concentration was found to be higher in the 14 h MRP samples. In order to use the tested mixtures as antibrowning agents for technological purpose, the concentration should not be higher than 1% and the longer heated reaction mixtures were preferred since the brown pigments seemed to be less reactive than the intermediate products.

Keywords: Antioxidant activity / Cysteine / Fructose / Glucose / Maillard reaction

S. CHERIOT, C. BILLAUD, M.-N. MAILLARD, J. NICOLAS (2007)

Inhibition of polyphenoloxidase activity by mixtures of heated cysteine derivatives with carbonyl compounds. Molecular Nutrition and Food Research, 51, 395-403

It had previously been shown that soluble Maillard reaction products (MRP) made from thiol compounds and glucose or fructose contained powerful inhibitors of various fruit and vegetable polyphenoloxidase (PPO) a tivity. In MRP from cysteine and glucose, the amount of hydroxymethylfurfural (HMF) formed increased with the increase in glucose concentration (0–1 M), particularly under acidic (pH 2) conditions. Using model mixtures containing a preheated cysteine-derived compound and a carbonyl component, especially HMF, furfural and benzaldehyde, we showed that the neoformed compounds produced exhibited a stronger inhibitory potency toward PPO activity of eggplant, apple, and mushroom than former MRP. Optimal reaction conditions for the formation of inhibitory compounds when HMF reacted with preheated cysteine were investigated. It was found that a reactants molar ratio of 1:1 and a reaction time exceeding 1 h were the most efficient reaction conditions to generate inhibitory compounds. The stability of the newly formed products, evaluated during storage,showed that their inhibitory potency was globally kept at 4, 21, and 378C for 72 h but was unstable when stored at –208C and lost when exposed to UV radiations for 24 h.

Keywords: Cysteine, 5-HMF / Inhibition / Neoformed compounds / Polyphenoloxidase

S. CHERIOT, C. BILLAUD, J. NICOLAS (2006).

Use of experimental design methodology to prepare Maillard reaction products from glucose and cysteine inhibitors of polyphenol oxidase from eggplant (*Solanum melongena*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54; 5120-5126

Polyphenol oxidase (PPO) from eggplant was extracted and partially purified by a two-step fractionation-precipitation using ammonium sulfate and phenylsepharose hydrophobic interaction chromatography. The eggplant PPO extract was characterized concerning its kinetic properties. Optimal conditions to obtain Maillard reaction products (MRPs) with a maximal inhibitory potency (IP) toward PPO activity were determined using the surface response methodology and a four-factor and five-level experimental design. The MRPs were prepared from cysteine (0.25 M) and glucose (0-1 M), at several initial pH values (2-6) and at differing heating times (3-19 h) and temperatures (95-115 °C). The maximal IP was obtained after heating a model system of glucose/cysteine (1/0.25 M) at pH 2 for 3 h 20 min at 115 °C. The soluble part of this MRP, called MRPIPmax, was a noncompetitive inhibitor toward eggplant PPO. The IP of MRPIPmax on PPO activity was very potent as compared to that displayed by benzoic, p-coumaric, and t-cinnamic acids, as well as sorbic acid and 4-hexylresorcinol. The activity of preincubated PPO at 0 °C with MRPIPmax was only slightly restored after dialysis or gel filtration.

Keywords: Maillard reaction products; cysteine; eggplant; polyphenol oxidase; enzymatic browning

C. BILLAUD, C. MARASCHIN, Y-N. CHOW, S. CHERIOT, M-N. MAILLARD, J. NICOLAS. (2005). **Maillard reaction products as « natural antibrowning » agents in fruits and vegetables technology**. Molecular Nutrition and Food Research, 49, 656-662.

The effects of Maillard reaction products (MRPs), synthesized from a sugar (pentose, hexose, or disaccharide) and either a cysteine-related compound, an amino acid, or a sulfur compound, were investigated on polyphenoloxidase (PPO) activity from apple, mushroom, and eggplant. The optimal conditions for the production of inhibitory MRPs were performed using two-factor and five-level central experimental designs. It resulted that thiol-derived MRPs were highly prone to give rise to inhibitory compounds of PPO activity. Technological assays were also performed to test the efficiency of selected MRPs in the prevention of enzymatic browning in raw and minimally processed fruits and vegetables.

