

A study of the formation of non-volatile Maillard products from glutamine-derived ammonia: the structure identification of some novel molecules

Céline Niquet

▶ **To cite this version:**

Céline Niquet. A study of the formation of non-volatile Maillard products from glutamine-derived ammonia: the structure identification of some novel molecules. Chemical Sciences. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0030 . pastel-00003465

HAL Id: pastel-00003465
https://pastel.hal.science/pastel-00003465

Submitted on 28 Feb 2008

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

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

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 : **Chimie Analytique**

présentée et soutenue publiquement
par

Céline NIQUET

le 30 octobre 2007

IDENTIFICATION DE LA STRUCTURE ET DES MECANISMES DE FORMATION DE QUELQUES PRODUITS DE MAILLARD NON VOLATILS ISSUS DE L'AMMONIAC ROLE PRECURSEUR DE LA GLUTAMINE

Directeur de Thèse : ***Inès Birlouez***

Codirecteur de Thèse : ***Frédéric Tessier***

Travail réalisé : Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, F-60026 Beauvais

Devant le jury :

M. Paul-André FINOT, Chercheur, **NESTLE** …….	**Président**
M. Jacques NICOLAS, Professeur, **CNAM** …….	**Rapporteur**
M. Jean-Luc LE QUERE, Directeur de Recherche, **INRA** ……..……..	**Rapporteur**
M. Pierre GIAMPAOLI, Professeur, **AGROPARISTECH** ……..……..	**Examinateur**
Mme Inès BIRLOUEZ, Maître de Conférence, **AGROPARISTECH** ……..…	**Examinateur**
M. Frédéric TESSIER, Enseignant-chercheur, **LASALLE-BEAUVAIS** ……...	**Examinateur**

A mes parents,

REMERCIEMENTS

Le travail dont fait l'objet ce présent mémoire de thèse a été réalisé au sein de la Plateforme de Chimie Analytique et de Biologie Moléculaire de l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Philippe Choquet en sa qualité de Directeur Général pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'Institut et Monsieur Thierry Aussenac en sa qualité de Directeur Scientifique pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie également Monsieur Francis Willequet et Monsieur Hassan Younes, son successeur, en leur qualité de responsable du département des Sciences de la Nutrition et de la Santé.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Jacques Nicolas et au Docteur Jean-Luc Le Quéré qui se sont intéressés à mon travail, m'ont aidée à en corriger les imperfections et ont accepté d'en être les rapporteurs.

Je remercie également Dr Paul-André Finot, en tant que Président de jury, et Professeur Pierre Giampaoli pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à dire un très grand merci à Frédéric Tessier, Enseignant-Chercheur à LaSalle Beauvais pour son encadrement, son soutien et son aide, et sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Merci de m'avoir communiqué ta passion pour la recherche que tu vis au jour le jour, et quelque part sans elle nous n'aurions pu faire ce travail ensemble dans ces conditions. Et pour terminer, merci pour ton humeur égale chaque jour, et pour ta disponibilité quasi quotidienne.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Docteur Inès Birlouez, Maître de conférences de l'AgroParisTech, en sa qualité de directrice de thèse, pour m'avoir guidée dans mon travail et pour ses conseils avisés.

Je tiens à remercier vivement Messieurs Dominique Cailleu, Serge Pilard et David Mathiron de la Plateforme Analytique de l'Université de Picardie Jules Verne d'Amiens pour leur collaboration et leur aide précieuse dans l'aboutissement de mon travail.

Je remercie également Mathilde Courel, Maître de conférence de l'AgroParisTech, pour ses échantillons de biscuits modèles.

J'adresse mes sincères remerciements à Ina Nemet, Doctorante à l'Institut Rudjer Boskovic de Zagreb, pour son aide dans l'élaboration de mécanismes réactionnels.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Jean-Claude Laguerre, Enseignant-Chercheur à LaSalle Beauvais, pour m'avoir aidée en matière de cinétiques ainsi que Antoine Jouable pour m'avoir déniché de nombreux articles.

Un grand merci à toutes les personnes de l'ISAB puis de LaSalle Beauvais qui ont fait partie de cette aventure avec moi (car parfois c'était une véritable aventure !). Je pense à Christine et Benoît au début de l'histoire de la plateforme avec qui je garde de très bons souvenirs (*régissades* entre autres !) et qui sont depuis devenus des amis. J'adresse aussi un grand merci à Larbi pour le café matinal, ainsi qu'Anne-Laure et Adeline qui m'ont apporté bonne humeur en cette fin de thèse, à Julien pour son aide « musclée » et à Sabrina pour ses encouragements et son sourire quotidien. Je n'oublie pas Pauline, pour son déménagement inoubliable mais surtout pour son soutien dans les quelques moments difficiles. Tout simplement merci à toutes et à tous, et aussi à celles et ceux que j'aurai pu oublier.

Un immense merci à Julia et Romain dont l'amitié a été d'un grand soutien, merci pour votre aide en RMN et en chimie organique en général.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir permis de réaliser mes longues études et sans qui je n'aurai pu aller jusqu'au bout, et à qui je dédicace ce travail.

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

RESUME

Ce travail porte sur l'identification de la structure et des mécanismes de formation de quelques produits de Maillard non volatils, l'objectif principal étant de mieux connaître le rôle précurseur de la glutamine. Contrairement aux molécules volatiles, nos connaissances sur les composés non volatils sont assez peu étendues. De plus, la glutamine, de structure proche de celle de l'asparagine, possède deux atomes d'azote susceptibles de participer à la réaction de Maillard : l'α-amine et l'ammoniac issu de la lactamisation. Dans ce contexte, nous avons recherché, isolé et caractérisé les produits de Maillard non volatils susceptibles de se former lors du traitement thermique d'aliments riches en glutamine et en ammoniac. A l'aide de différents outils analytiques (HPLC, fluorescence, spectrométrie de masse, RMN …), nous avons détecté quatre fluorophores issus de la réaction entre la glutamine et le méthylglyoxal. L'un d'entre eux, l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotonique (HDNA), a été identifié comme étant le principal fluorophore formé. Un second modèle simple mettant en jeu la glutamine et le glucose nous a permis d'identifier deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines, partiellement étudiées dans la littérature. Enfin, la recherche de ces produits de Maillard dans quelques matrices alimentaires a révélé la présence des deux pyrazines non volatiles dans différentes sauces tomates chauffées (matrice alimentaire riche en glutamine) ainsi que dans des biscuits du commerce riches en bicarbonate d'ammonium. La présence de l'HDNA dans les aliments reste à vérifier. Il sera ensuite important d'évaluer l'incidence de ces composés sur les qualités sanitaires et organoleptiques des aliments.

ABSTRACT

This work concerns the identification of the structure and mechanisms of formation of some non-volatile Maillard reaction products (MRPs). The principle goal was to achieve a better understanding of the precursory role of the glutamine. Unlike that of the volatile molecules, the knowledge of non-volatile compounds is very limited. Moreover glutamine with a similar structure to asparagine has two nitrogen atoms likely to take part in the Maillard reaction: the α-amine and ammonia resulting from a lactamisation. In this context we looked for, isolated and characterized the non-volatile MRPs which are likely to be formed during the heat treatment of foods rich in glutamine or ammonia. Using various analytical tools (HPLC, fluorescence, mass spectrometry, NMR …) we detected four fluorophores resulting from the reaction between glutamine and methylglyoxal. One of them, the 5-hydroxy-2,6-dimethylnicotonic acid (HDNA), was identified as being the main fluorophore formed. A second simple model with glutamine and glucose enabled us to identify two poly-hydroxyalkyl-pyrazines partially studied in the literature. Finally the search for these MRPs in some foodstuffs revealed the presence of the two non-volatile pyrazines in various heated tomato sauces (glutamine-rich foods) and in biscuits containing ammonium bicarbonate. The presence of the HDNA in food remains to be checked. In the future it will be important to evaluate the organoleptic properties and the physiopathological impact of these ingested MRPs.

LISTE DES ABREVIATIONS 8
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 10
INTRODUCTION 20
PARTIE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 24
CHAPITRE I : MECANISMES A L'ORIGINE DU BRUNISSEMENT DES ALIMENTS 25
I. Le brunissement enzymatique 25
II. La caramélisation 26
III. La réaction de Maillard 28
1. Etape initiale 31
2. Etape de propagation et avancée 32
3. Etape finale 35
CHAPITRE II : PROPRIETES DES PRODUITS ISSUS DE LA REACTION DE MAILLARD 36
I. Qualité organoleptique 36
II. Texture 37
III. Perte de qualité nutritionnelle des aliments associée à la réaction de Maillard 37
IV. Impact de la réaction de Maillard sur la santé 39
1. Effets néfastes des produits de Maillard sur la santé 39
2. Les mélanoïdines : leur pouvoir antioxydant et leur action prébiotique 43
3. Effets détoxifiants des produits de Maillard 43
CHAPITRE III : IMPLICATION DES ACIDES AMINES LIBRES DANS LA REACTION DE MAILLARD 46
I. La réaction de Maillard : facteurs mis en jeu et paramètres influents 47
1. Réactivité des acides aminés 47
2. Réactivité des cétoses, aldoses et composés α-dicarbonylés 49
3. pH 52
a. Etude sur différents modèles 52
b. pH dans les aliments 54
c. Effet de la nature du tampon et de sa concentration 55
4. Couple Temps/Température 56
5. Activité d'eau 57
II. Les acides aminés libres dans les aliments 59
III. L'exemple de l'asparagine 63
IV. La glutamine et l'ammoniac : implication dans la réaction de maillard 65
1. Les produits de dégradation spécifiques de la glutamine 65

a. L'acide pyroglutamique 66
b. Le 3-butenamide 67
c. Transamidification avec la lysine 68
2. Les produits de dégradation non-spécifiques de la glutamine 69
a. Les imidazoles 70
b. Les pyrazines 71
c. Les pyridines 73
d. L'acrylamide 73
e. Les autres sources d'ammoniac 75
OBJECTIF 78
PARTIE II MATERIEL ET METHODES 81
CHAPITRE I : PRODUITS CHIMIQUES ET INSTRUMENTATION 82
I. Les produits chimiques 82
II. Les tampons 83
III. Préparation de modèles simples 83
IV. Filtration des échantillons et des solvants pour HPLC 83
V. HPLC/UV-Fluo 84
VI. Collecteur de fraction 84
VII. LC-MS 85
1. Généralités sur le spectromètre de masse LTQ 85
2. La source d'ionisation par électrospray 86
3. Les solvants et les débits d'élution chromatographique sélectionnés pour nos analyses LC-MS 87
4. La trappe d'ions linéaire (l'analyseur de masse) 87
VIII. MS-Q-TOF 89
IX. Autres Spectrométries 89
X. Evaporation-Concentration 90
XI. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 90
1. Spectres RMN à une dimension (1D) 91
2. Spectres RMN à deux dimensions (2D) 91
a. Spectres RMN à deux dimensions homonucléaires 91
b. Spectres RMN à deux dimensions hétéronucléaires 92
CHAPITRE II : METHODES 92

I. Dosage des acides aminés 92
1. Principe 92
2. Protocole 93
a. Préparation des différentes solutions 93
b. Dérivation 93
c. Conditions chromatographiques 94
d. Exemple de chromatogramme 95
II. Dosage de l'acide pyroglutamique 96
1. Principe 96
2. Protocole 96
a. Conditions chromatographiques 96
b. Exemple de chromatogramme 97
III. Dosage de l'ammoniac 98
1. Principe 98
2. Protocole 98
IV. Purification et concentration de quelques produits de Maillard 100
1. Principe 100
2. Procédé 101
V. Préparation d'un échantillon d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en vue d'une analyse RMN 102
VI. Analyse statistique 103
PARTIE III RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION 104
CHAPITRE I : ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA GLUTAMINE EN MILIEU AQUEUX 105
I. Influence du pH et de la température sur la dégradation de la glutamine en acide pyroglutamique 105
1. Protocole expérimental 105
2. Résultats et discussion 106
II. Comparaison du taux de formation d'ammoniac par dégradation de la glutamine et autres précurseurs 109
1. Protocole expérimental 110
2. Résultats et discussion 110
CHAPITRE II : ETUDE DE LA REACTION ENTRE LA GLUTAMINE ET LE METHYLGLYOXAL 114
I. Etude de la formation de chromophores et de fluorophores 115

1. Cinétiques de formation de chromophores et de fluorophores en fonction du rapport molaire Gln/MG 116
a. Protocole expérimental 116
b. Résultats 116
c. Discussion 120
2. Comparaison de la formation de pigments bruns et de fluorophores entre différents précurseurs d'ammoniac 121
a. Protocole expérimental 121
b. Résultats et discussion 122
c. Discussion 123
3. Comparaison des profils chromatographiques de deux mélanges glutamine + méthylglyoxal et ammoniac + méthylglyoxal 124
a. Conditions chromatographiques 125
b. Résultats et discussion 126
4. Dosage de l'acide pyroglutamique formé à partir d'un mélange glutamine + méthylglyoxal 129
II. Etude de quatre fluorophores produits par réaction entre la glutamine et le méthylglyoxal 130
1. Introduction 131
2. Identification structurale des quatre fluorophores 132
a. Séparation de chacun des fluorophores 132
b. Caractéristiques spectrales 135
c. Recherche de fonctions hydroxylées et carboxyliques sur le principal fluorophore 141
d. Analyse du nombre de protons dits « échangeables » sur le fluorophore majoritaire 143
e. Estimation du nombre d'atomes de carbone et d'azote 143
f. Détermination du nombre d'atomes d'azote 148
g. Caractérisation de la formule brute 149
h. Analyse RMN 151
i. Présentation de la formule chimique développée de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique 154
j. Proposition de structures pour les autres fluorophores 158
3. Extraction de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique au dichlorométhane 162

4. Etude de stabilité de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique 164
a. Protocole expérimental 164
b. Résultats et discussion 165
5. Cinétiques de formation des quatre fluorophores en fonction du pH et de la température 166
a. Protocole expérimental 166
b. Résultats 167
6. Influence de différents précurseurs d'ammoniac sur la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique 175
a. Protocole expérimental 175
b. Résultats et discussion 176
7. Mesure de la contribution de l'α-amine de la glutamine dans la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique 177
a. Protocole expérimental 177
b. Résultats et discussion 177
8. Etude de l'influence du pyroglutamate sur la formation de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique 181
a. Protocole expérimental 181
b. Résultats et discussion 181
9. Etude de la réaction entre l'ammoniac et le méthylglyoxal en compétition avec le glucose 182
a. Protocole expérimental 183
b. Résultats et discussion 183
III. Conclusion 184
CHAPITRE III : ETUDE DE LA REACTION ENTRE LA GLUTAMINE ET LES SUCRES REDUCTEURS 187
I. Analyse LC-UV-MS d'un mélange glutamine/glucose 187
II. Caractéristiques spectrales 190
III. Caractérisation de la formule brute 193
1. Détermination du nombre d'atomes d'azote 193
2. Détermination du nombre d'atomes de carbone 194
3. Analyse des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines par MS-Q-TOF 195
4. Identification structurale des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines 196
IV. Extraction des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines au dichlorométhane 201

V. Etude du mécanisme de formation des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines 202
1. Etude de l'effet pseudo-catalytique du glyoxal et du méthylglyoxal dans la formation des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines 204
a. Protocole expérimental 204
b. Résultats et discussion 204
2. Estimation de la contribution des deux composés α-dicarbonylés dans la formation des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines 207
a. Protocole expérimental 208
b. Résultats et discussion 208
VI. Cinétiques de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine et de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine en fonction de la température 210
1. Protocole expérimental 210
2. Résultats et discussion 210
VII. Mesure de la contribution de l'α-amine de la glutamine dans la formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine 212
1. Protocole expérimental 212
2. Résultats et discussion 213
VIII. Influence de la nature du précurseur d'ammoniac sur la formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine 214
1. Protocole expérimental 214
2. Résultats et discussion 215
IX. Influence de différents sucres réducteurs 217
1. Protocole expérimental 217
2. Résultats et discussion 217
X. Conclusion 219
CHAPITRE IV : RECHERCHE DE L'ACIDE 5-HYDROXY-2,6-DIMETHYLNICOTINIQUE ET DES POLY-HYDROXYALKYL-PYRAZINES DANS DEUX MATRICES ALIMENTAIRES 223
I. La tomate et ses produits dérivés 223
1. Dosage de la glutamine libre dans notre échantillon de tomate fraîche 224
2. Protocole de traitement thermique des matrices « tomate » et d'extraction de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique 225
3. Recherche de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique 226
a. Tomate fraîche 226
b. Sauce tomate de marque Buitoni 228

c. Sauce brune et ketchup 230
d. Ajouts de glutamine/ammoniac/méthylglyoxal dans la tomate fraîche 231
e. Ajouts de glutamine et de méthylglyoxal dans la sauce Buitoni 236
4. Recherche des poly-hydroxyalkyl-pyrazines 237
a. Tomate fraîche 238
b. Sauce Buitoni 242
c. Sauce brune et ketchup 245
II. Les biscuits 247
1. Protocole d'extraction 247
2. Biscuits du commerce 248
3. Des biscuits modèles 251
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 253
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 259
ANNEXES 273
ANNEXE I 274
ANNEXE II 275

LISTE DES ABREVIATIONS

AGEs : Produits avancés de glycation (*Advanced Glycation End products*)

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*)

Asn : Asparagine

CEL : Carboxyéthyllysine

CML : Carboxyméthyllysine

CNF : Composés néoformés

FL : Fructose-Lysine

Da : Dalton

DAD : Détecteur à barrette de diode (*Diode Array Detector*)

Fluo : Fluorescence

Gln : Glutamine

Glu : Acide Glutamique

Gx : Glyoxal

h : Heure

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HMF : 5-hydroxyméthylfurfural

HPLC : Chromatographie liquide de haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

L : Litre

λ_{em} : Longueur d'onde d'émission

λ_{ex} : Longueur d'onde d'excitation

MG : Méthylglyoxal

min : Minute

mM : Milli molaire

MS : Spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)

OPA : *ortho*-phthalaldehyde

PGA : Acide pyroglutamique ou pyroglutamate (*Pyroglutamic acid*)

PPO : Polyphénoloxydase

PRM : Produits de la réaction de Maillard

RAGEs : Récepteurs des produits avancés de glycation (*Receptors for AGEs*)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

s : Seconde

T : Température

TIC : Courant d'ions total (*Total Ion Current*)

TMAH : Hydroxyde de tétraméthylammonium

TMS : Tétraméthylsilane

t_r : Temps de rétention

U.A. : Unité Arbitraire

UV : Ultra Violet

v/v : Volume par volume

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Brunissement enzymatique du 4-méthylcatéchol. 26
Figure 2 : Formation du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) par déshydratation du glucose. 27
Figure 3 : Polymérisation de l'HMF (d'après Kroh, 1994)..... 28
Figure 4 : Schéma global de la réaction de Maillard (synthèse des schémas établis par Hodge (1953) ; Finot & Furniss (1989) ; Faist & Erbersdobler (2001)). 30
Figure 5 : Formation du produit d'Amadori à partir d'aldose et du produit de Heyns à partir de cétose (première étape de la réaction de Maillard). 32
Figure 6 : Déshydratation en milieu acide et basique des produits d'Amadori (Hodge, 1953 ; Machiels & Istasse, 2002 ; Perrotin, 2004). 34
Figure 7 : Quelques familles de flaveurs trouvées dans les aliments. 36
Figure 8 : Quelques exemples de composés potentiellement cancérigènes formés par chauffage et cuisson d'aliments (Jagerstad & Skog, 2005). 40
Figure 9 : Schéma de réaction entre la fumonisine B_1 et le glucose conduisant à sa détoxification. 44
Figure 10 : L'effet mutagène de ces trois amines hétérocycliques inhibé par des mélanges sucres/tryptophane et xylose/acide aminés (Yen, *et coll.*, 1992). 45
Figure 11 : Schéma de formation du méthylglyoxal à partir du produit d'Amadori issu de la réaction entre un acide aminé R-NH_2 et le glucose. 50
Figure 12 : Réaction de l'ortho-phénylènediamine sur le méthylglyoxal. 51
Figure 13 : Addition nucléophile d'une amine primaire sur un aldéhyde ou une cétone en fonction du pH. 53
Figure 14 : Vitesse des réactions de dégradation des aliments en fonction de l'activité de l'eau à température ambiante (Lorient & Tainturier (2002), d'après Labuza, *et coll.,* 1970)... 58
Figure 15 : Schéma de formation de l'acrylamide à partir de l'asparagine libre dans les aliments chauffés (Zyzak, *et coll.*, 2003 ; Granvogl, *et coll.*, 2004). 64
Figure 16 : Schéma de formation de l'acide pyroglutamique à partir de la glutamine (Schneider, *et coll.*, 2003). 66
Figure 17 : Deux produits de réaction possibles à partir de la glutamine (3-butenamide) et de l'asparagine (acrylamide). 67
Figure 18 : Mécanisme de formation du 2-pyrrolidinone à partir de pyrolyse de glutamine-sucre ou acide glutamique-sucre proposé par Stadler, *et coll.* (2003)..... 68

Figure 19 : Réaction entre l'ε-amine de la lysine et l'amide de la glutamine. 69
Figure 20 : Schéma de formation des imidazoles à partir d'ammoniac, de glucose et de fructose (Kort, 1970). 70
Figure 21 : Schéma de formation des pyrazines à partir d'ammoniac, de glucose et de fructose (Kort, 1970). 72
Figure 22 : Deux voies possibles de formation d'acrylamide (Becalski, *et coll.*, 2003)..... 74
Figure 23 : Acrylamide formé à partir d'ammoniac et d'acroléine à différentes températures (Yasuhara, *et coll.*, 2003). 75
Figure 24 : Décomposition de l'hydrogénocarbonate d'ammonium en ammoniac, eau et dioxyde de carbone..... 77
Figure 25 : Schéma de la glutamine et l'asparagine..... 80
Figure 26 : Schéma simplifié du spectromètre de masse LTQ (Thermo Electron Corporation). 86
Figure 27 : Spectres de masse MS /MS sur l'ion m/z 168 avec (B) ou sans (A) activation de bande large. 89
Figure 28 : Schéma de dérivation d'un acide aminé avec l'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA) et le 2-mercaptoéthanol. 92
Figure 29 : Analyses chromatographiques d'un standard de glutamine (A) et d'un extrait de tomate fraîche (B) après dérivation à l'OPA (détection par fluorescence à $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 325/465nm). 95
Figure 30 : Chromatogramme d'un standard d'acide pyroglutamique. Détection par MS en isolant l'ion de m/z 130 (A) et en UV à 214 nm (B). 97
Figure 31 : Pourcentage d'ammoniac et d'ammonium en fonction du pH. 99
Figure 32 : Droite de calibration de l'électrode d'ammoniac. 100
Figure 33 : Microtube RMN symétrique Shigemi pour solvant D_2O (CortecNet, France). .. 103
Figure 34 : Formation d'acide pyroglutamique en fonction du temps selon la température à pH 7,4 (A) et selon le pH à 120°C (B). 106
Figure 35 : A - Formation d'ammoniac à 120°C à partir de solutions aqueuses de glutamine, urée, asparagine et acide glutamine en fonction du temps. B - Formation d'ammoniac à 180°C à partir de solutions aqueuses de glutamine, urée et asparagine en fonction du temps. 111
Figure 36 : Formation de produits de Maillard mesurée par (A) absorption à 420 nm et (B) par fluorescence à 330 et 450 nm, longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement, à partir de solutions chauffées à 120°C de glutamine et de méthylglyoxal

en fonction du rapport molaire glutamine/méthylglyoxal. La figure A présente en plus la mesure de pH à chaque point des différentes cinétiques. 118
Figure 37 : Formation de pigments bruns (A) mesurés par absorption à 420 nm et de fluorophores (B) mesurés par fluorescence à 330 (λ_{ex}) et 450 (λ_{em}) nm à partir de solutions aqueuses de glutamine, asparagine, acide glutamique, urée et ammoniac chauffées à pH 9 à 120°C pendant 2 h en présence de méthylglyoxal. Significativité entre glutamine et autres amines calculée à l'aide du test de Mann-Whitney (**, $p < 0,05$). 122
Figure 38 : Première hypothèse de synthèse de fluorophores à partir de la glutamine et d'ammoniac en présence de méthylglyoxal. 124
Figure 39 : Chromatogrammes d'un mélange glutamine+méthylglyoxal (—) et d'un mélange ammoniac+méthylglyoxal (—) avec une détection par fluorescence λ_{ex} = 330 nm et λ_{em} = 450 nm (A : profil entier du chromatogramme ; B : profil agrandi sur l'axe des ordonnées). 126
Figure 40 : Seconde hypothèse de synthèse de fluorophores à partir de la glutamine et de l'ammoniac en présence de méthylglyoxal. 128
Figure 41 : Chromatogramme obtenu en HPLC/Fluo (λ_{ex} = 330 nm et λ_{em} = 450 nm) à partir d'une solution de glutamine et méthylglyoxal en milieu tampon pH 5 incubée pendant 3 jours à 70°C. 131
Figure 42 : Chromatogrammes de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), de l'hétérocycle C (C) et de l'hétérocycle D (D) obtenus en LC-MS. 133
Figure 43 : Chromatogramme d'un mélange glutamine+méthylglyoxal obtenu en LC-MS. 134
Figure 44 : Spectres d'absorbance de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D) dans l'éluant HPLC composé d'acide formique à pH 2,5. 136
Figure 45 : Spectres de fluorescence de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D) en milieu tampon phosphate 200 mM à pH 7. 137
Figure 46 : Spectres de fluorescence de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction du pH : pH 3 (—) ; pH 7 (—) et pH 10 (—). 138

Figure 47 : Spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D). 139
Figure 48 : Spectres MS^2 de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D). 140
Figure 49 : Schéma réactionnel de la méthylation d'un acide carboxylique ou d'un alcool par le TMAH. 141
Figure 50 : Analyse chromatographique de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique avant (A) et après (C) réaction avec le TMAH, avec les spectres de masse associés au pic élué à 8,3 min (B) et au pic élué à 11,4 min (D). 142
Figure 51 : Spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique extraits d'une injection en LC-MS (A) et d'une infusion (B) avec les intensités des pics m/z 168 et 169 permettant le calcul du nombre d'atomes de carbone. 145
Figure 52 : Spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), le composé hétérocyclique C (B) et le composé hétérocyclique D (C) avec les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+1]^+$ pour le calcul du nombre d'atomes de carbone. 146
Figure 53 : Spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique ^{15}N (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique ^{15}N (B), du composé hétérocyclique C ^{15}N (C) et du composé hétérocyclique D ^{15}N (D) obtenus après analyse en LC-MS d'un mélange de $^{15}NH_4Cl$ et de méthylglyoxal. 148
Figure 54 : Spectres de masse réalisés sur le spectromètre Q-TOF de l'acide 5-hydroxy-2(ou6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D). Pour chaque composé, sont présentés le spectre de masse théorique d'une formule brute donnée (en haut) et le spectre de masse expérimental du composé analysé (en bas). 150
Figure 55 : Spectre RMN du proton de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique..... 152
Figure 56 : Spectre RMN-2D ^1H-^{13}C de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (HSQC). 153
Figure 57 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique à l'aide de l'analyse en MS-Q-TOF. Pour chaque fragmentation et chaque fragment, la valeur théorique de masse provenant d'une table de spectrométrie de masse est inscrite. 155

Figure 58 : Proposition de mécanisme réactionnel de la synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique..... 157
Figure 59 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique à l'aide de l'analyse en MS-Q-TOF. 159
Figure 60 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS du composé hétérocyclique C à l'aide de l'analyse en MS-Q-TOF. 161
Figure 61 : Dégradation (en %) de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction du temps. Suivi de la dégradation à trois températures : 22, 70 et 120°C..... 165
Figure 62 : Cinétiques de formation de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique en fonction du temps à partir d'un mélange ammoniac + méthylglyoxal incubé à 70°C, 120°C et 180°C (pH initial de 5, 7,4 et 9). 168
Figure 63 : Cinétiques de formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction du temps à partir d'un mélange ammoniac + méthylglyoxal incubé à 70°C, 120°C et 180°C (pH initial de 5, 7,4 et 9). 170
Figure 64 : Cinétiques de formation du composé hétérocyclique C en fonction du temps à partir d'un mélange ammoniac + méthylglyoxal incubé à 70°C, 120°C et 180°C (pH initial de 5, 7,4 et 9)..... 172
Figure 65 : Cinétiques de formation du composé hétérocyclique D en fonction du temps à partir d'un mélange ammoniac + méthylglyoxal incubé à 70°C, 120°C et 180°C (pH initial de 5, 7,4 et 9)..... 174
Figure 66 : Formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction de la nature de l'amine (ammoniac, glutamine, hydrogénocarbonate d'ammonium, urée, asparagine et acide glutamique) incubée à pH 7,4 avec du méthylglyoxal 2 h à 120°C (analyse LC-MS-MS)..... 176
Figure 67 : Analyse LC-MS d'un mélange composé de glutamine et de méthylglyoxal (A) et d'un mélange composé de glutamine-*amine*-^{15}N et de méthylglyoxal (B). Pour chaque analyse, les chromatogrammes correspondant aux ions de rapports m/z 168 et 169 sont présentés. 178
Figure 68 : Formation des ions m/z 168 et m/z 169 dans les mélanges glutamine/méthylglyoxal (14N) et glutamine-*amine*-^{15}N/méthylglyoxal (15N). 179
Figure 69 : Formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique dans des mélanges composés d'ammoniac ou de glutamine et de méthylglyoxal en présence ou non d'acide pyroglutamique et un mélange constitué d'ammoniac, de glutamine et de méthylglyoxal. 182

Figure 70 : Formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique à partir de mélanges d'ammoniac et de glucose, d'ammoniac + méthylglyoxal (1MG et 2MG) et d'ammoniac + glucose + méthylglyoxal (2Glucose + 1MG et 2Glucose + 2MG) (LC-MS-MS). 184
Figure 71 : Analyse chromatographique d'un mélange glutamine et glucose (détection UV à 270 nm). 188
Figure 72 : Chromatogramme obtenu en LC-MS d'un mélange composé de glutamine et de glucose incubé 2 h à 120°C. Les ions 185 et 215 ont été extraits du TIC. 189
Figure 73 : Spectre de masse de deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines : m/z 185 et 215. 190
Figure 74 : Spectres MS^2 des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines : m/z 185 (A) et m/z 215 (B). 191
Figure 75 : Spectre d'absorbance des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines. 192
Figure 76 : Spectre de masse des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines obtenu après analyse en LC-MS d'un mélange $^{15}NH_4Cl$ + glucose. 193
Figure 77 : Spectre de masse des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines obtenu après analyse en LC-MS d'un mélange composé d'ammoniac et de glucose-^{13}C. 194
Figure 78 : Spectres de masse réalisés sur le spectromètre Q-TOF de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine (A) et la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine (B). Pour chaque composé, se trouvent le spectre de masse théorique d'une formule brute donnée (en haut) et le spectre de masse expérimental du composé analysé (en bas). ... 195
Figure 79 : Trois exemples de poly-hydroxyalkyl-pyrazines décrites dans la littérature. 197
Figure 80 : Deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines probablement identifiées dans nos mélanges glutamine/glucose. 198
Figure 81 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS de la 2-(2,3,4-trihydroxybutyl)pyrazine. 199
Figure 82 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS de la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine. 200
Figure 83 : Hypothèses de formation de la 2-méthyl-6-tétrahydroxybutylpyrazine (Hough, *et coll.*, 1952) et de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine. 203
Figure 84 : Formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine en fonction du temps à partir d'un mélange incubé à 120°C composé d'ammoniac et de glucose ; A - additionné de glyoxal à deux concentrations (1 Gx et 2 Gx) ; B - additionné de méthylglyoxal à deux concentrations (1 MG et 2 MG). 205
Figure 85 : Formation de la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine en fonction du temps à partir d'un mélange incubé à 120°C composé d'ammoniac et de glucose ; A -

additionné de glyoxal à deux concentrations (1 Gx et 2 Gx) ; B – additionné de méthylglyoxal à deux concentrations (1 MG et 2MG). 206
Figure 86 : Spectres de masse des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines formées lors de l'incubation d'un mélange composé d'ammoniac et de glucose-^{13}C (A) en présence de glyoxal (B) ou de méthylglyoxal (C). 208
Figure 87 : Cinétiques de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine (185) et de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine (215) en fonction du temps et de la température (70°C, 120°C et 180°C) à pH 5. *Attention : les échelles en abscisses ne sont pas identiques.* . 211
Figure 88 : Formation des ions m/z 185 et m/z 186 dans les mélanges glutamine/glucose (14N) et glutamine-*amine*-^{15}N/glucose (15N)..... 213
Figure 89 : Formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine à partir de la glutamine, l'ammoniac, l'asparagine, l'urée et l'acide glutamique en présence de glucose à un pH initial égal à 5 incubés pendant 2 h à 120°C (analyse LC-MS-MS). 215
Figure 90 : Influence de la nature du sucre sur la formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine (A) et de la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine (B) dans un mélange ammoniac/sucre à pH 5 chauffé pendant 15 min à 180°C. Significativité entre fructose et autres sucres calculée à l'aide du test de Mann-Whitney (**, $p < 0,05$). 218
Figure 91 : A - Analyse chromatographique (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de tomate crue fraîche. B - Spectre MS^2 correspondant au pic chromatographique à 5,4 minutes. 226
Figure 92 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 2 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 6,1 min (B) et 10 min à 180°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 6,2 min (D). 227
Figure 93 : A - Analyse chromatographique (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de sauce Buitoni. B - Spectre MS^2 correspondant au pic chromatographique à 5,2 minutes. 228
Figure 94 : Analyse chromatographique (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de sauce tomate Buitoni chauffée 1 h à 120°C (A). Spectres MS^2 associés aux pics chromatographiques à 5,6 min (B), à 5,9 min (C) et à 6,5 min (D). 229
Figure 95 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de sauce brune Heinz (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 5,4 min (B) et d'un extrait de ketchup (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 5,4 min (D). 230

Figure 96 : Analyse chromatographique d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C en présence de glutamine et de méthylglyoxal (A) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique avec un t_r de 6,8 min (B) et en présence d'ammoniac et de méthylglyoxal (C) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique avec un t_r de 6,8 min (D). 232
Figure 97 : Analyse chromatographique d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C en présence de glutamine (A) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique à 6,9 min (B) et en présence d'ammoniac (C) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique à 6,7 min (D). 234
Figure 98 : Analyse chromatographique d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C en présence de méthylglyoxal (A) avec le spectre MS^2 associé aux pics chromatographiques à 6,8 min (B) et à 6,9 min (C). 235
Figure 99 : Analyses chromatographiques d'un extrait de sauce Buitoni chauffée 1 h à 120°C en présence de glutamine et de méthylglyoxal (A) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique à 8,1 min (B) et en présence de méthylglyoxal (C) avec le spectre MS^2 correspondant au pic chromatographique à 8,2 min (D). 237
Figure 100 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 185) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,7 min (B) et 2 h à 120°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,7 min (D). 238
Figure 101 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 215) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 5,2 min (B) et 2 h à 120°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 5,2 min (D). 239
Figure 102 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 185) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 10 min à 180°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (B) et 10 min à 180°C avec un ajout de glucose (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (D). 240
Figure 103 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 215) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 10 min à 180°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (B) et 10 min à 180°C avec un ajout de glucose (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (D). 241
Figure 104 : Analyse chromatographique d'un extrait de sauce Buitoni non chauffée avec LC-MS-MS sur l'ion m/z 185 (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,6 min (B) et m/z 215 (C). 242

Figure 105 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 185) d'un extrait de sauce Buitoni chauffée 1 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (B) et 2 h à 120°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (D). 243
Figure 106 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 215) d'un extrait de sauce Buitoni chauffée 1 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,5 min (B) et 2 h à 120°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,4 min (D). 244
Figure 107 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 185) d'un extrait de sauce brune (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,8 min (B) et de ketchup (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,7 min (D). 245
Figure 108 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 215) d'un extrait de sauce brune (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,4 min (B) et de ketchup (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,5 min (D). 246
Figure 109 : Teneurs (unités relatives) en 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine dans des extraits de biscuits du commerce contenant de l'hydrogénocarbonate d'ammonium (1 à 8) et des biscuits n'en contenant pas (9 à 11). 249
Figure 110 : Teneurs (unités relatives) en déoxyfructosazine (et son 6-isomère) dans des extraits de biscuits du commerce contenant de l'hydrogénocarbonate d'ammonium (1 à 8) et des biscuits n'en contenant pas (9 à 11). 251
Figure 111 : Formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine et de la déoxyfructosazine (ou son 6-isomère) dans des biscuits modèles en fonction du temps de cuisson. 252
Figure 112 : Spectres de fluorescence d'un mélange composé de glutamine et de méthylglyoxal (rapport molaire des deux substrats 1/2) en milieu tampon phosphate 200 mM à pH 9 incubé 30 min (A) ; 1 h (B) ; 2 h (C) et 4 h (D) à 120°C. 274
Figure 113 : Spectres de fluorescence des mélanges de glutamine/méthylglyoxal (▬) et d'ammoniac/méthylglyoxal (▬) incubés 2 h à 120°C en milieu tampon pH 9. 275

Tableau 1 : pH dans la viande de bœuf, le jambon de Parme, la tomate et le lait de vache. ... 54
Tableau 2 : Acides aminés libres dans quelques matrices alimentaires (en µg/g pour les matrices solides et en µg/mL pour les matrices liquides). 63
Tableau 3 : Gradient d'élution pour l'analyse de la glutamine dans les matrices alimentaires (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps). 94
Tableau 4 : Gradient d'élution pour l'analyse de l'acide pyroglutamique (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps). 97

Tableau 5 : Gradient d'élution pour la purification de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps). 101
Tableau 6 : Paramètres des cinétiques de formation de l'acide pyroglutamique à partir de la glutamine en fonction de la température et du pH d'incubation. 107
Tableau 7 : Paramètres des cinétiques de formation de produits de Maillard mesurée par absorbance à 420 nm et par fluorescence (λ_{ex} = 330 nm et λ_{em} = 450 nm). 119
Tableau 8 : Gradient d'élution pour l'analyse de fluorophores (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps). 125
Tableau 9 : Gradient d'élution pour l'analyse de quatre fluorophores par LC-MS (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps). 134
Tableau 10 : Estimation du nombre d'atomes de carbone pour nos quatre fluorophores. 147
Tableau 11 : Résultats d'analyses en spectrométrie de masse à haute résolution de nos quatre fluorophores. 150
Tableau 12 : Résultats d'analyses en spectrométrie de masse à haute résolution de nos deux molécules. 196
Tableau 13 : Moyennes et écart-type des aires de pics chromatographiques après sélection à partir du TIC des ions m/z 191 et 193 pour la trihydroxybutyl-pyrazine et des ions m/z 221 et 224 pour la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine dans les mélanges composés d'une mole d'ammoniac pour deux moles de glucose-^{13}C additionnés de glyoxal (1 ou 2 moles) ou de méthylglyoxal (1 ou 2 moles) incubés 2 h à 120°C 209
Tableau 14 : Composition de la sauce de tomates fraîches (Buitoni), un ketchup (Top Budget) et une sauce brune (Heinz). 224
Tableau 15 : Liste des biscuits du commerce testés avec leur composition. 248

INTRODUCTION

En matière d'alimentation, la principale demande des consommateurs fut longtemps la disponibilité ainsi que la variété des aliments. Mais depuis une vingtaine d'années, l'assurance d'une bonne qualité et d'une sécurité totale des produits alimentaires apparaît comme une nouvelle exigence. A ce propos, un sondage récent réalisé sur un échantillon représentatif de la population française (Harris Médical Intern., 2004) indique que la sécurité sanitaire est aujourd'hui la principale préoccupation des Français en terme de qualité des aliments. Aujourd'hui, le consommateur est relativement bien informé sur les qualités nutritionnelle et microbiologique des aliments. En revanche, il connaît moins bien l'influence des procédés employés pour l'élaboration des produits alimentaires ou encore les effets de la transformation culinaire, qu'elle soit industrielle ou domestique. Or, l'impact de ces transformations sur la qualité nutritionnelle et la sécurité sanitaire des aliments se révèle être important. Parmi ces procédés, le traitement thermique semble jouer un rôle majeur dans la qualité globale des denrées alimentaires. En effet, il peut dégrader des composés d'intérêt nutritionnel comme les vitamines mais aussi générer des composés nouveaux, appelés composés néoformés, potentiellement toxiques. D'une manière plus positive, le traitement thermique des aliments permet non seulement de réduire la toxicité de certains produits végétaux, d'accroître une certaine qualité sanitaire des aliments, mais aussi d'améliorer leurs qualités organoleptiques. Enfin, il peut augmenter la qualité nutritionnelle des aliments en formant de nouvelles molécules antioxydantes telles que les mélanoïdines, ou en augmentant la biodisponibilité de certains micronutriments comme le lycopène.

Même si la qualité sanitaire des aliments est une préoccupation importante des consommateurs et un devoir des industriels du secteur agro-alimentaire, le premier critère de choix d'un aliment reste la qualité sensorielle. Les composés aromatiques, la couleur et la texture obtenus après traitement thermique des matières alimentaires végétales ou animales proviennent pour une large part de la réaction chimique entre les protéines (ou les acides aminés) et les sucres réducteurs. Cette réaction découverte par Louis Camille Maillard en 1912 porte son nom. Elle est aussi communément appelée « brunissement non enzymatique »

La réaction de Maillard est particulièrement surveillée par les industries agro-alimentaires car elle est à l'origine de modifications importantes de la qualité organoleptique des aliments. Il semble aussi que le problème de sécurité sanitaire que pose la présence de certains produits de Maillard dans l'alimentation est devenu récemment une préoccupation croissante pour les industriels.