Keywords: Enzymatic browning / Maillard reaction products / Polyphenoloxidase / Thiol compound

S. CHERIOT, C. GERIN, C. BILLAUD, J. NICOLAS, P. MORAS (2005).
Le brunissement enzymatique des végétaux découpés : étude sur l'aubergine. 1ère partie : approche biochimique. Revue CTIFL, Avril 2005, 210, 35-39.

Dans le contrôle de l'oxydation des végétaux découpés, l'approche chimique est poursuivie avec de nouvelles substances. Différentes molécules sont ainsi comparées en substitution à terme des sulfites qui ont valeur d'optimum d'efficacité. La cystéine et les PRM (produits de la réaction de Maillard) peuvent prétendre les remplacer dans un process de maîtrise du brunissement enzymatique. Les résultats obtenus sur les PRM ont permis de déterminer les conditions d'efficacité sur l'enzyme purifiée et leur transcription sur le végétal. Cette recherche sur les PRM, très prometteuse pour l'avenir, ne présente pas d'intérêt immédiat pour l'industriel, les produits inhibiteurs devant être identifiés et leur nontoxicité restant à prouver. La cystéine, acide aminé connu mais sous utilisé, peut constituer une étape intermédiaire.

Enzymatic browning of cut vegetables: the case of eggplant – a biochemical approach (Part 1)
In monitoring the oxidation of cut vegetables, the chemical approach is pursued using new substances. Alternative molecules are thus compared as potential substitutes for sulfi tes, which represent optimal effectiveness. Cysteine and Maillard reaction products (MRPs) can hope to replace sulfi tes as part of a process to control enzymatic browning. Based on the results obtained using MRPs, it was possible to determine the conditions for effectiveness on the purifi ed enzyme and transcribe them to plant material. This research into Maillard reaction products, although highly promising for the future, is of no immediate interest to the industry, since inhibitor compounds must be identifi ed and demonstrated to be non-toxic. Cysteine, a known but under-utilised amino acid, may constitute an intermediate step.

C. GERIN, J. MARION, P. MORAS, S. CHERIOT, C. BILLAUD, J. NICOLAS (2005).
Le brunissement enzymatique des végétaux découpés : étude sur l'aubergine. 2ème partie : approche technologique. Revue CTIFL, Mai 2005, 211, 43-47

Les PRM synthétisés ont montré une bonne efficacité dur l'activité PPO d'aubergine. En complément des travaux d'identification des molécules néoformées dans la réaction de Maillard, qui sont en cours au Cnam, on a cherché à comparer au Ctifl l'action de substances et traitements disponibles susceptibles de contrôler ces brunissements sur e végétal découpé. En dehors des PRM issus de la combinaison du glucose-cystéine, seule la cystéine apporte une maîtrise correcte du brunissement sur des tranches d'aubergine avec des conditions d'emploi définies. Des essais d'efficacité sont menés dans le cas de légumes en mélange et aussi sur d'autres produits découpés comme les pommes et les pommes de terre pour lesquelles un même phénomène oxydatif est constaté et qui réagissent bien avec la cystéine.

Eggplant: enzymatic browning of cut vegetables – a technological approach (part 2).
Synthetic MRPs proved effective on the activity of PPOs in eggplant. To supplement studies under way by the Cnam (Conservatoire National des Arts et Métiers) to identify molecules newly formed during the Maillard reaction, Ctifl sought to compare the effects of available substances and treatments having the potential to control browning in cut vegetables. Other than the MRPs derived from the combination of glucose and cysteine, only cysteine allows adequate control of browning on slices of eggplant under the defined conditions of use. Trials are being conducted on vegetables mixtures as well as on other cut products, such as apples and potatoes, for which the same oxidative phenomenon occurs and which react well when cysteine is used.