C’est tout d’abord l’équipe scientifique d’Helen Vlassara qui a montré que la consommation d’aliments riches en produits de Maillard pouvait être préjudiciable à la santé. Depuis lors, le terme de glycotoxine a été proposé pour définir l’ensemble des produits de Maillard ingérés et potentiellement toxiques.

C’est ensuite la découverte d’une forte concentration d’acrylamide, un carcinogène connu de longue date, dans certains produits dérivés de la pomme de terre qui a suscité une prise de conscience internationale et stimulé la recherche dans le domaine des glycotoxines. Les études les plus récentes confirment que l’asparagine, qui représente à elle seule environ 40% des acides aminés libres totaux de la pomme de terre, est à l’origine de la formation d’acrylamide. Soumis à forte température, cet acide aminé est transformé en acrylamide par réaction de Maillard. D’autres composés néoformés comme les amines hétérocycliques, découvertes depuis plus de 30 ans et classées hautement mutagènes, font encore l’objet d’études portant sur le risque sanitaire associé à leur exposition.

L’identification et la compréhension des mécanismes de formation des composés néoformés de Maillard, ainsi que de leurs effets sur la santé sont aujourd’hui des axes de recherche en plein développement.

Dans ce contexte, il semble important de poser une nouvelle hypothèse : tout comme l’asparagine libre est le principal précurseur de l’acrylamide dans les produits frits de la pomme de terre, **nous postulons que la glutamine libre participe à la formation de composés de Maillard, toxiques ou non, au cours du traitement thermique d’aliments riches en cet acide aminé.** Parmi ceux-ci, citons la tomate qui possède une concentration relativement importante en glutamine libre.

Malgré le fait que la plupart des amines susceptibles de participer à la réaction de Maillard soient portées par les protéines, nous pouvons penser que des acides aminés libres comme la glutamine, bien qu’en faibles concentrations par rapport aux amines protéiques, peuvent contribuer à l’apparition de composés néoformés susceptibles de modifier la qualité globale des aliments.

L’orientation de cette étude a été motivée principalement par la forte ressemblance entre la glutamine et l’asparagine : structures chimiques proches et concentrations élevées dans de nombreuses matrices alimentaires. De plus, la forte instabilité de la glutamine qui conduit à la formation d’ammoniac est certainement à l’origine de la synthèse de nombreux

produits de Maillard. L'implication de l'ammoniac dans la formation de composés volatils a déjà fait l'objet d'investigations importantes. En revanche, la recherche de molécules non volatiles issues de la glutamine ou de l'ammoniac libéré par lactamisation (ou désamination cyclisante) n'a été, à notre connaissance, que peu étudiée.

Notre objectif sera d'une part, d'identifier la structure et les mécanismes de formation des principaux produits de Maillard issus de la réaction entre la glutamine (ou l'ammoniac) et le méthylglyoxal, un composé α-dicarbonylé très réactif de la réaction de Maillard et, d'autre part, d'effectuer la même recherche sur des modèles simples composés de glutamine (ou l'ammoniac) et de glucose, sucre réducteur le plus répandu dans les aliments. Enfin, la découverte de nouveaux produits de Maillard sera partiellement complétée par une recherche de leur présence dans quelques matrices alimentaires riches en glutamine et en ammoniac.

PARTIE I

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : MECANISMES A L'ORIGINE DU BRUNISSEMENT DES ALIMENTS

Depuis la maîtrise du feu, il y a 500 000 ans, la consommation des aliments s'est considérablement diversifiée. De plus, cela a permis à l'homme de découvrir de nouvelles saveurs révélant ainsi le début de la gastronomie. Ces premières cuissons, selon l'anthropologue Carleton Coon, sont « le facteur décisif qui fit passer l'homme d'une existence essentiellement animale à une existence vraiment humaine ».

Cependant, le traitement thermique des aliments génère facilement un brunissement. Celui-ci est généralement souhaité pour des produits sans grande saveur naturelle tels que le pain, les viennoiseries ou le café. A l'inverse, il s'avère indésirable pour des produits tels que les fruits frais découpés, les jus de fruits ou le lait.

Trois types de brunissement ont été décrits dans l'aliment. Tout d'abord, nous pouvons citer le brunissement enzymatique qui est une réaction d'oxydation catalysée par une enzyme. Le second brunissement est la caramélisation qui a lieu lorsque l'on chauffe à haute température des sucres réducteurs en absence de composés aminés. Enfin, le plus répandu est issu d'une réaction entre une amine et un composé carbonylé, autrement dit la réaction de Maillard. Ces trois mécanismes de brunissement sont étudiés dans les paragraphes suivants avec une description plus détaillée de la réaction de Maillard.

I. LE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

Les produits végétaux (fruits et légumes frais) sont soumis au brunissement enzymatique. Des décolorations, l'apparition de goûts désagréables, ainsi que des pertes de texture et de qualité nutritionnelle sont des phénomènes qui sont associés à la conservation de fruits ou légumes coupés, donc exposés à l'oxygène de l'air (Tan & Harris, 1995). Le brunissement enzymatique résulte de l'oxydation des composés phénoliques en quinones par une enzyme, la polyphénoloxydase (PPO). Ces quinones vont ensuite se polymériser pour former des pigments colorés. L'exemple du 4-méthylcatéchol, utilisé comme substrat dans

des modèles simples, est présenté figure 1. Ce brunissement n'a lieu que lorsque le tissu végétal est altéré, comme par exemple la pomme qui brunit après avoir été coupée.

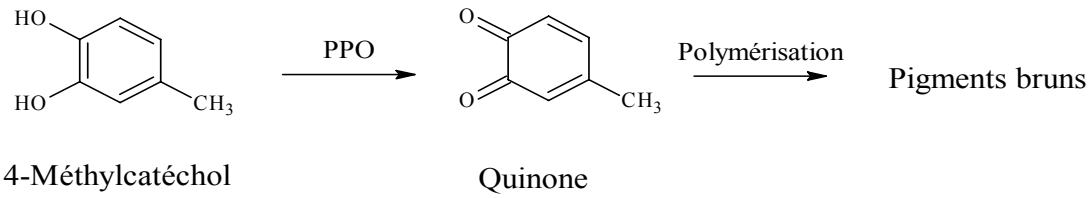


Figure 1 : Brunissement enzymatique du 4-méthylcatéchol.

II. LA CARAMELISATION

La décomposition des sucres conduit à la formation d'une couleur plus ou moins brune et d'arômes. Ce brunissement, appelé plus communément caramélisation, nécessite soit une très forte température (T > 120°C), soit des conditions de pH extrêmes (pH < 3 ou > 9) (Kroh, 1994). De plus, la réaction de caramélisation être fréquemment catalysée par des acides carboxyliques, des sels, des phosphates et des ions métalliques (Hodge, 1953). Elle se développe dans des aliments dont la surface est fortement chauffée. Les produits de caramélisation sont alors retrouvés dans des denrées alimentaires comme le pain, les viennoiseries, la viande grillée, ou les aliments riches en sucres tels que certains jus de fruits (Ledl, 1987). Russev & Kroh ont montré qu'ils se forment aussi lors de l'élaboration du vin (Russev & Kroh, 1993).

Lothar Kroh précise qu'aux pH de la plupart des aliments, la réaction de caramélisation n'est pas prépondérante. La réaction de Maillard qui est favorisée aux pH compris entre 4 et 7, gamme de pH de la plupart des aliments (voir chapitre III : I.3.b, p 54), est alors privilégiée.

Comme exemple de composé issu de la caramélisation et retrouvé dans les aliments, nous pouvons citer le 5-hydoxyméthylfurfural (HMF) qui est l'un des principaux produits de dégradation du glucose (Ait-Ameur*, et coll.*, 2006) notamment en milieu acide. Le schéma de formation de l'HMF à partir du glucose seul est représenté dans la figure 2. Cependant cette molécule n'est pas spécifique de la caramélisation et peut également être formée par réaction de Maillard.

Il est en fait très difficile de définir ce qu'est la caramélisation sauf lorsqu'il n'y a pas d'amines dans le milieu.

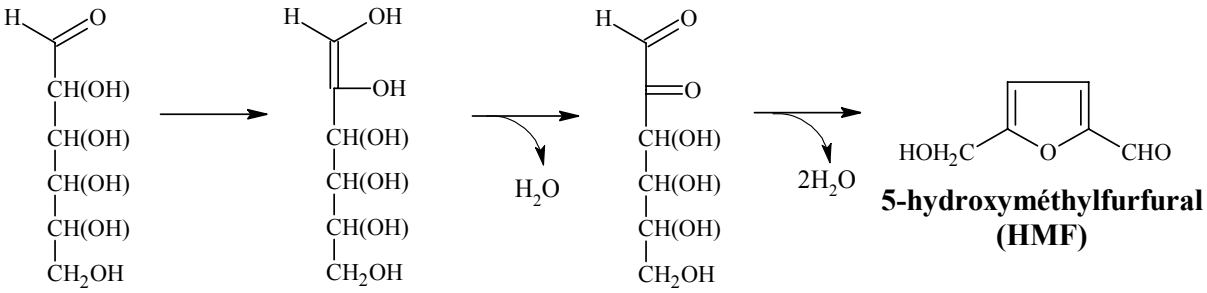


Figure 2 : Formation du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) par déshydratation du glucose.

La couleur brune, caractéristique de la caramélisation, peut également être attribuée à la formation de polymères tels que celui de l'HMF présenté dans la figure 3 (Kroh, 1994).

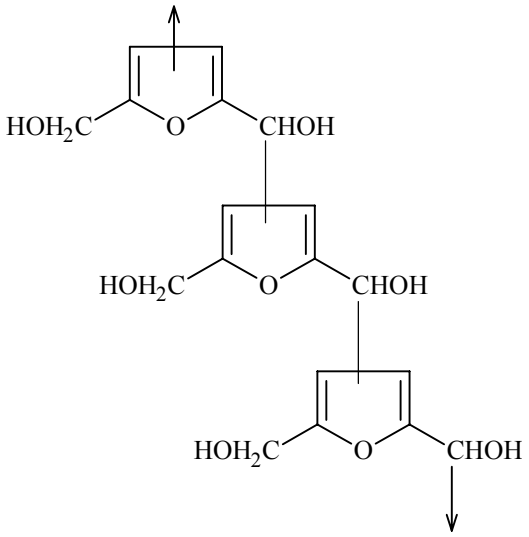


Figure 3 : Polymérisation de l'HMF (d'après Kroh, 1994).

III. LA REACTION DE MAILLARD

C'est en 1912 que Louis Camille Maillard, chimiste français, a découvert que la réaction à haute température entre des sucres réducteurs et des acides aminés conduit au développement d'une coloration brune (Maillard, 1912). A l'origine, ses recherches portaient essentiellement sur le rôle des alcools dans la synthèse naturelle de protéines dont il espérait découvrir la structure. En remplaçant le glycérol, qui était alors utilisé comme agent de condensation des protéines, par une molécule plus complexe et répandu chez les êtres vivants, le D-glucose, il découvrit que la fonction réductrice du sucre (C=O) prévalait sur la fonction hydroxyle (OH). Pour faciliter sa dissolution il chauffa un mélange glycine/glucose, le glucose se trouvant en excès, et observa ainsi la formation d'une coloration. Celle-ci s'accentua en passant du jaune au brun foncé en quelques minutes. Cette observation correspond en fait à un ensemble de réactions complexes menant à la formation de composés colorés et/ou fluorescents, puis à des mélanoïdines formées par polymérisation.

Finalement c'est seulement en 1953 que l'on voit paraître une publication qui décrit la chimie des différentes réactions de brunissement (Hodge, 1953). Aujourd'hui, celui-ci sert encore de schéma général pour présenter la réaction de Maillard.

Cette réaction, aujourd'hui connue des professionnels du secteur alimentaire, est finalement la première cause du brunissement des aliments chauffés. Les industries agro-alimentaires s'y intéressent tout particulièrement car cette réaction conditionne fortement la formation d'arômes et le développement de textures croustillantes.

La réaction est principalement dépendante du temps de traitement thermique, de la température, du pH, de l'activité de l'eau et de la composition des aliments (concentration des substrats de la réaction). Ces paramètres ont été largement étudiés sur des modèles simples d'acides aminés. Nous reviendrons en détail sur les principaux facteurs de la réaction de Maillard dans le chapitre III : I (p 47).

La réaction de Maillard se décompose arbitrairement en quatre étapes (figure 4). Une première étape (étape initiale) met en jeu un acide aminé et un sucre réducteur (aldose ou cétose) pour former le produit d'Amadori (cétosamine) ou de Heyns (aldosamine). La seconde étape (étape de propagation) conduit à la formation de petites molécules dicarbonylées et de réductones respectivement par scission ou par déshydratation modérée du produit d'Amadori ou de Heyns. L'étape suivante de la réaction de Maillard (étape avancée) conduit à la formation de divers composés aromatiques et d'aldéhydes de Strecker. Cette étape donne aussi lieu à la formation de furfurals comme le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) par déshydratation forte du produit d'Amadori ou de Heyns, ainsi que d'autres produits avancés de la réaction de Maillard, en anglais Advanced Glycation End products (AGEs) tels que la carboxyméthyllysine (CML) ou la pyrraline. Enfin, la dernière étape conduit à la formation de polymères bruns : les mélanoïdines.

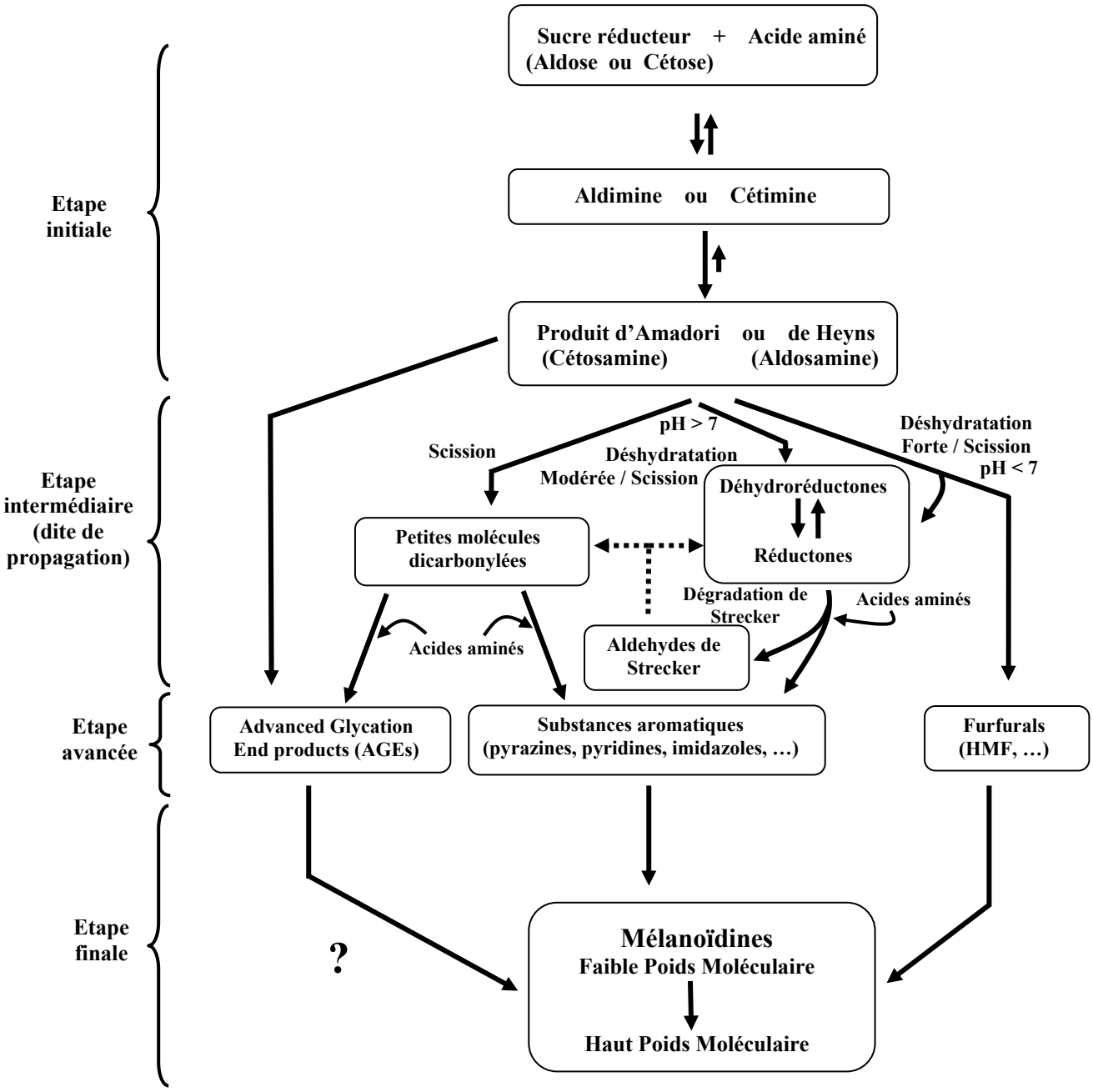


Figure 4 : Schéma global de la réaction de Maillard (synthèse des schémas établis par Hodge (1953) ; Finot & Furniss (1989) ; Faist & Erbersdobler (2001)).

1. Etape initiale

La première étape (figure 5) est une réaction de condensation entre un sucre réducteur (aldose ou cétose) sur une fonction amine primaire d'un acide aminé conduisant à la formation d'une imine anciennement appelée base de Schiff (molécule instable). Dans le cas d'un aldose tel que le glucose, l'imine est appelée aldimine et dans le cas d'un cétose comme le fructose, on parle de cétimine. Cette réaction est réversible et un milieu acide favorise la régénération de l'acide aminé et du sucre réducteur. Cependant, une étape irréversible (réarrangement) conduit à la formation de produits stables, les produits d'Amadori aussi appelés cétosamines (lorsqu'un aldose est mis en jeu) ou de Heyns aussi appelés aldosamines (lorsqu'un cétose est mis en jeu). Ces produits ne sont pas responsables de la couleur ou des arômes mais réduisent la disponibilité d'acides aminés essentiels dans tous les aliments où la réaction a lieu. L'amine primaire réactive provient soit d'un acide aminé libre, soit d'un peptide issu d'une hydrolyse partielle des protéines, soit d'une protéine. Sur cette dernière, les acides aminés basiques (lysine ou arginine) possédant une amine libre sur la chaîne latérale sont principalement affectés. Les acides aminés N-terminaux des protéines sont également touchés par la réaction de Maillard. Dans ces deux derniers cas, on parle de protéines glyquées (protéines modifiées par glycosylation non enzymatique).

La première protéine glyquée décrite n'a pas été détectée dans une matrice alimentaire mais dans des globules rouges humains. C'est en 1969 que Rhabar*, et coll.* ont découvert par analyse sur gel d'électrophorèse une protéine correspondant à l'hémoglobine mais avec une migration électrophorétique légèrement différente. Cette protéine, appelée hémoglobine HbA1c, correspond à une hémoglobine glycosylée par réaction de Maillard sur la fonction N-terminal de la valine de la chaîne β.

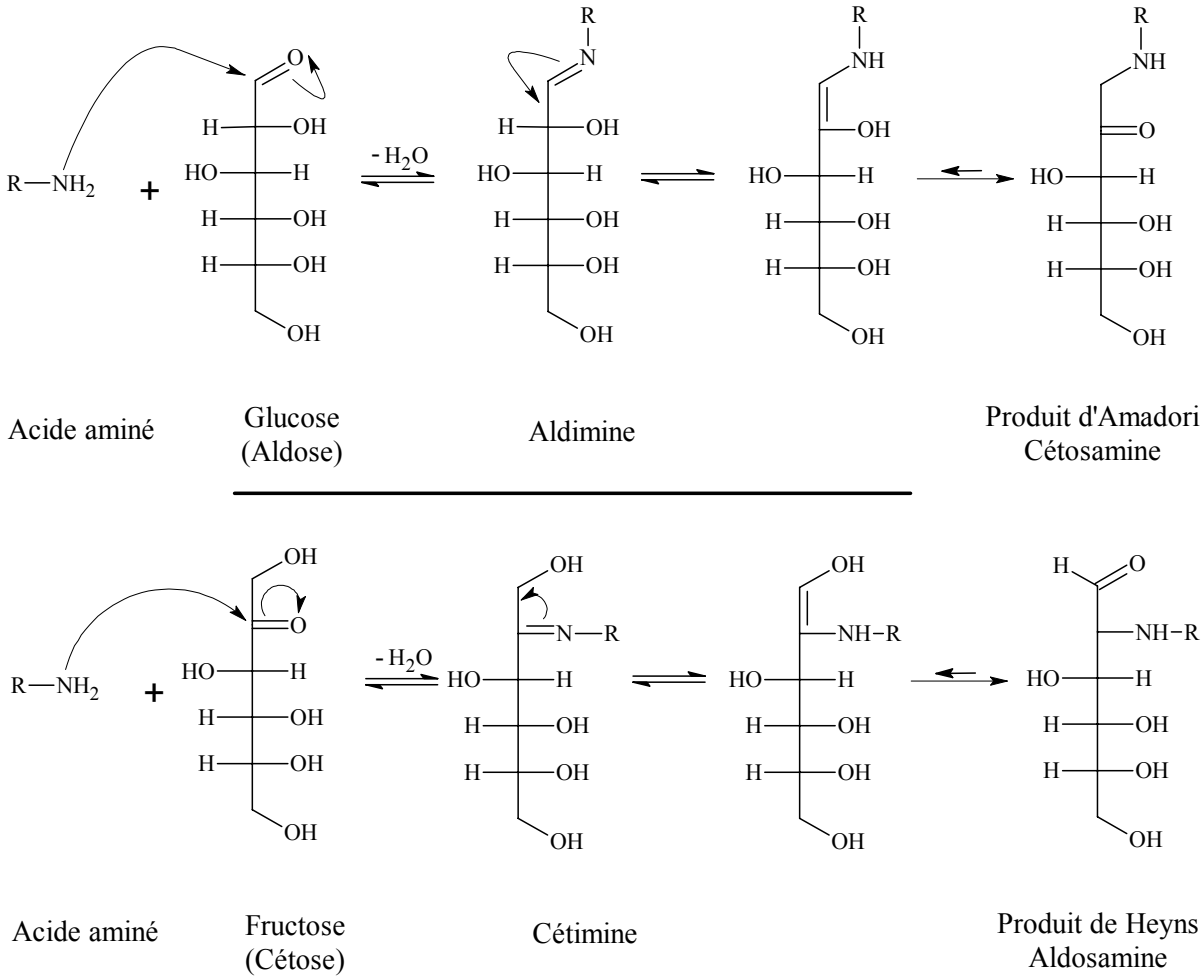


Figure 5 : Formation du produit d'Amadori à partir d'aldose et du produit de Heyns à partir de cétose (première étape de la réaction de Maillard).

2. Etape de propagation et avancée

Un chauffage en milieu neutre ou acide conduit aussi à la formation de réductones qui participent ensuite à la dégradation de Strecker. La perte de deux molécules d'eau supplémentaires forme des furfurals tels que l'hydroxyméthylfurfural (HMF) dans le cas des hexoses (figure 6). Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre I : II, p 26), l'HMF est un exemple de composé néoformé dans l'aliment qui peut avoir deux origines : la réaction de Maillard et la caramélisation.

En milieu basique, une déshydratation modérée (énolisation-2,3) des produits de réarrangement est favorisée (figure 6). Les réductones ainsi formées, par dégradation de Strecker, conduisent à la formation d'aminocétones et aldéhydes de Strecker. Après condensation, les aminocétones forment des substances aromatiques telles que des pyrazines, des pyridines. Quant aux aldéhydes de Strecker, ils peuvent ensuite réagir à nouveau avec des acides aminés et participer à la formation de nouveaux produits de Maillard.

Enfin, une coupure des cétosamines et aldosamines peut conduire à la formation de petites molécules dicarbonylées telles que la 2,3-butanedione, le méthylglyoxal et le glyoxal. Ces molécules, hautement réactives, sont aussi appelées propagateurs de la réaction. En présence d'acides aminés, elles conduisent à la formation de composés aromatiques mais aussi d'AGEs comme la carboxyméthyllysine.

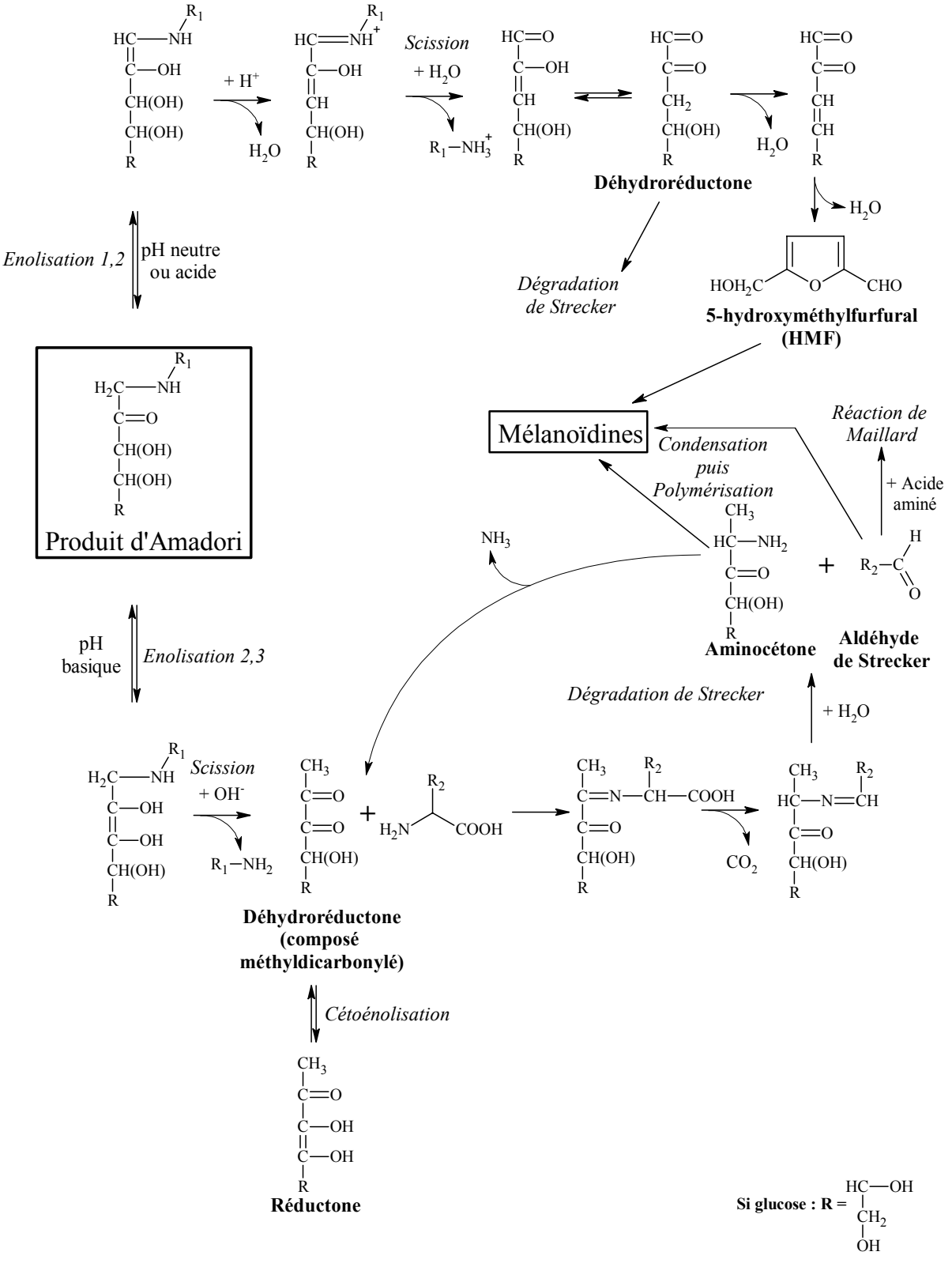


Figure 6 : Déshydratation en milieu acide et basique des produits d'Amadori (Hodge, 1953 ; Machiels & Istasse, 2002 ; Perrotin, 2004).

3. Etape finale

La dernière étape conduit à la formation de mélanoïdines. Les mélanoïdines représentent un mélange hétérogène de composés caractérisés par leur couleur brune et leur haut poids moléculaire allant jusqu'à 100 000 Da. De nombreuses études ont entrepris d'isoler et de purifier les mélanoïdines provenant de différentes matrices alimentaires telles que le café, la sauce au soja, le malt torréfié ou encore la bière. Cependant, les études sont assez limitées en raison de leur faible solubilité (Borrelli & Fogliano, 2005). Concernant les mélanoïdines issues du pain, une digestion enzymatique a permis de surmonter ce problème (Borrelli & Fogliano, 2005).

Malgré les efforts engagés, les structures ainsi que les mécanismes de formation des mélanoïdines restent encore peu connus. A ce jour, trois propositions de structures ont été faites pour décrire les mélanoïdines. 1 - Hofmann a détecté des composés colorés de faible poids moléculaire capables de se lier aux protéines via les groupements ε-NH_2 des lysines et arginines qui produiraient ensuite des mélanoïdines de haut poids moléculaire (Hofmann, 1998). 2 - D'autres auteurs proposent que les mélanoïdines seraient des polymères comprenant des motifs furanes et/ou pyrroles (Heyns & Hauber, 1970 ; Tressl*, et coll.*, 1998). 3 - Enfin, Kato et Tsuchida (1981) et plus récemment Cämmerer*, et coll.* (1995 et 2002) suggèrent que le squelette des mélanoïdines est principalement composé de produits de dégradation des sucres, formés dans l'étape précoce de la réaction de Maillard puis polymérisés et liés aux composés aminés (Kato & Tsuchida, 1981 ; Cämmerer & Kroh, 1995 ; Cämmerer*, et coll.*, 2002).

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

CHAPITRE II : PROPRIETES DES PRODUITS ISSUS DE LA REACTION DE MAILLARD

Dans ce chapitre, nous allons voir comment les produits générés par la réaction de Maillard affectent les qualités organoleptiques, la texture ainsi que les qualités nutritionnelles et sanitaires des aliments.

I. QUALITE ORGANOLEPTIQUE

La réaction de Maillard constitue une voie importante de formation d'arômes et de flaveurs. Leur formation dépend de nombreux facteurs que l'on peut regrouper en deux catégories. D'une part, le type de sucre réducteur et acide aminé engagés dans la réaction de Maillard détermine le type de flaveurs formées et, d'autre part, le couple temps/température, le pH et l'activité d'eau du milieu influencent la cinétique de formation de ces composés (Jousse*, et coll.*, 2002). Parmi ces composés, citons les pyrazines et furanes retrouvés dans la plupart des aliments chauffés, les alkylpyridines dans le café et le malt, les pyrroles dans les céréales, les oxazoles dans le cacao, la viande et le café, et les thiophènes dans la viande chauffée (figure 7) (van Boekel, 2006).

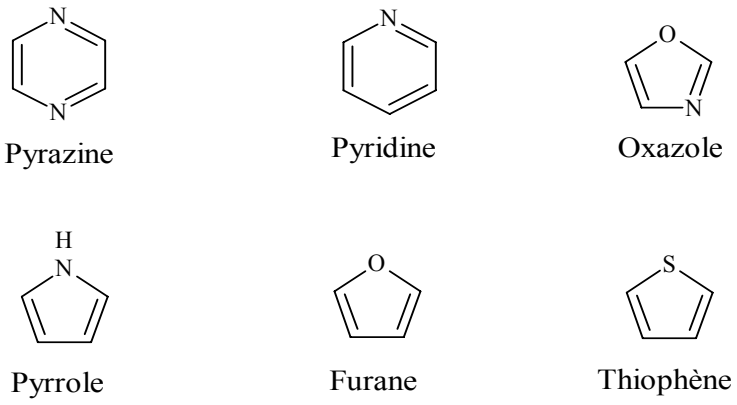


Figure 7 : Quelques familles de flaveurs trouvées dans les aliments.

Ces arômes ainsi formés donnent aux aliments des propriétés que les industriels se doivent d'étudier en détail afin d'en maîtriser au mieux la formation. C'est le cas des pyrazines qui ont été largement étudiées ces dernières années (Maga, 1982). C'est sans doute sur cet aspect organoleptique de la réaction de Maillard que les industriels du secteur agro-alimentaire ont le plus travaillé depuis les 40 dernières années.

II. TEXTURE

La texture des aliments solides inclut l'ensemble des propriétés mécaniques, géométriques et de surface d'un produit perceptibles par l'homme grâce à des mécanorécepteurs, des récepteurs tactiles, des récepteurs visuels et auditifs (Colonna, 2002).

L'appréciation des aliments est pour une large part déterminée par une perception sensorielle du produit. Comme les consommateurs sont confrontés à une large gamme de produits qui ne cesse de croître, le rôle de cette appréciation sensorielle devient essentiel pour les industries agro-alimentaires (Wilkinson*, et coll.*, 2000). Parmi les propriétés sensorielles d'un produit, on retrouve la texture. Cette propriété est influencée par la réaction de Maillard (Gerrard & Brown, 2002). Il est établi que des pontages inter protéiques affectent la texture des aliments ; citons en particulier le pain et les croissants (Gerrard*, et coll.*, 1998 ; Gerrard*, et coll.*, 2000 ; Gerrard*, et coll.*, 2001).

III. PERTE DE QUALITE NUTRITIONNELLE DES ALIMENTS ASSOCIEE A LA REACTION DE MAILLARD

A côté des nombreux avantages recherchés au travers du traitement thermique (formation d'arômes, conservation des aliments plus longue, …), il entraîne incontestablement une baisse de la qualité nutritionnelle.

Au cours de la réaction de Maillard, les chaînes latérales de plusieurs acides aminés sont modifiées de manière irréversible, entraînant une indisponibilité des acides aminés pour

l'organisme lorsqu'ils sont essentiels, il en résulte une perte de valeur biologique de la protéine. A cela s'ajoute une diminution de la digestibilité des protéines.

En raison de sa forte réactivité, la lysine est souvent le premier acide aminé affecté par la réaction de Maillard. La glycation de cet acide aminé essentiel a été largement étudiée au cours de la transformation industrielle de matrices alimentaires telles que le lait, et correspond vraisemblablement à la principale cause de perte de qualité nutritionnelle des protéines dans les aliments chauffés (Mauron, 1981).

La réduction de la digestibilité des protéines modifiées par réaction de Maillard est aussi impliquée dans la perte de qualité nutritionnelle des aliments. Rerat*, et coll.* (2002) ont montré que chez le porc une ingestion de protéines modifiées par réaction de Maillard affectait non seulement la digestibilité de la lysine mais aussi, dans une moindre mesure, celle d'autres acides aminés tels la phénylalanine, la cystéine, l'acide aspartique et la glycine (Rerat*, et coll.*, 2002). Plus récemment, une étude clinique réalisée sur des adolescents de 11 à 14 ans a confirmé que la consommation d'aliments riches en produits de la réaction de Maillard (PRM) altérait la digestibilité des protéines (Seiquer*, et coll.*, 2006). Enfin, en nutrition pédiatrique et clinique, la faible digestibilité des hydrolysats de protéine modifiés par réaction de Maillard a été observée (Finot, 2005b).

Même s'il est admis que la modification des acides aminés essentiels et la réduction de digestibilité des protéines sont les deux principales causes de la perte de valeur nutritionnelle après consommation d'aliments transformés, imputable à la réaction de Maillard, certains auteurs suggèrent que l'influence des PRM sur le métabolisme des minéraux (Delgado-Andrade*, et coll.*, 2005) pourraient également participer aux effets observés sur l'intégrité de la flore digestive et sur l'activité de différentes enzymes (Wenzel*, et coll.*, 2002).

Pour les épidémiologistes, les apports protéiques des enfants et des adultes des pays industrialisés sont très supérieurs aux besoins. On peut donc estimer que l'excès de protéines compense largement la perte de qualité nutritionnelle des protéines alimentaires. De plus la diversité alimentaire recommandée par tous les nutritionnistes devrait aussi permettre de s'affranchir du problème de perte en acides aminés essentiels. Seuls les régimes alimentaires monotones, limités à la consommation de quelques aliments, méritent une surveillance de la qualité nutritionnelle. C'est le cas des nutritions pédiatrique et clinique avec respectivement les formules infantiles à base de lait et les solutions nutritives entérales ou parentérales.

IV. IMPACT DE LA REACTION DE MAILLARD SUR LA SANTE

Nous venons de voir comment la réaction de Maillard pouvait induire des changements de qualité nutritionnelle des aliments soumis à un traitement thermique. Mais l'apparition de composés néoformés (CNF) issus principalement de la réaction de Maillard pose aujourd'hui la question du contrôle de la qualité sanitaire des aliments transformés.

Les CNF auraient un impact sur la santé humaine. Dans un premier temps, nous allons voir dans ce chapitre quels sont leurs effets néfastes supposés ou avérés. Puis nous verrons qu'il ne faut pas minimiser les effets bénéfiques de décontamination des denrées alimentaires induite par la réaction de Maillard. Trois exemples seront détaillés en fin de chapitre.

1. Effets néfastes des produits de Maillard sur la santé

Nous savons aujourd'hui que l'exposition aux CNF n'est pas négligeable. L'étude ICARE montre que l'exposition journalière aux principaux CNF des denrées alimentaires varie entre quelques microgrammes pour certaines molécules (acrylamide, furane…) et plusieurs dizaines de milligrammes pour d'autres (CML, FL, …). Si l'on se réfère au principe de TTC (Threshold of Toxicological Concern) utilisé par le comité sur les additifs alimentaires de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'Organisation Mondiale de la Santé, il apparaît fondamental d'évaluer le potentiel toxique des CNF alimentaires dont les apports alimentaires sont supérieurs au TTC (1,5 µg/personne/jour) (Kroes*, et coll.*, 2000). Précisons que ces organismes appliquent le principe de TTC à des molécules aussi variées que les pesticides, les métaux lourds, les solvants, les additifs alimentaires et autres molécules de faibles poids moléculaires telles que l'acrylamide.

L'étude de la toxicité des produits de Maillard n'est pas récente, puisque dès 1959, Krug*, et coll.* avaient mesuré des « Doses Létales 50 » pour des composés néoformés issus de différents mélanges d'acides aminés libres et de glucose (Krug*, et coll.*, 1959 ; Adrian, 1974). Il s'en est suivi une recherche importante, en particulier sur la toxicité des CNF tels que les amines hétérocycliques, les furanes et les pyrazines (figure 8). D'autres cycles aromatiques non issus de la réaction de Maillard tels que les nitrosamines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont également été largement étudiés (figure 8).

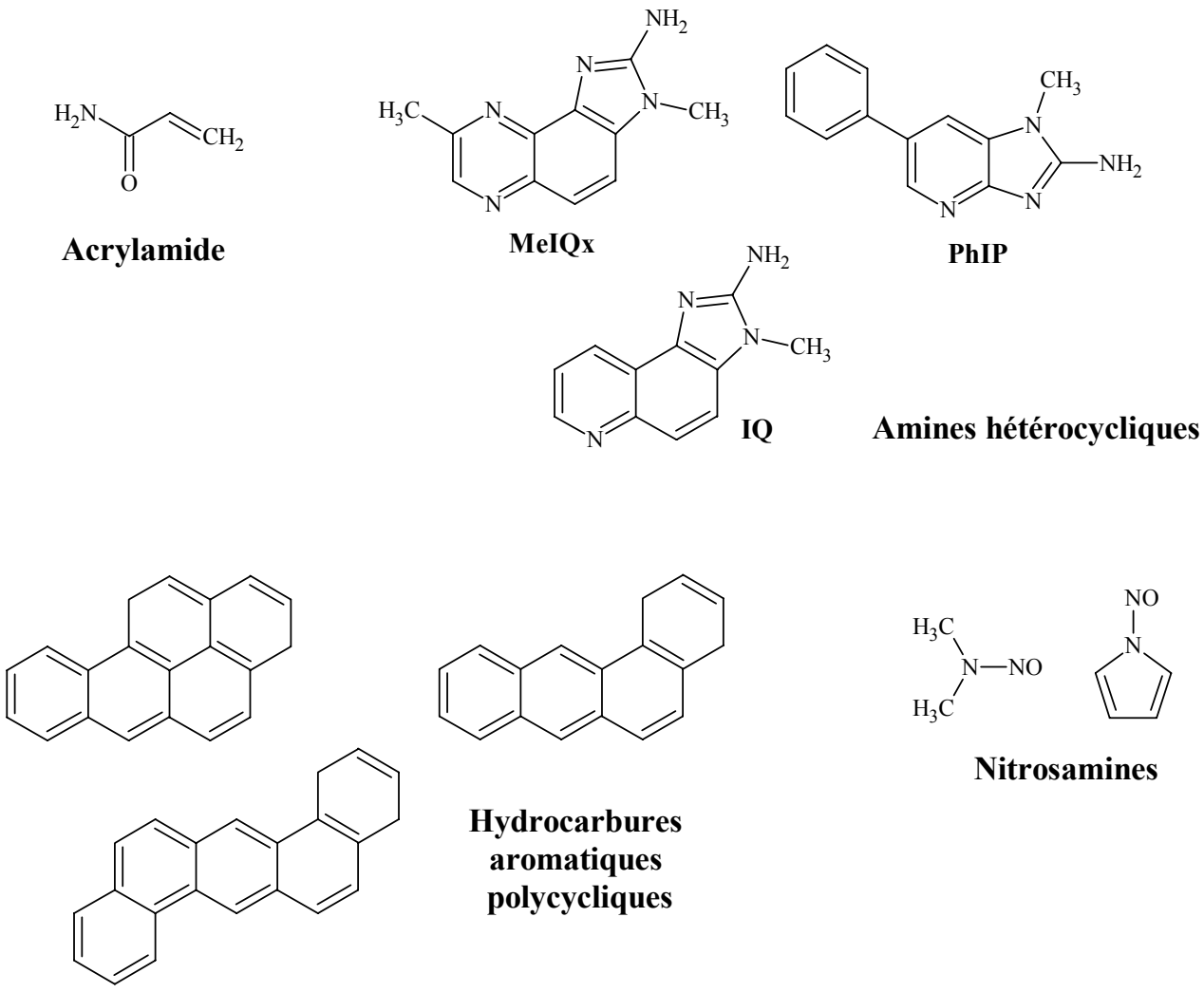


Figure 8 : Quelques exemples de composés potentiellement cancérigènes formés par chauffage et cuisson d'aliments (Jagerstad & Skog, 2005).

Dans les années 1960-70, l'intérêt est essentiellement porté sur ces deux classes de composés toxiques alimentaires. Les HAP et les nitrosamines sont notamment formés au cours du séchage, grillage, raffinage et fermentation, mais sont aussi présents dans la pollution atmosphérique. Il convient de préciser que les HAP sont présents dans les matrices alimentaires soit après adsorption des fumées de combustion soit après carbonisation des aliments surcuits. A la fin des années 1970, les amines hétérocycliques, composés hautement mutagènes, sont identifiées dans la viande et le poisson grillés. Les amines hétérocycliques qui sont formées par réaction de Maillard sont 100 à 100 000 fois plus mutagènes que les

HAP et les nitrosamines (Nagao*, et coll.*, 1977). Parmi ces amines hétérocycliques, nous présentons l'imidazoquinoline (IQ), la 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) et la 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) dans la figure 8 (Yoshida*, et coll.*, 1984 ; Jagerstad & Skog, 2005).

Enfin, l'acrylamide est un exemple de CNF détecté très récemment dans diverses denrées alimentaires par l'administration nationale suédoise de l'alimentation (SLV) (Tareke*, et coll.*, 2002) (figure 8). La toxicité de ce contaminant néoformé est un nouveau sujet de préoccupation. Elle fait l'objet d'investigations importantes, et l'impact santé d'une consommation d'aliments riches en acrylamide est actuellement surveillé. Cependant, à ce jour, il n'est toujours pas prouvé que l'acrylamide, aux doses présentes dans les aliments, puisse être associé à un risque de toxicité et de survenue de cancer (Tritscher, 2004). Retenons simplement que cette molécule est classée par le CIRC (Centre International de Recherche contre le Cancer) comme étant probablement cancérigène pour l'homme (Classe 2A).

Une recherche internationale rapidement mise en place a permis de découvrir que l'asparagine, acide aminé présent sous forme libre dans certains aliments, était à l'origine de leur contamination par l'acrylamide. Nous verrons dans le chapitre III : III (p 63) que l'asparagine est transformée en acrylamide par réaction de Maillard. Il est intéressant de noter dès à présent que la dégradation d'un acide aminé libre, même présent à faible concentration dans une matrice alimentaire, peut générer des molécules toxiques.

D'autres CNF, les AGEs, ont tout d'abord été découverts dans les milieux biologiques (plasmas, urines et tissus riches en protéines à longue durée de vie telles que le collagène, les protéines du cristallin) (Rhabar, 2005). Ces molécules formées par réaction de Maillard à 37°C ont également été identifiées dans des aliments ayant subi des traitements thermiques plus importants (Finot, 2005a). C'est le cas de la carboxyméthyllysine qui a été découverte aussi bien dans des milieux biologiques (Ahmed*, et coll.*, 1986) que dans des aliments chauffés. Depuis près de dix ans, l'équipe d'Helen Vlassara a porté ses recherches sur l'observation du lien qui pouvait exister entre la consommation d'aliments riches en AGEs et autres CNF et le risque de complications métaboliques. A l'aide d'une technique ELISA initialement mise au point pour quantifier les AGEs du sérum humain (Mitsuhashi*, et coll.*, 1997), ces chercheurs ont testé différents aliments ou régimes plus ou moins riches en CNF, sur cultures cellulaires, sur modèles animaux et sur l'homme. Après avoir découvert certains effets délétères des CNF exogènes, Helen Vlassara a renommé les plus réactifs d'entres eux –

méthylglyoxal, 1-, 3-deoxyglucosone et autres dicarbonyles – *glycotoxines* (Vlassara, 2005). Ces composés sont en effet soupçonnés altérer les protéines tissulaires par glycoxydation et de contribuer à la formation de nouveaux AGEs *in vivo*. Il a ensuite été invoqué par les mêmes chercheurs que la reconnaissance des CNF par des récepteurs cellulaires (RAGEs) contribuait également à la toxicité de ces molécules. Enfin le terme de *glycotoxines* a finalement été repris pour définir, peut-être à tort, l'ensemble des CNF alimentaires.

Les études de restriction en CNF alimentaires ont toutes montré une baisse significative de la concentration d'AGEs plasmatiques. Ceci a été vérifié sur des animaux diabétiques (Zheng*, et coll.*, 2002), sur des patients diabétiques non urémiques (Vlassara*, et coll.*, 2002), et sur des patients urémiques non diabétiques (Uribarri*, et coll.*, 2003). Cette baisse du taux circulant d'AGEs est associée systématiquement à un ralentissement de l'évolution délétère de la pathologie étudiée. Sur un modèle de souris diabétiques, il a été montré qu'un régime riche en CNF était associé à l'aggravation de l'athérosclérose (Lin*, et coll.*, 2002 ; Lin*, et coll.*, 2003) et de la néphropathie (Zheng*, et coll.*, 2002), ainsi qu'à une mauvaise cicatrisation (Peppa*, et coll.*, 2006). Sur ce même modèle animal, une baisse du HDL-cholestérol et une augmentation de la résistance à l'insuline semblent résulter de la forte exposition aux CNF alimentaires (Hofmann*, et coll.*, 2002). Encore plus étonnant, la résistance à l'insuline induite par un régime hyper-lipidique et riche en produits de Maillard chez des souris saines apparaît fortement inhibée lorsque le même régime hyper-lipidique est réduit en produits de Maillard (Sandu*, et coll.*, 2005). Cette étude indique qu'un apport important de CNF associé à une alimentation riche en lipides serait impliqué dans la genèse de l'insulino-résistance et du diabète de type II.

Chez des sujets diabétiques ou insuffisants rénaux, l'équipe de Vlassara a montré que la consommation d'aliments riches en CNF était liée à des taux élevés de deux marqueurs d'inflammation, la protéine C Réactive et le TNF-α (Vlassara*, et coll.*, 2002 ; Uribarri*, et coll.*, 2003). Ceci confirme l'implication de l'exposition aux CNF dans les complications vasculaires du diabète.

L'étude clinique ICARE, réalisée en 2006 sur 62 jeunes volontaires sains, est la première à mettre en évidence les effets bénéfiques d'une alimentation pauvre en AGEs et autres composés néoformés. Les résultats de cette étude (non publiés) indiquent qu'une exposition limitée en CNF réduit leur concentration plasmatique et urinaire, et diminue significativement la triglycéridémie et l'insulinémie à jeun. Il est intéressant de préciser que le

facteur HOMA est significativement abaissé et que la glycémie à jeun l'est aussi bien que de manière non significative.

2. Les mélanoïdines : leur pouvoir antioxydant et leur action prébiotique

Nous venons de voir des effets négatifs de la réaction de Maillard associés à l'ingestion de CNF. Cependant, des contre-exemples existent. Par exemple la formation de produits terminaux de la réaction de Maillard semble paradoxalement avoir un effet bénéfique sur la qualité nutritionnelle des aliments.

En effet, il a été montré que les mélanoïdines et les produits de Maillard de faible poids moléculaire ont des propriétés antioxydantes (Lee & Shibamoto, 2002). Cette activité antioxydante est le résultat de nombreux mécanismes tels que la chélation des métaux de transition, la destruction des hydroperoxydes et la neutralisation des radicaux libres (Bersuder & Hole, 2002).

De plus, les mélanoïdines semblent se comporter comme des fibres alimentaires au cours de la digestion. Leur faible digestibilité et absorption dans la partie haute du tractus digestif les rendent disponibles pour une métabolisation par la flore bactérienne du colon. Des études récentes indiquent que certaines mélanoïdines pourraient favoriser le développement de bactéries intestinales dites « bénéfiques » au profit de bactéries pathogènes. En d'autres termes, les mélanoïdines seraient des prébiotiques au même titre que les fibres (Borrelli*, et coll.*, 2004 ; Borrelli & Fogliano, 2005). Cependant, contrairement à certains résultats d'études *ex vivo* (Ames*, et coll.*, 1999), l'étude clinique ICARE semble indiquer que la consommation plus ou moins importante d'aliments fortement chauffés n'aurait aucun effet sur le développement de la flore digestive du sujet sain.

3. Effets détoxifiants des produits de Maillard

La réaction de Maillard peut aussi améliorer la qualité sanitaire des aliments en supprimant la toxicité de certaines molécules.

Prenons le cas d'une mycotoxine, la fumonisine B_1. Il s'agit d'un contaminant fongique présent très abondamment dans les aliments à base de maïs. Aujourd'hui, cette

mycotoxine, classée comme potentiellement cancérigène pour l'homme (classe 2B), pose un véritable problème de sécurité alimentaire. Une étude réalisée par administration de fumonisine B_1 chez le rat montre que le prétraitement de cette mycotoxine à 80°C en présence de fructose élimine toute toxicité (Lu, *et coll.*, 1997). Une deuxième expérience réalisée sur du maïs montre que 50% de la fumonisine B_1 est modifiée par glycation lorsque la céréale est chauffée à 80°C pendant 2 jours en présence d'un excès de glucose (Lu, *et coll.*, 2002). Ces deux études indiquent que la réaction de Maillard induite sur la fumonisine B_1 par des hexoses serait responsable de la détoxification observée. Il a été montré que le groupement amine de la fumonisine B_1 était indispensable au maintien du pouvoir toxique à cette mycotoxine (Gelderblom, *et coll.*, 1993). Et c'est vraisemblablement en modifiant et en bloquant cette fonction amine primaire que la réaction de Maillard permet de détoxifier cette mycotoxine dans les aliments à base de maïs (figure 9).

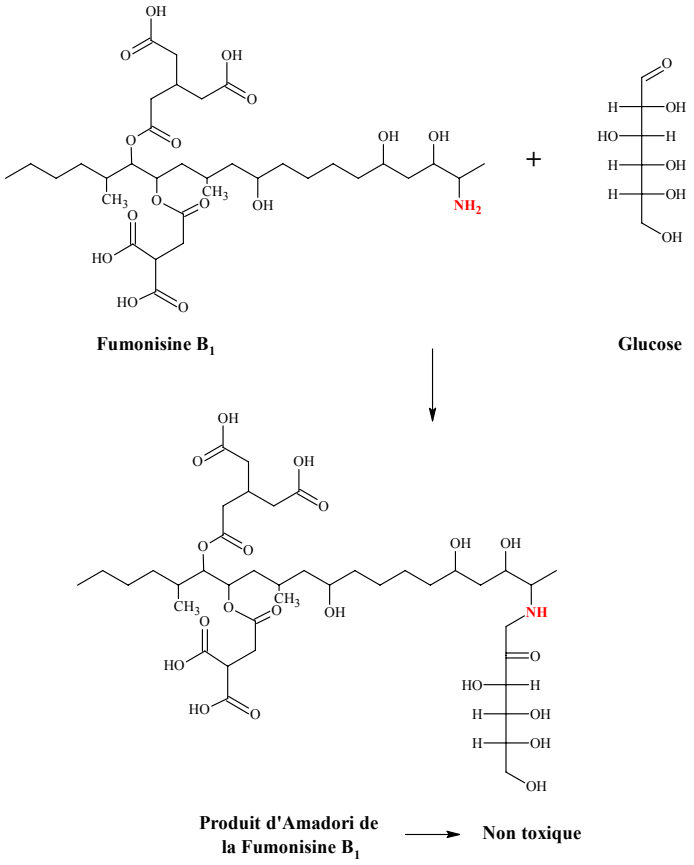
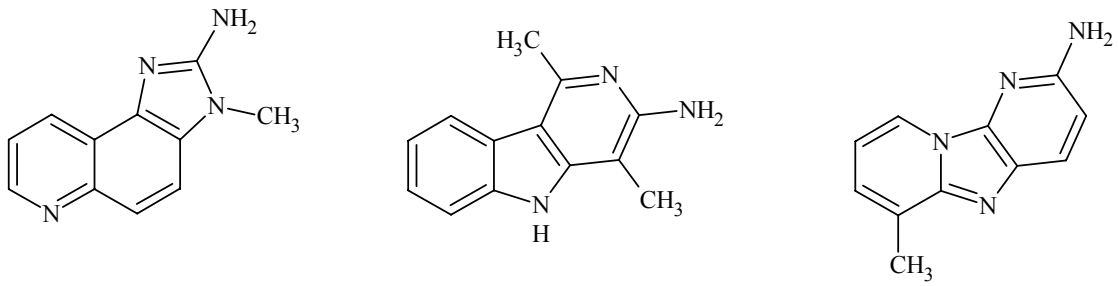


Figure 9 : Schéma de réaction entre la fumonisine B_1 et le glucose conduisant à sa détoxification.

Nous pouvons aussi citer un deuxième exemple d'effet positif de la réaction de Maillard sur la qualité sanitaire des aliments : les effets antimutagènes de certains produits de Maillard sur des amines hétérocycliques.

Yen*, et coll.* (1992) ont étudié les effets antimutagènes des produits de Maillard préparés à partir de trois sucres (fructose, glucose et xylose) et quatre acides aminés (arginine, glycine, lysine et tryptophane) chauffés à 100°C pendant 10 heures. Pour chaque mélange testé, aucune activité mutagène propre n'est observée. Par contre, la plupart des produits de Maillard préparés, notamment issus des combinaisons sucres/tryptophane et xylose/acides aminés, inhibent fortement l'activité mutagène de trois amines hétérocycliques (IQ, Trp-P-1, Glu-P-1) (figure 10).



IQ **Trp-P-1** **Glu-P-1**

Figure 10 : L'effet mutagène de ces trois amines hétérocycliques inhibé par des mélanges sucres/tryptophane et xylose/acide aminés (Yen*, et coll.*, 1992).

Cependant, les produits de Maillard issus des mélanges fructose/glycine et fructose/arginine augmentent l'activité mutagène de Trp-P-1. En conclusion de cette étude les auteurs suggèrent que, selon leur structure chimique, les produits de Maillard pourraient avoir soit des propriétés antimutagènes soit des propriétés co-mutagènes.

Enfin, plus récemment, deux autres exemples de décontamination ou de réduction de l'allergénicité d'un aliment ont été publiés. Suyama*, et coll.* (2007) ont montré que l'activité infectieuse de la protéine prion pouvait être réduite (environ de 5,9 log) par la réaction de Maillard en présence de glucose. Et Del Castillo*, et coll.* (2007) ont présenté très récemment une réduction de l'allergénicité des protéines du soja par glycation.

CHAPITRE III : IMPLICATION DES ACIDES AMINES LIBRES DANS LA REACTION DE MAILLARD

Nous avons vu qu'une protéine qui se trouve modifiée par la réaction de Maillard voit sa structure chimique altérée, pouvant entraîner des modifications de qualité nutritionnelle et l'apparition d'acides aminés modifiés indésirables. Il est communément admis que la plupart des groupements aminés, susceptibles de participer à la réaction de Maillard, sont portés par les protéines (Pischetsrieder*, et coll.*, 1998). C'est ainsi que la recherche s'est principalement orientée vers l'étude des dommages occasionnés aux protéines au cours du traitement thermique des aliments. Cependant, même si les acides aminés libres et autres amines de faible poids moléculaire ne sont présents qu'en faibles quantités dans les aliments, il apparaît aujourd'hui fondamental de comprendre leur rôle dans la synthèse de composés dits « néoformés ».

Aujourd'hui plusieurs arguments nous laissent penser à une participation des acides aminés libres dans la réaction de Maillard associée à l'apparition de composés potentiellement toxiques dans les denrées alimentaires.

L'instabilité reconnue de certains acides aminés au cours des traitements thermiques pose la question de leur devenir chimique (Merritt & Robertson, 1967 ; Lien & Nawar, 1974).

La découverte de la dégradation de l'asparagine libre en acrylamide dans des matrices alimentaires aussi variées que la pomme de terre et les céréales est l'exemple le plus frappant de l'implication d'un acide aminé libre dans la réaction de Maillard (Mottram*, et coll.*, 2002 ; Stadler*, et coll.*, 2002). Cet exemple illustre parfaitement le risque sanitaire qui est associé à l'instabilité d'une amine non protéique malgré une concentration relativement faible dans les aliments.

Dans ce contexte, il semble important de mieux comprendre l'impact du traitement thermique sur les acides aminés libres des aliments. Après avoir présenté une étude bibliographique sur la réactivité des différents acides aminés et les principaux paramètres qui influencent la réaction de Maillard, nous rechercherons quels sont les acides aminés libres les plus abondants dans les denrées alimentaires brutes. Enfin, nous détaillerons la pertinence d'étudier le devenir de la glutamine libre dans les aliments. Nous verrons que, tout comme

l'asparagine, la glutamine est un acide aminé basique présent en forte proportion dans plusieurs aliments de consommation courante.

Nous conclurons ce chapitre par un résumé de nos hypothèses et la présentation de nos objectifs.

I. LA REACTION DE MAILLARD : FACTEURS MIS EN JEU ET PARAMETRES INFLUENTS

Depuis la découverte de la réaction de Maillard, les acides aminés libres en solution ont été utilisés comme modèle des modifications chimiques des protéines au cours du traitement thermique. Même si les études que nous allons citer dans les paragraphes suivants n'avaient pas pour objet d'étudier le devenir des acides aminés libres dans les aliments, elles sont aujourd'hui une source primordiale d'information pour notre recherche.

Ces modèles ont permis d'étudier cinq facteurs majeurs de la réaction de Maillard : la réactivité des différents acides aminés, celle des sucres et composés α-dicarbonylés, le pH et la force ionique du milieu, le couple temps/température et l'activité d'eau. L'action de la pression sur la formation de CML et de CEL au cours du traitement thermique des aliments a aussi très récemment été identifiée par Kasper & Schieberle (2007). Cependant nous n'aborderons pas ce paramètre dont les effets nous semblent encore trop incertains.

1. Réactivité des acides aminés

La mesure du brunissement est depuis longtemps un moyen simple de suivre l'évolution de la réaction de Maillard en solution. Cette analyse a été appliquée sur tous les acides aminés (isomères L) incubés en présence de différents sucres : saccharose, D-glucose, D-fructose, D-ribose et α-lactose (Ashoor & Zent, 1984). Les mélanges équimolaires préparés à pH 9 sont autoclavés à 121°C pendant 10 min. Les résultats permettent d'établir trois groupes d'acides aminés en fonction de leur ordre décroissant de brunissement :

- Lysine, glycine, tryptophane, tyrosine : brunissement le plus intense
- Proline, leucine, isoleucine, alanine, hydroxyproline, phénylalanine, méthionine, valine, glutamine, sérine, asparagine : brunissement intermédiaire
- Histidine, thréonine, acide aspartique, arginine, acide glutamique, cystéine : brunissement le plus faible

Ce classement est valable pour quatre sucres testés, à l'exception du saccharose qui ne donne aucun brunissement détectable.

Nous retrouvons dans le premier groupe la lysine qui donne le brunissement le plus intense. Cet acide aminé est connu pour sa très forte réactivité associée à la présence de deux amines primaires. Par contre, ce classement montre que le lien entre le brunissement et la basicité de l'acide aminé n'est pas valable. En effet, la glycine, acide aminé neutre, donne un brunissement quasiment identique à celui de la lysine, acide aminé basique, et un brunissement trois fois plus élevé que celui de l'arginine, acide aminé basique également.

Ajandouz & Puigserver (1999) ont aussi étudié la réactivité de 8 acides aminés essentiels en observant leur dégradation ainsi que leur contribution à la formation de pigments bruns. Parmi eux se trouve encore la lysine, qui s'avère être l'acide aminé le plus dégradé dans un mélange équimolaire acide aminé/glucose chauffé à 100°C (pH 7,5). (Adrian, 1974) confirme que la présence de ses deux groupements amines la rend 5 à 15 fois plus réactive que les autres acides aminés testés.

Parmi les arômes formés au cours de la réaction de Maillard, les pyrazines représentent le groupe d'hétérocycles le plus abondant. Hwang*, et coll.* ont testé la réactivité de huit acides aminés (glutamine, acide glutamique, asparagine, acide aspartique, lysine, arginine, phénylalanine et isoleucine) en suivant la formation de 56 pyrazines après incubation à 180°C en présence de sucres (Hwang*, et coll.*, 1995a). La lysine est encore l'acide aminé le plus réactif, à l'opposé de l'arginine qui forme la plus faible quantité de pyrazines. Enfin, d'autres types d'arômes moins abondants dans les aliments, les pyridines, les pyrroles et les oxazoles sont respectivement formés majoritairement par l'acide aspartique, la lysine et l'asparagine (Hwang*, et coll.*, 1995b).

L'asparagine, la glutamine, l'arginine, l'histidine, le tryptophane et la lysine sont tous porteurs d'au moins deux atomes d'azote (une amine en position alpha et au moins un autre

atome d'azote sur la chaîne latérale). Cependant les fonctions amides de l'asparagine et de la glutamine ne peuvent participer à la réaction de Maillard, la fonction guanidine de l'arginine est peu réactive avec les hexoses, et les atomes d'azote du tryptophane et de l'histidine sont impliqués dans des cycles qui les rendent indisponibles pour toute attaque nucléophile. A l'inverse l'amine primaire de la chaîne latérale de la lysine est très réactive avec les sucres (Hwang*, et coll.*, 1994). Cette caractéristique structurale unique de la lysine explique sa forte implication dans la formation de composés bruns, d'arômes et autres produits de Maillard.

2. Réactivité des cétoses, aldoses et composés α-dicarbonylés

La nature du sucre réducteur employé est un paramètre à prendre en compte. En 1984, Ashoor & Zent ont étudié le brunissement de chaque acide aminé naturel en présence de différents sucres réducteurs : D-glucose, D-fructose, D-ribose, α-lactose et saccharose (pH 9 ; 121°C ; 10 min). Le lactose donne le brunissement le plus intense suivi du D-ribose, D-fructose et enfin D-glucose. Le saccharose ne donne aucun brunissement détectable avec aucun des acides aminés testés ce qui semble indiquer que ce disaccharide n'est pas hydrolysé en glucose et fructose dans ces conditions.

Dans une matrice constituée de farine de blé complet, la réactivité de trois sucres (glucose, fructose et saccharose) a été étudiée en suivant la formation d'acrylamide. Les trois sucres sont chauffés 30 min à 200°C en présence d'asparagine (Taeymans*, et coll.*, 2004). Le fructose tendrait à être plus réactif que le glucose, avec une quantité d'acrylamide formé de 110 µg/g de farine contre 72 µg/g de farine pour le glucose. Le saccharose produit une quantité intermédiaire de 92 µg/g de farine, ceci étant dû à son hydrolyse thermique en glucose et fructose. D'autres études rapportent aussi que le fructose est plus réactif que le glucose (Biedermann*, et coll.*, 2002 ; Pollien*, et coll.*, 2003). Stadler*, et coll.* (2002) ont trouvé que le fructose, le galactose, le lactose et le saccharose produisaient des quantités d'acrylamide comparables après pyrolyse en présence d'acides aminés (asparagine, méthionine, glutamine, cystéine). Pour conclure, nous pouvons dire que l'acrylamide est formé dans des quantités comparables avec différents mono et disaccharides. Même les sucres non réducteurs, tels que le saccharose, sont réactifs en libérant des sucres réducteurs après hydrolyse, capables de réagir avec la fonction α-NH_2 de l'asparagine via la réaction de Maillard.

Les composés α-dicarbonylés, tels que le glyoxal, le méthylglyoxal, la 2,3-butanedione issus de la décomposition des sucres, représentent un intérêt important. En effet, dans les aliments, ils participent à la formation de couleur et d'arômes (Mavric*, et coll.*, 2006). Ils deviennent donc des substrats potentiels de la réaction de Maillard affectant ainsi la qualité des aliments par d'éventuelles modifications de protéines et d'acides aminés libres. C'est aussi *in vivo* qu'ont été étudiées les réactions de Maillard, ou plus précisément de glycation, entre les composés α-dicarbonylés et les acides aminés peptidiques. Le MethylglyOxalLysine Dimer (MOLD) (Shamsi*, et coll.*, 1998) et l'argpyrimidine (Shipanova*, et coll.*, 1997) sont deux produits de Maillard issus d'une réaction avec le méthylglyoxal. Il faut préciser que l'argpyrimidine n'a pas été détectée que dans les tissus biologiques puisque Glomb*, et coll.* ont retrouvé cet AGE dans la bière (Glomb*, et coll.*, 2001).

Les composés α-dicarbonylés sont formés par scission des réductones issues du produit d'Amadori. La figure 11 représente le schéma de formation du méthylglyoxal à partir du 3-déoxyglucosone, réductone issue du produit d'Amadori en milieu acide. La dicétone se scinde en deux petites molécules carbonylées : le méthylglyoxal et le glycéraldehyde. L'addition d'une molécule d'eau conduit à la formation de la dihydroxyacétone à partir du méthylglyoxal. En revanche, la perte d'une molécule d'eau transforme le glycéraldehyde en méthylglyoxal. En milieu alcalin, la réductone issue du glucose se scinde cette fois en glyoxal et 2,3-butanedione.

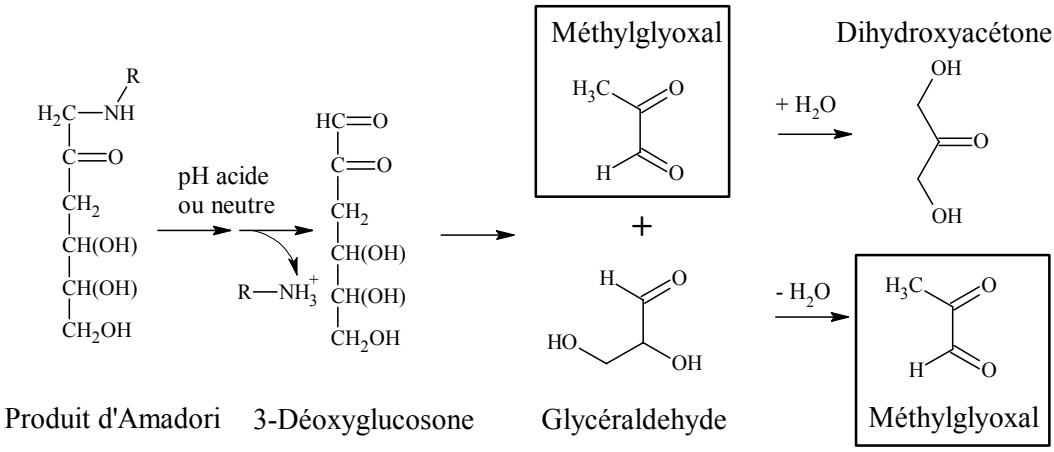


Figure 11 : Schéma de formation du méthylglyoxal à partir du produit d'Amadori issu de la réaction entre un acide aminé R-NH_2 et le glucose.

Enfin, les composés α-dicarbonylés sont connus comme étant des intermédiaires de la réaction de Maillard beaucoup plus réactifs que les pentoses ou hexoses dont ils sont issus. (Thornalley, 2005) estime que le méthylglyoxal est environ 20 000 fois plus réactif que le glucose.

Le méthylglyoxal est aussi décrit comme étant généralement plus réactif (Hollnagel & Kroh, 1998) et plus répandu que le glyoxal aussi bien dans des milieux biologiques que dans les denrées alimentaires.

Différentes études s'intéressent à la détection et la quantification des composés α-dicarbonylés *in vivo* (Glomb & Tschirnich, 2001) mais aussi sur des modèles ayant subi un traitement thermique (Homoki-Farkas*, et coll.*, 1997). Plus particulièrement, le méthylglyoxal qui présente des effets mutagènes et cytotoxiques, a été détecté dans différents aliments tels que les pommes de terre (Kajita & Senda, 1972), le café (Ohmori*, et coll.*, 1987), le vin et autres boissons (Hayashi & Shibamoto, 1985), les huiles végétales (Hirayama*, et coll.*, 1994), le miel (Mavric*, et coll.*, 2006) et différentes pâtisseries (Henle*, et coll.*, 1994).

Homoki-Farkas*, et coll.* (1997) ont cherché à doser le méthylglyoxal provenant de la dégradation des sucres à la suite d'un traitement thermique de systèmes modèles. Le D-glucose (monosaccharide), la dextrine 15 (oligosaccharide comprenant 15 unités de glucose) et l'amidon (polysaccharide) sont chauffés à différentes températures, de 160 à 182°C pour le D-glucose et 170°C pour la dextrine et l'amidon, pendant 10 à 60 minutes. Le même procédé est utilisé en présence d'une amine, la glycine ou l'ortho-phénylènediamine (agent de dérivation du méthylglyoxal dans le cadre de son dosage en HPLC-UV), afin de voir l'effet de la réaction de Maillard sur la formation de méthylglyoxal (figure 12).

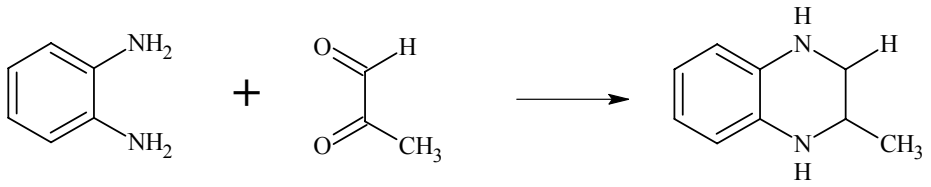


Figure 12 : Réaction de l'ortho-phénylènediamine sur le méthylglyoxal.

En milieu sec, la formation de méthylglyoxal est plus lente qu'en milieu aqueux quelque soit la température observée. Cet effet serait dû, selon les auteurs, à la formation plus rapide de produits bruns en milieu sec. Le même phénomène est observé pour la dextrine et l'amidon à 170°C, c'est-à-dire un meilleur rendement en méthylglyoxal en milieu aqueux qu'en milieu sec. En comparant le D-glucose avec la dextrine et l'amidon, dans les mêmes conditions (milieu aqueux, 170°C), le glucose produit la concentration en méthylglyoxal la plus élevée avec un palier à 30 min de chauffage puis une diminution, suivi de la dextrine et enfin de l'amidon. En présence d'une amine, la formation de méthylglyoxal est accélérée, ce qui confirme l'effet catalytique des amines. La concentration en méthylglyoxal est, dans ces conditions, plus élevée que dans un modèle simple de caramélisation dépourvu d'amine.

3. pH

a. Etude sur différents modèles

Ashoor & Zent (1984) ont étudié l'influence du pH sur le chauffage de trois acides aminés (lysine, alanine, arginine), représentatifs des trois groupes cités dans le chapitre III : I.1 (p 47), en présence d'un sucre réducteur. Aucun brunissement n'est détecté à un pH inférieur à 6. Sur une échelle de pH allant de 6 à 12, un maximum de brunissement est observé pour chaque acide aminé à pH 10, confirmant que la réaction de Maillard est favorisée en milieu alcalin. En effet, la réactivité d'une amine est essentiellement basée sur la présence du doublet libre de l'azote (figure 13). A pH acide, la protonation ôte le doublet libre et empêche ainsi l'attaque nucléophile de ce dernier sur les fonctions carbonylées.

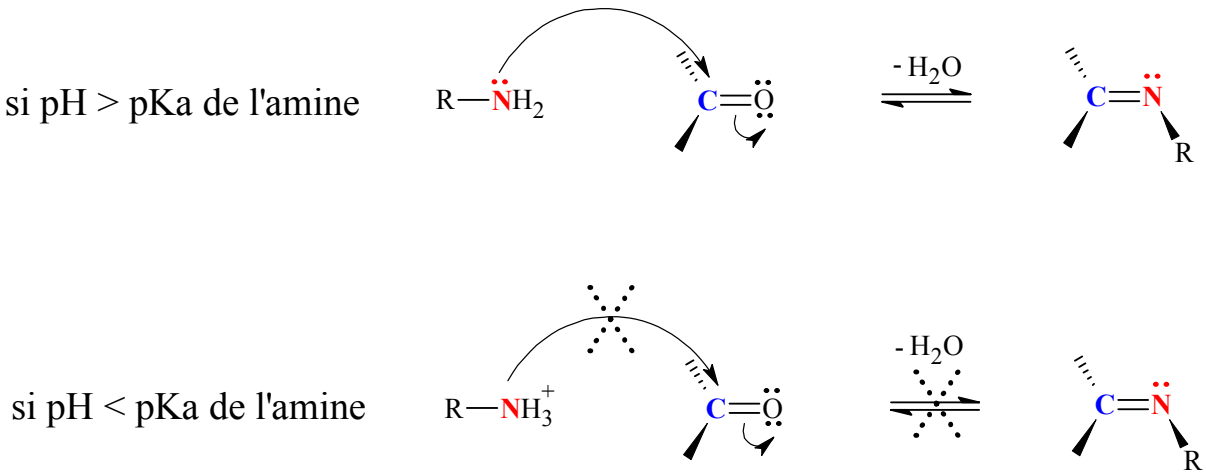


Figure 13 : Addition nucléophile d'une amine primaire sur un aldéhyde ou une cétone en fonction du pH.

Sur 3 autres mélanges composés d'acides aminés (lysine, thréonine, méthionine) et de glucose, l'influence du pH est également observée (Ajandouz & Puigserver, 1999). Pour un mélange lysine/glucose, lorsque le pH augmente de 6 à 12, l'absorbance à 420 nm augmente, ce qui confirme que la réaction de Maillard est favorisée en milieu alcalin. En revanche, pour les deux autres mélanges étudiés (méthionine/glucose et thréonine/glucose), la différence d'intensité de brunissement avec une solution de glucose seul est nettement moins marquée. A l'aide de ces observations sur des modèles simples, Jung, *et coll.* (2003) ont tenté de limiter la formation d'acrylamide en acidifiant les matrices alimentaires. Un pré-traitement de pomme de terre à l'acide citrique aux concentrations de 1% et 2% permet effectivement d'inhiber la formation d'acrylamide au cours du traitement thermique par friture. Cette inhibition a été respectivement de 73,1% et 79,7% (Jung, *et coll.*, 2003). De même, le chauffage d'une solution d'un mélange asparagine/glucose dans un tampon phosphate pendant 30 min à 150°C révèle une inhibition de 99,1% de la formation d'acrylamide lorsque le pH est diminué de 7 à 4.

Il est enfin démontré que la formation de composés mutagènes issus de la réaction de Maillard dépend du pH. En effet celle-ci est faible à pH acide et favorisée en milieu basique (Spingarn & Garvie, 1979).

b. pH dans les aliments

Nous venons de voir que la réaction de Maillard est favorisée en milieu alcalin. Cependant le tableau 1 indique que la plupart des aliments ont un pH légèrement acide, ce qui devrait théoriquement limiter cette réaction.

	pH
Bœuf [1]	
40 min post-mortem	6,4
48h post-mortem	5,4
Jambon de Parme [2]	
450 jours d'affinage	5,88
570 jours d'affinage	5,91
690 jours d'affinage	5,89
Tomate [3]	4,6
Lait de vache [4]	6,7

[1] Neath*, et coll.* (2007) ; [2] Sforza*, et coll.* (2006) ; [3] Loiudice*, et coll.* (1995) ; [4] Lindmark-Mansson*, et coll.* (2003).

Tableau 1 : pH dans la viande de bœuf, le jambon de Parme, la tomate et le lait de vache.

Dans la viande de bœuf, le pH diminue d'une unité de pH 48 heures après l'abattage. Cette baisse est due à la transformation du glycogène en acide lactique. Cet acide n'est plus éliminé du fait de l'arrêt de la circulation sanguine. Il s'accumule et contribue à la baisse du pH. Pendant l'affinage du jambon de Parme, le pH ne varie pas, il est de 5,9 en moyenne. Pour la tomate, le pH est plutôt acide, d'une valeur de 4,6 et varie peu selon les différentes variétés étudiées (Loiudice*, et coll.*, 1995). Enfin, le pH du lait de vache est proche de la neutralité : 6,7 en moyenne.

c. Effet de la nature du tampon et de sa concentration

La nature d'un tampon et le pH sont étroitement liés. De nombreuses études sur modèles simples utilisent des tampons phosphate sans se préoccuper de leurs effets sur la réaction de Maillard. Or il est suggéré que les ions phosphate catalyseraient la conversion de la N-glycosylamine en produit d'Amadori lors de l'étape initiale de la réaction de Maillard (Potman & van Wijk, 1989). En effet, en milieu phosphate, une accélération du brunissement est observée (Tessier & Birlouez-Aragon, 1998). L'activation de la réaction est due à la présence de traces de métaux de transition complexés aux ions phosphate. Les métaux de transition joueraient alors le rôle de catalyseur dans des réactions de Maillard alors appelées réaction de glycoxydation.

De ce fait, la nature et la quantité des produits de réaction s'en trouveraient modifiées. En revanche, l'absence de tampon peut entraîner une variation de pH de 3-4 unités ce qui est préjudiciable pour les études de l'effet du pH sur la réaction de Maillard. Cette baisse de pH est associée non seulement à la réduction du nombre de groupement NH_2, mais également à la formation de divers acides au cours de la réaction de Maillard (acide lactique, formique, acétique…). Nous verrons que notre proposition de mécanisme de synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique inclue la perte d'un carbone par élimination d'une molécule d'acide formique (PARTIE III chapitre II : II.2.i ; p 154).

Toutes ces observations ont de nouveau été illustrées dans une étude récente qui s'est intéressée à la formation d'acrylamide en fonction du pH, de la nature du tampon et de la force ionique du milieu réactionnel (De Vleeschouwer*, et coll.*, 2006). Ils ont comparé l'influence d'un tampon phosphate (0,5 M), d'un tampon citrate (0,5 M) et de l'eau à pH 4,83 sur un mélange équimolaire asparagine/glucose (0,1 M) chauffé pendant 20 min à 160°C, 180°C et 200°C. Les résultats montrent que la formation d'acrylamide est plus faible en milieu tamponné, quel que soit le tampon testé. Ils expliquent cette observation par le changement de pH en système non tamponné lors de la ou des réaction(s) développée(s). Ce changement est évidemment moins important dans les systèmes tamponnés. Ensuite, la faible formation d'acrylamide peut être attribuée à l'effet inhibiteur des ions du tampon sur la production d'acrylamide, étant donné la force ionique élevée employée (0,5 M). C'est pourquoi ils ont ensuite testé l'influence de cinq concentrations de tampon phosphate et citrate (0,025 à 0,5 M) sur le même type de mélange que précédemment à pH 8, pendant 20 min à des températures allant de 120°C à 200°C. Ils observent la même tendance pour les

deux types de tampons. Pour les faibles concentrations (0,025 et 0,05 M), un plateau est obtenu aux températures élevées (180°C et 200°C), ce qui n'est pas le cas des concentrations supérieures ou égales aux concentrations des réactants où l'on observe une baisse de la quantité d'acrylamide à la température de 200°C. Le fait d'augmenter la force ionique a tendance à diminuer la concentration d'acrylamide.

4. Couple Temps/Température

Le temps de réaction mais aussi la température du traitement thermique appliqué à un aliment sont deux paramètres fondamentaux de la réaction de Maillard.

Shibamoto & Bernhard (1976) ont étudié l'influence du temps et de la température de chauffage sur la formation de pyrazines à partir de mélanges hydroxyde d'ammonium et glucose. Pour une température inférieure à 70°C, peu de pyrazines sont formées. A partir de cette température, le taux de pyrazines augmente jusqu'à 120°C, température à laquelle un optimum est atteint. A une température supérieure à 120°C, le taux de pyrazines diminue brusquement. A une température constante de 100°C, la production de pyrazines est maximale avec un temps d'incubation de 4 heures. Ensuite, le taux diminue rapidement entre 4 heures et 6 heures, puis faiblement après 6 heures. A 48 h d'incubation, le taux devient très faible.

La température a non seulement un effet sur le rendement de la réaction de Maillard mais aussi sur le type de CNF synthétisés. En étudiant l'effet de la température sur la contribution de l'α-amine et de l'ε-amine de la lysine sur la formation de pyrazines, Hwang, *et coll.* (1994) ont conclu qu'elle n'avait pas d'effet sur la réactivité relative entre les deux amines. Cependant, le type de pyrazine diffère avec la température. En effet, à une température de 100°C, seules la méthylpyrazine et la 2,6-diméthylpyrazine sont formées. Pour obtenir des pyrazines substituées de chaînes alkyles plus longues, une température plus élevée est nécessaire.

L'influence du couple temps/température sur la formation d'acrylamide a aussi été étudiée dans la pomme de terre (Taubert*, et coll.*, 2004). Les températures de 120°C à 230°C ont été testées et il apparaît qu'une température minimale de 120°C est nécessaire pour la formation d'acrylamide. Les résultats montrent que la quantité d'acrylamide est nettement plus influencée par le temps de chauffage à une certaine température que par la température elle-même.

De façon générale, la formation des produits de Maillard est augmentée avec le temps et la température. Cependant, selon les molécules formées, il se peut que l'on observe une

diminution de leurs concentrations à un temps de chauffage donné. Cette observation est par exemple décrite pour l'acrylamide (Tareke*, et coll.*, 2002). Cette diminution peut s'expliquer soit par une dégradation des CNF et transformations en produits plus avancés ou terminaux de la réaction de Maillard (les mélanoïdines, par exemple), soit par une compétition entre la formation de différents CNF.

5. Activité d'eau

L'activité de l'eau dans les aliments est un facteur très important dans la réaction de Maillard qui influence la couleur, le goût, les arômes formés. En règle générale, beaucoup de réactions de brunissement ont lieu à une activité d'eau comprise entre 0,3 et 0,7 (Eichner & Karel, 1972). D'après Van den Berg & Bruin (1981), la vitesse de brunissement non enzymatique est maximale pour une activité d'eau de 0,7 (figure 14). En revanche, pour les milieux liquides en présence d'alcool tel que le glycérol la vitesse maximale de la réaction peut être obtenue pour une activité inférieure (entre 0,4 et 0,8 selon l'alcool employé) (Warmbier*, et coll.*, 1976).Lors de la première étape de la réaction de Maillard, l'eau permet une mobilité des deux réactifs (amine et sucre) et facilite ainsi leur réaction. En dessous d'une activité d'eau de 0,2, la vitesse de la réaction de Maillard devient très faible. C'est d'ailleurs cette activité d'eau qui permet une meilleure stabilité des aliments déshydratés. En revanche, pour une activité supérieure à 0,7, un effet de dilution des réactants est observé ce qui abaisse la vitesse de réaction (Lorient & Tainturier, 2002). Par ailleurs, il est également avancé que l'eau, qui est un produit de la réaction de Maillard (voir figure 5 et figure 6), jouerait un rôle d'inhibiteur dans des réactions en équilibre.

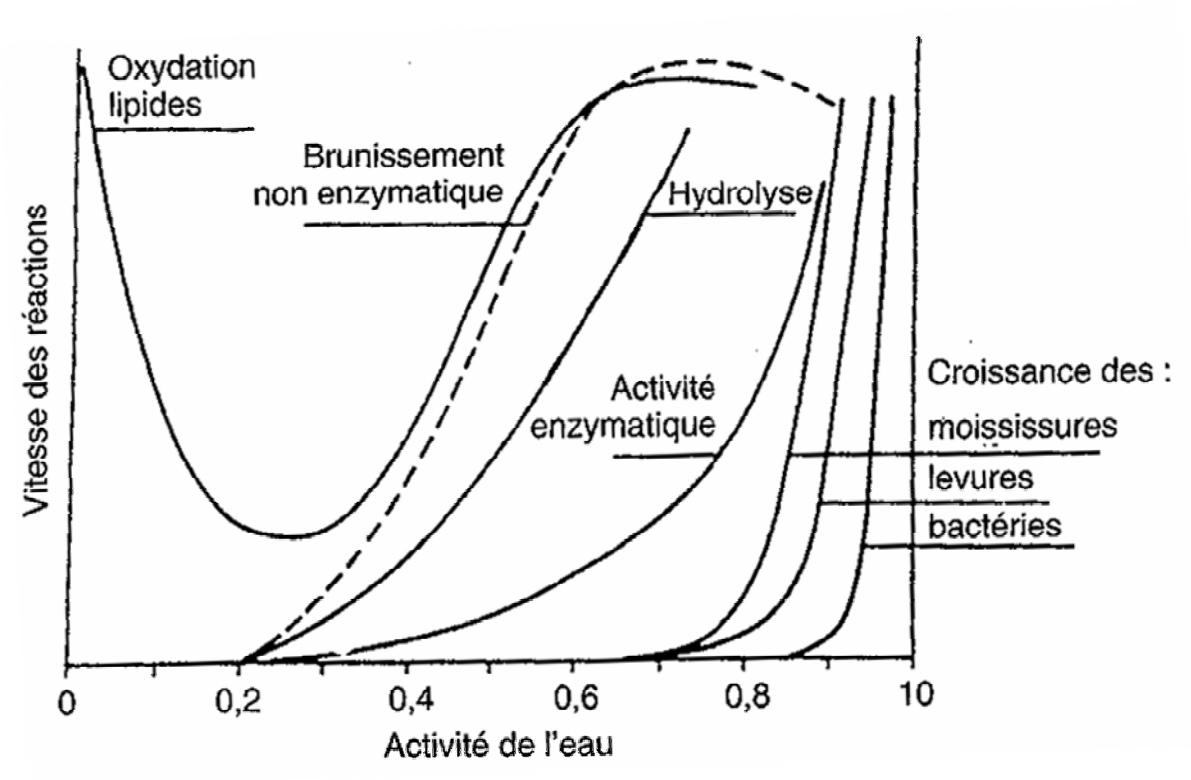


Figure 14 : Vitesse des réactions de dégradation des aliments en fonction de l'activité de l'eau à température ambiante (Lorient & Tainturier (2002), d'après Labuza, *et coll.*, 1970).

Cuzzoni, *et coll.* (1988) ont étudié l'influence de l'activité de l'eau sur l'activité mutagène, l'absorbance et la formation de furfurals à partir des mélanges ribose/lysine et glucose/lysine. Chauffé à 100°C, le mélange ribose/lysine présente une activité mutagène d'autant plus accrue que l'activité d'eau diminue. En revanche, aucun lien n'est observé entre activité mutagène et activité d'eau pour le mélange glucose/lysine. Pour les deux mélanges testés, l'absorbance à 420 nm augmente entre 120 et 160°C lorsque l'on diminue l'activité de l'eau.

II. LES ACIDES AMINES LIBRES DANS LES ALIMENTS

Les protéines constituent la principale source d'azote dans les aliments, et les acides aminés libres ne représentent finalement qu'une faible part de l'apport azoté. Si nous prenons l'exemple du lait de vache et les données de quelques publications (Mehaia & Al-Kanhal, 1992 ; FAO, 1995), nous observons qu'il contient environ 290 000 µmol d'acides aminés protéiques (sur la base de 32 g de protéines par litre) et seulement 300 µmol d'acides aminés libres. Dans cette matrice alimentaire les acides aminés libres ne représentent donc qu'1‰ des acides aminés totaux. Ce faible pourcentage d'acides aminés libres est vraisemblablement retrouvé dans de nombreux autres aliments.

Cependant comme nous l'avons évoqué précédemment, plusieurs arguments indiquent que leur transformation au cours de la conservation ou du traitement thermique des denrées alimentaires entraîne la formation de composés de Maillard qui devront faire l'objet d'études approfondies.

Les teneurs en glutamine, acide glutamique, asparagine, acide aspartique, arginine et lysine (en µg/g pour les aliments solides et en µg/mL pour les aliments liquides) recueillies dans la littérature dans quelques aliments de consommation courante sont reprises dans le tableau 2.

Les auteurs constatent que, dans le jambon de Parme, la lysine représente l'acide aminé libre le plus abondant à hauteur de 7 700 µg/g en moyenne. Les auteurs observent aussi que son taux ne varie pas dans le temps contrairement à ceux de la glutamine et de l'arginine. Parmi l'ensemble des acides aminés mesurés, ces deux acides aminés sont les seuls à se dégrader au fur et à mesure de l'affinage jusqu'à devenir nul pour la glutamine à 690 jours. Il est vrai que la glutamine est un acide aminé libre peu abondant dans le jambon de Parme à 450 jours d'affinage (89 µg/g) mais on peut suspecter une dégradation progressive depuis le premier jour d'affinage du jambon. Précisons que les muscles des mammifères sont le lieu de synthèse de la glutamine et que l'on s'attend à retrouver une forte concentration de glutamine dans les produits carnés crus (Shabert & Ehrlich, 1994). A ce propos, et contrairement au jambon de Parme, la glutamine est l'acide aminé libre le plus abondant dans la viande de

porc. Cela confirme qu'au cours de l'affinage d'une viande de porc, la glutamine est instable jusqu'à être totalement dégradée à la fin du procédé.

Dans la tomate, la concentration en glutamine libre est de 2 658 µg/g de tomate fraîche : le plus important parmi les acides aminés répertoriés. Cependant les auteurs de cette étude n'ont pas dosé l'ensemble des acides aminés. Il manque entre autres la lysine et l'arginine. Dans d'autres végétaux, la glutamine libre se trouve être aussi l'acide aminé le plus abondant, c'est le cas du brocoli, du chou et de l'épinard. Dans le pois et le chou fleur, nous retrouvons l'asparagine et l'acide aspartique comme étant les plus abondants.

Quelle que soit la variété étudiée, l'asparagine représente l'acide aminé libre le plus abondant dans la pomme de terre (jusqu'à 4 900 µg/g de pomme de terre fraîche). Nous observons aussi une teneur en glutamine libre non négligeable dans la pomme de terre. Cependant, des teneurs assez variables ont été proposées selon les publications. Ces différences peuvent être attribuées aux différentes variétés employées, aux différents systèmes de culture et de fertilisation, aux différentes applications de pesticides, aux différentes dates de récolte ainsi qu'aux différences de temps et de température de stockage (Taeymans*, et coll.*, 2004).

Dans les produits céréaliers, la distribution en acides aminés libres peut être différente selon la céréale étudiée. En effet, dans la farine de blé, l'acide aspartique est l'acide aminé libre le plus abondant (148 µg/g) alors que dans la farine de seigle, l'acide aspartique et l'asparagine sont les plus abondants avec des teneurs avoisinant 360 µg/g.

Dans les amandes, les auteurs n'ont pas distingué l'acide aspartique de l'acide glutamique en raison d'une mauvaise résolution chromatographique. Il se trouve que la teneur de ces deux acides aminés est la plus importante suivie de celle de l'asparagine, de l'arginine et de la glutamine. Cette dernière a été mesurée à une concentration environ 10 fois plus faible que celle du mélange acide aspartique + acide glutamique.

Dans les fèves de cacao, les auteurs ont étudié l'impact du grillage sur les teneurs en acides aminés libres. Quelle que soit la température de grillage (125°C et 135°C), l'arginine reste l'acide aminé libre le plus abondant malgré l'observation d'une dégradation partielle. Pour les quatre acides aminés répertoriés dans le tableau 2, les auteurs observent une dégradation au cours du procédé de grillage, avec une perte proche de 80% pour la glutamine, de 70% pour l'asparagine et de 71% pour la lysine.

Dans les jus de pomme et d'ananas, l'asparagine représente l'acide aminé libre le plus abondant alors que, dans le jus de raisin, c'est l'arginine qui est présent en concentration

importante. Les trois jus de fruits étudiés ont des teneurs en acide glutamique variant de 20 à 30 µg/mL et des teneurs en glutamine plus faibles comprises entre 2 et 15 µg/mL.

Enfin, dans le vin rouge, les teneurs en acides aminés libres sont globalement faibles. La glutamine, l'acide aspartique, l'arginine et la lysine sont présents à des concentrations inférieures à 1 µg/mL. Parmi les acides aminés mesurés, l'acide glutamique est le plus abondant avec 2,6 µg/mL.

	µg/g (matrices solides) ou µg/mL (matrices liquides)					
	Gln	**Asn**	**Glu**	**Asp**	**Arg**	**Lys**
Viande de porc						
Muscle *Longissimus Dorsi* [1]	297	11	26	2	45	26
Muscle *Longissimus Dorsi* [2]	389	9	20	4	52	26
Muscle *Semimembranosus* [2]	262	7	11	4	56	20
Muscle *Trapezius* [2]	1618	16	60	7	55	31
Muscle *Masseter* [2]	2752	17	47	3	58	38
Jambon de Parme [3]						
450 jours d'affinage	89	597	5022	2387	2430	7064
570 jours d'affinage	7	537	5625	2587	2307	7979
690 jours d'affinage	0,3	586	6020	2809	2299	8162
Lait cru de vache [4]	2	Q N M [a]	10	1	1	3
Lait humain [4]	31	Q N M [a]	154	5	6	13
Tomate - Variété Caimanta [5]	2658	381	1611	407	Q N M [a]	Q N M [a]
Brocolis [6]	103	15	33	19	5	Q N M [a]
Pois [7]	42	1680	102	193	29	6
Chou [7]	1225	184	396	118	187	34
Epinard [7]	170	27	180	35	42	10
Chou fleur [7]	220	37	293	516	6	17
Pomme de terre						
Variété Bintje [7]	3552	4878	781	484	492	85
Variété Saturna [8]	282	939	94	47	164	47
Variété Cara [9]	863	2263	357	375	230	95
Variété Nadine [9]	1321	1703	234	324	218	81
Variété Fianna [9]	1041	2581	483	516	208	72
Variété Marfona [9]	1771	1912	351	305	316	189
Produits céréaliers [10]						
Farine de blé	19	88	61	148	20	8
Farine de seigle	35	365	163	351	50	18
Amandes [11]	337	2650	3220		1035	Q N M [a]
Fève de cacao [12]						
brute	371	309			555	379
grillée 3min à 125°C	119	145	Q N M [a]		223	160
grillée 3min à 135°C	80	94			160	109
Jus de [13]						
Raisin	3	4	30	19	208	8
Pomme	2	323	20	81	3	4
Ananas	15	247	29	26	13	13
Vin rouge [14]	0,02	1,6	2,6	0,7	0,3	0,05

[a] Q N M : Quantité non mesurée

[1] Flores, *et coll.* (2000) ; [2] Aristoy & Toldra (1998) ; [3] Sforza, *et coll.* (2006) ; [4] Mehaia & Al-Kanhal (1992) ; [5] Pratta, *et coll.* (2004) ; [6] Murcia, *et coll.* (2001) ; [7] Eppendorfer & Bille (1996) ; [8] Martin & Ames (2001) ; [9] Oruna-Concha, *et coll.* (2001) ; [10] Mustafa, *et coll.* (2007) ; [11] Helena Seron, *et coll.* (1998) ; [12] Serra Bonvehi & Ventura Coll (2002) ; [13] Dizy, *et coll.* (1992) ; [14] Pripis-Nicolau, *et coll.* (2001).

Tableau 2 : Acides aminés libres dans quelques matrices alimentaires (en µg/g pour les matrices solides et en µg/mL pour les matrices liquides).

III. L'EXEMPLE DE L'ASPARAGINE

Suite à la découverte de l'acrylamide dans des produits issus de la pomme de terre en 2002, près de 150 articles sont parus traitant de l'influence du temps et de la température de cuisson (Tareke, *et coll.*, 2002), de la teneur en asparagine ou en sucres (Surdyk, *et coll.*, 2004) et de la nature du sucre (Biedermann, *et coll.*, 2002 ; Pollien, *et coll.*, 2003 ; Taeymans, *et coll.*, 2004) sur la formation d'acrylamide. Différents pré-traitements des matrices alimentaires ont ensuite été testés pour tenter de diminuer la formation d'acrylamide (Tareke, *et coll.*, 2002 ; Gökmen & Senyuva, 2007). L'utilisation d'asparaginase a entre autres été évaluée dans le but de réduire la concentration d'asparagine libre dans les matrices destinées à un traitement thermique (Friedman, 2003).

Peu de temps après la découverte de cette molécule potentiellement toxique dans les aliments, l'asparagine libre a été identifiée comme étant son plus important précurseur (Mottram, *et coll.*, 2002 ; Stadler, *et coll.*, 2002 ; Becalski, *et coll.*, 2003 ; Yaylayan, *et coll.*, 2003 ; Zyzak, *et coll.*, 2003). L'asparagine fait encore l'objet de nombreuses études. Elle est ainsi devenue le premier exemple d'acide aminé libre impliqué dans la qualité sanitaire des aliments chauffés qui en sont riches. Sur la figure 15 est représenté le schéma de formation de l'acrylamide à partir de l'asparagine libre proposé par Zyzak, *et coll.* (2003) et Granvogl, *et coll.* (2004). Après décarboxylation de l'imine, deux principales voies de synthèse de l'acrylamide sont probables. L'imine décarboxylée peut se décomposer directement en

acrylamide par élimination de l'imine (voie 1) ou bien s'hydrolyser pour former le 3-aminopropionamide (voie 2). Après élimination d'ammoniac, ce dernier forme l'acrylamide. Enfin, il est observé que la quantité d'acrylamide formé à partir de 3-aminopropionamide chauffé sans glucose dans un modèle « pomme de terre » est cinq fois plus élevée que celle obtenue dans un mélange asparagine/glucose (Zyzak*, et coll.*, 2003). Notons aussi que le 3-aminopropionamide peut être formé par voie enzymatique à l'aide d'une décarboxylase et d'un coenzyme, le pyridoxal phosphate (Granvogl*, et coll.*, 2004). Cependant, malgré le fait que le 3-aminopropionamide ait été détecté dans des pommes de terre crues (Granvogl*, et coll.*, 2004), cette voie reste mineure comparée à celle faisant intervenir l'asparagine libre et le glucose.

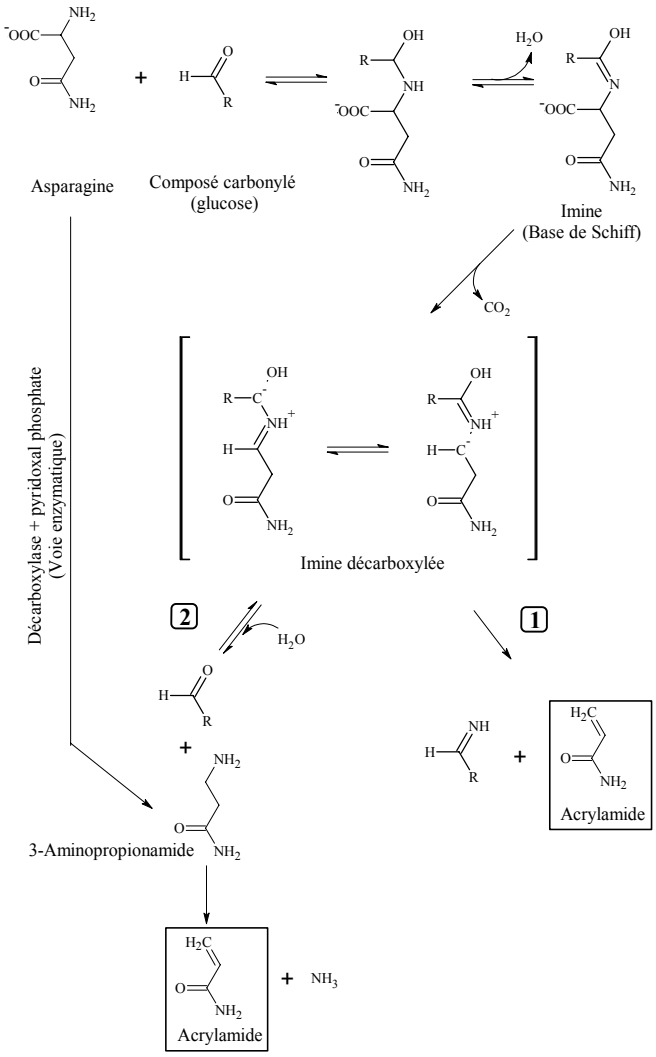


Figure 15 : Schéma de formation de l'acrylamide à partir de l'asparagine libre dans les aliments chauffés (Zyzak*, et coll.*, 2003 ; Granvogl*, et coll.*, 2004).

L'asparagine joue un rôle important dans la formation d'acrylamide dans les aliments. Cependant, l'acrylamide peut aussi être formé à partir d'autres constituants de la matrice comme nous l'avons vu avec le 3-aminopropionamide, ou à partir d'acroléine et de composés azotés (Becalski*, et coll.*, 2003 ; Yasuhara*, et coll.*, 2003). Ce point sera examiné dans le chapitre III : IV.2.d (p 73).

IV. LA GLUTAMINE ET L'AMMONIAC : IMPLICATION DANS LA REACTION DE MAILLARD

La glutamine est considérée comme un acide aminé non essentiel car, pour un individu en bonne santé, le corps est capable de la synthétiser en quantité nécessaire à partir de l'acide glutamique. Cependant, elle peut devenir « conditionnellement » essentielle en période de stress métabolique (traumatismes, infections, interventions chirurgicales, brûlures du 3ème degré) ou lors d'exercices intenses (Lacey & Wilmore, 1990). En effet, dans ce cas, les besoins importants du tissu digestif ne sont que partiellement couverts par la production du tissu musculaire (Souba*, et coll.*, 1985).

Malgré la forte teneur en glutamine libre dans les aliments non transformés (voir chapitre III : II, p 59), son apport alimentaire est très limité. En effet, de par sa structure chimique comprenant une α-amine, un amide et un acide (figure 16), cet acide aminé libre est très rapidement dégradé. Cette dégradation est évidement accélérée lorsque les matrices alimentaires sont soumises à un traitement thermique. Même si le risque nutritionnel associé à une perte en glutamine dans les aliments semble être négligeable pour des sujets sains, il n'en demeure pas moins que les produits de dégradation de cet amide doivent être analysés en détail et leur toxicité évaluée.

1. Les produits de dégradation spécifiques de la glutamine

De nombreuses protéines végétales sont riches en glutamine, et la dégradation de cet acide aminé a été largement étudiée. Plusieurs facteurs environnementaux sont impliqués dans la désamidation de la glutamine protéique. Celle-ci transforme la glutamine en acide

glutamique, et s'accompagne d'une perte d'ammoniac. La transformation de la fonction amide en fonction acide est favorisée à pH acide par une hydrolyse simple, et à pH basique par une attaque nucléophile sur le carbonyle de la fonction amide (Riha*, et coll.*, 1996).

Lorsque la glutamine est à l'état libre, l'α-amine n'est pas engagée dans une liaison peptidique. Son mécanisme et sa vitesse de dégradation sont alors modifiés.

A notre connaissance, peu d'études ont porté sur la dégradation de la glutamine libre dans les aliments. Nous présentons ci-dessous les quelques résultats recueillis dans la littérature.

a. L'acide pyroglutamique

Lorsque la glutamine est soumise à un traitement thermique, en présence ou non de composés carbonylés, elle se dégrade rapidement en acide 5-pyrrolidone-2-carboxylique, aussi appelé acide pyroglutamique (Snowden*, et coll.*, 2002). Cette dégradation, présentée dans la figure 16, entraîne la libération d'ammoniac qui, dans l'aliment, sera soit évaporé dans l'atmosphère, soit impliqué dans de nouvelles réactions que nous détaillerons dans le chapitre suivant. La formation d'acide pyroglutamique nécessite une α-amine libre sur la glutamine et ne peut donc avoir lieu sur une protéine. Enfin, c'est une réaction hydrolytique qui n'est possible qu'en milieu aqueux (Wright, 1991).

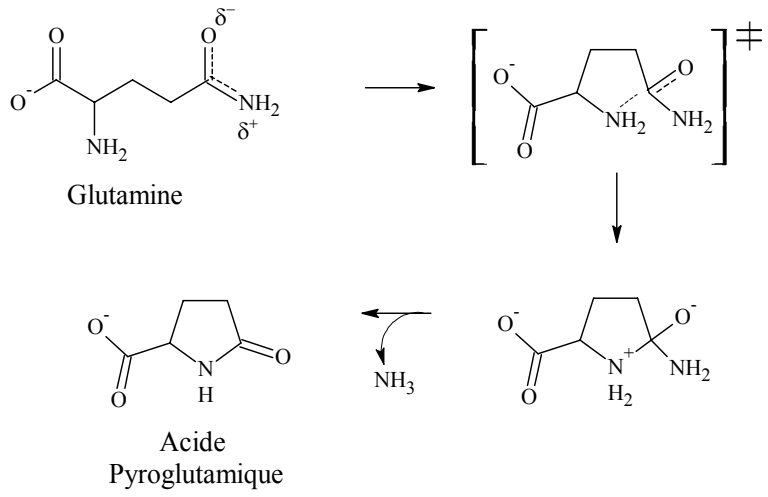


Figure 16 : Schéma de formation de l'acide pyroglutamique à partir de la glutamine (Schneider, *et coll.*, 2003).

b. Le 3-butenamide

Peu après la découverte de la formation d'acrylamide dans les aliments, des hypothèses sur la présence d'autres composés vinyles formés de façon analogue, comme le 3-butenamide, sont apparues (Weisshaar & Gutsche, 2002). Le 3-butenamide serait issu de la réaction entre la glutamine et un sucre ou composé dicarbonylé (Stadler*, et coll.*, 2003) (figure 17).



3-Butenamide Acrylamide

Figure 17 : Deux produits de réaction possibles à partir de la glutamine (3-butenamide) et de l'asparagine (acrylamide).

Stadler*, et coll.* (2003) ont étudié la formation du 3-butenamide à partir de mélange glutamine/glucose et glutamine/fructose issus de pyrolyses. Le 3-butenamide n'est détecté qu'à de faibles concentrations (3,5 à 7,5 µmol/mol glutamine) avec une température optimale relativement faible (120-140°C). Sur le chromatogramme présenté par ces auteurs, un autre pic apparaît : le 2-pyrrolidinone (figure 18). Cette molécule n'est pas spécifique de la glutamine puisqu'elle peut aussi être formée à partir d'acide glutamique. Enfin, en absence de sucre, seulement des traces de 2-pyrrolidinone sont détectées (< 10 µmol/mol acide aminé). Cette dernière molécule a été détectée dans les poudres de cacao, le café, les légumes séchés et les feuilles de tabac (Mende*, et coll.*, 1994).

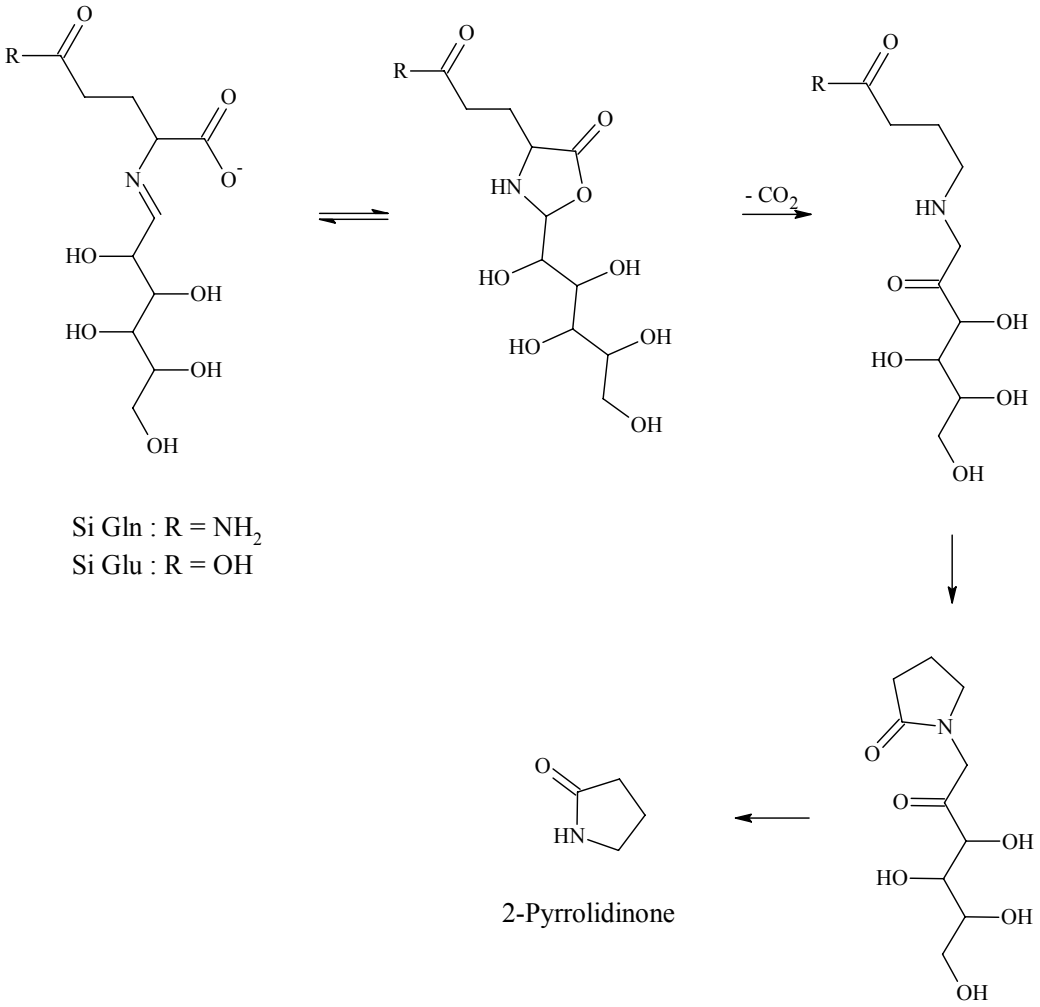


Figure 18 : Mécanisme de formation du 2-pyrrolidinone à partir de pyrolyse de glutamine-sucre ou acide glutamique-sucre proposé par Stadler, *et coll.* (2003).

c. Transamidification avec la lysine

Lors du traitement thermique des aliments à haute température et à faible activité d'eau, les protéines peuvent conduire à la formation de peptides tels que le γ-glutamyl-ε-lysine (GGL) par le biais d'une réaction de transamidification entre la fonction ε-NH_2 de la lysine et le groupement carboxamide de la glutamine (Bjarnason & Carpenter, 1970) (figure 19). Nous pouvons faire l'hypothèse que cette transamidification se produit également entre les deux acides aminés sous forme libre.

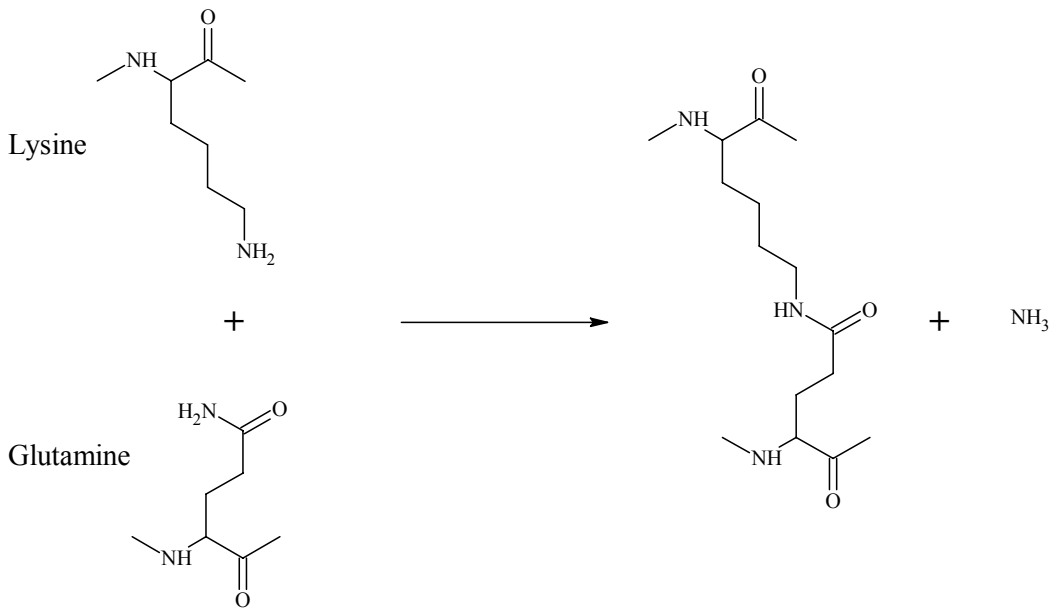


Figure 19 : Réaction entre l'ε-amine de la lysine et l'amide de la glutamine.

2. Les produits de dégradation non-spécifiques de la glutamine

De par son instabilité, la glutamine est une source non négligeable d'ammoniac dans les aliments. Il est connu depuis plus de 30 ans qu'à forte température l'ammoniac réagit avec les sucres réducteurs et les dicarbonyls pour former différents hétérocycles de type imidazole, pyrazine, piperazine et pyridine (Kort, 1970). Il a aussi été montré que l'acrylamide, qui semble principalement issu de la dégradation de l'asparagine libre, pouvait être synthétisé à partir de l'ammoniac et l'acide acrylique (Yasuhara*, et coll.*, 2003).

Ainsi la glutamine contribue indirectement à la formation d'acrylamide, d'hétérocycles azotés et autres produits de Maillard même si les composés ainsi formés ne sont pas spécifiques la glutamine. En effet, comme nous allons le voir à la fin de ce chapitre, les sources d'ammoniac sont nombreuses dans les aliments.

a. Les imidazoles

En 1967, Jezo émit l'hypothèse selon laquelle l'ammoniac pouvait former un produit d'Amadori avec le glucose (ou un produit de Heyns avec le fructose) (Jezo, 1967). La condensation de deux produits d'Amadori ou de Heyns, sans fragmentation préalable de l'hexose, serait alors à l'origine de la formation d'hétérocycles azotés. Une déshydratation suivie d'une isomérisation des doubles liaisons conduiraient enfin à la formation d'imidazoles (figure 20).

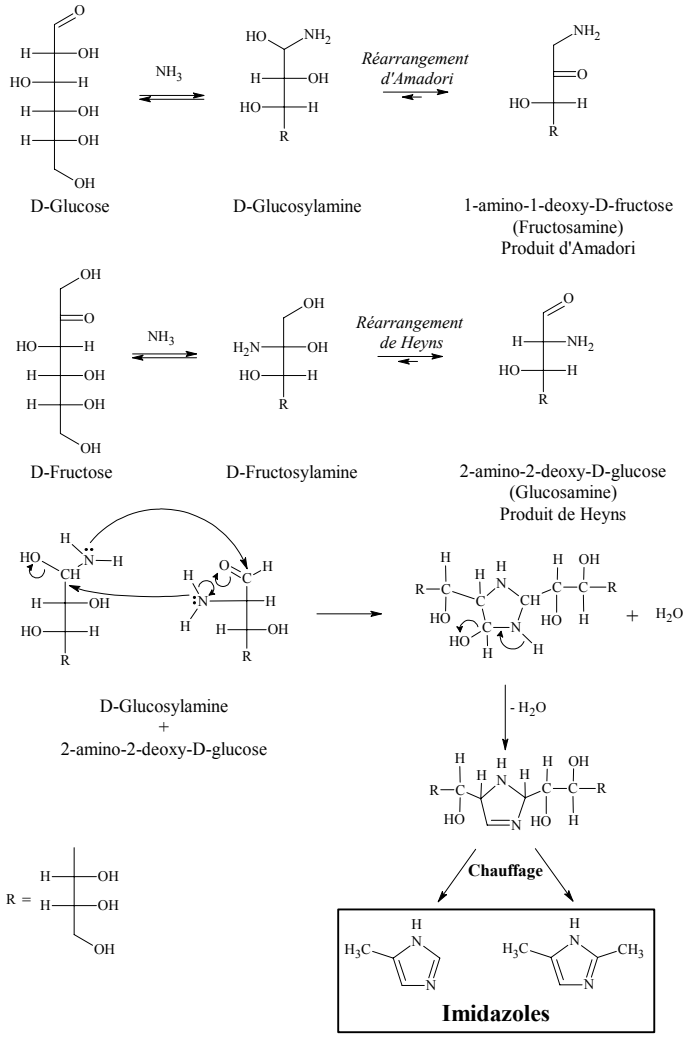


Figure 20 : Schéma de formation des imidazoles à partir d'ammoniac, de glucose et de fructose (Kort, 1970).

b. Les pyrazines

Le même schéma réactionnel impliquant l'ammoniac a été proposé pour la formation des pyrazines (figure 21). La présence importante de pyrazines dans les aliments soumis à un traitement thermique, et leurs propriétés organoleptiques recherchées par les industriels ont conduit plusieurs équipes scientifiques à étudier quels pouvaient être les précurseurs de ces arômes dans les matrices alimentaires. C'est ainsi que la réactivité de l'ammoniac, puis de la glutamine a été comparée à celle d'autres acides aminés.

Il y a presque 40 ans, Koehler*, et coll.* ont montré qu'en présence de sucre, la glutamine et l'asparagine formaient plus de pyrazines que leurs acides respectifs (Koehler*, et coll.*, 1969). Les auteurs de cette première étude conclurent alors que les fonctions amides de la glutamine et de l'asparagine étaient deux sources d'azote importantes pour la synthèse des pyrazines. Ils précisèrent que les sucres constituaient la principale source de carbone pour ces hétérocycles.

De nombreux auteurs ont comparé le modèle simple « sucre / ammoniac » aux modèles « sucre / acides aminés ». Ils ont tous observé que le rendement de synthèse des pyrazines était plus faible lorsque la source d'azote n'était que l'ammoniac. Ils ont également décrit des variations quantitative et qualitative de formation des principales pyrazines (pyrazine non substituée, 2-méthylpyrazine, diméthylpyrazines, 2-éthylpyrazine et 2,3,5-triméthylpyrazine) en fonction du type d'acide aminé chauffé. Cela montre que la glutamine et les autres acides aminés testés ont deux fonctions dans la formation des pyrazines : une fonction catalytique dépendante de l'amine impliquée dans la réaction et une fonction de générateur d'azote. Il semblerait que l'effet catalytique propre à chaque acide aminé soit associé à la formation spécifique de fragments de 2 ou 3 carbones à partir d'hexoses (rétroaldolisation puis condensation aldolique des acides carboxyliques dérivés des hexoses), suivi d'une formation des cycles de pyrazine. La formation de chaînes carbonées de longueurs variables serait à l'origine des différents groupements alkyles présents sur les pyrazines.

En théorie la glutamine et l'asparagine qui sont des acides aminés « donneur d'azote » devraient être les plus importants précurseurs de pyrazines et autres hétérocycles azotés. Mais Hwang*, et coll.* (1995a) ont été surpris d'observer sur des modèles simples que d'autres acides aminés tels que la lysine étaient plus réactifs. Cela semble indiquer que la sensibilité d'une amine à la réaction de Maillard est plus importante que la capacité d'un amide à être libéré sous forme d'ammoniac. Cependant il est intéressant de noter qu'une observation détaillée

des différentes pyrazines formées à partir de la glutamine montre la présence préférentielle de pyrazines bicycliques telles que les furanyl-pyrazines.

Hwang*, et coll.* (1993) se sont intéressés au mécanisme de formation des pyrazines à partir de la glutamine. Ils ont recherché quelle était l'origine des atomes d'azote des pyrazines formées en utilisant de la glutamine marquée à l'azote 15 sur la fonction amide. Après réaction à 180°C pendant 1 h entre la glutamine ou la glutamine-*amide*-^{15}N et le glucose, les résultats montrent qu'environ 80% des pyrazines formées sont issues de la fonction amide de la glutamine. Les auteurs de cette étude concluent que l'ammoniac formé par lactamisation est plus réactif que l'α-amine de la glutamine. Nous devons préciser que ceci est d'autant plus probable que l'α-amine est immédiatement inactivée par formation d'acide pyroglutamique.

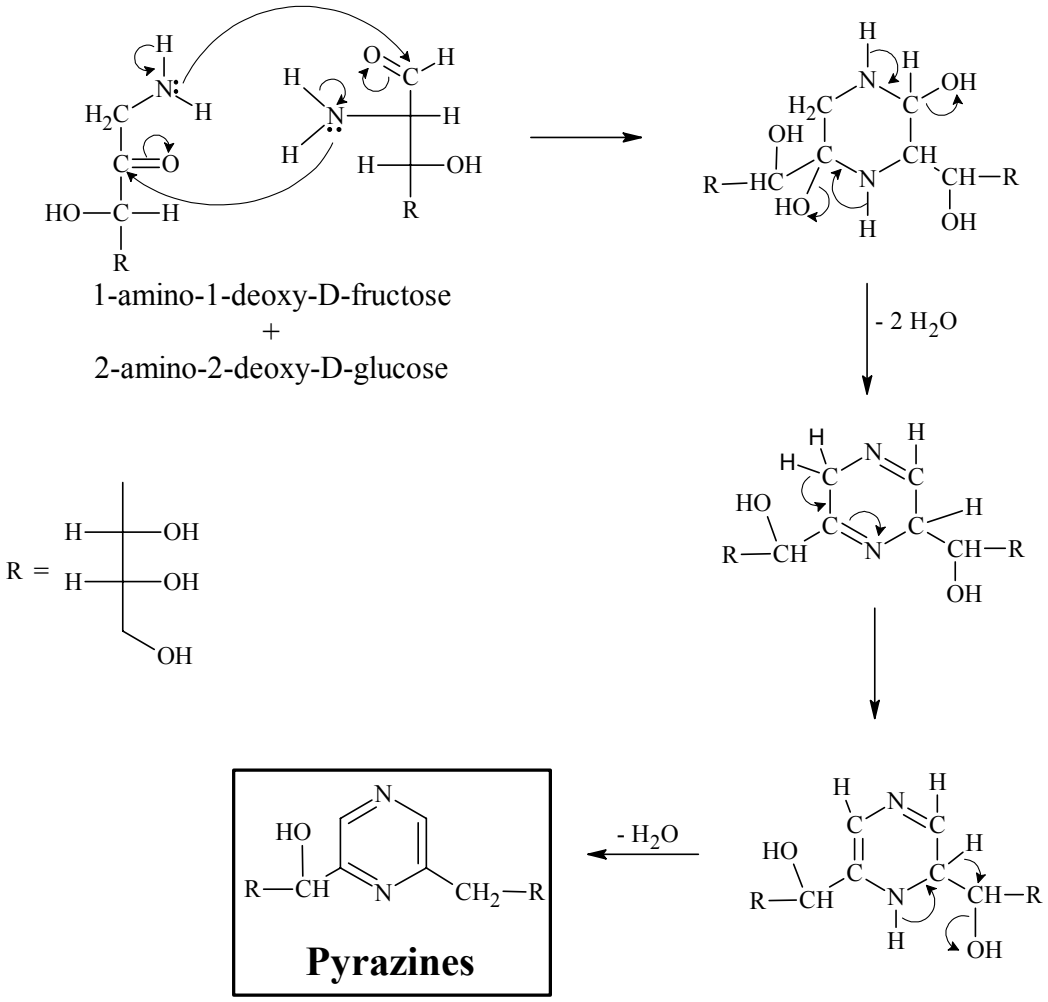


Figure 21 : Schéma de formation des pyrazines à partir d'ammoniac, de glucose et de fructose (Kort, 1970).

c. Les pyridines

Suyama & Adachi (1980) ont montré que la condensation entre des composés α-dicarbonylés et l'ammoniac issu de la dégradation d'acides aminés conduisait à la formation de pyridines. Baines & Moltkiewicz (1984) ont ensuite suggéré que la présence d'ammoniac était la condition déterminante pour la formation de pyridine. Cependant une étude de réactivité comparative publiée par Hwang*, et coll.* (1995b) montre que la glutamine ne forme pas plus de pyridines que l'acide glutamique. Ils en concluent que pour la synthèse de pyridines, l'α-NH_2 des acides aminés est préférée à l'ammoniac libéré par les fonctions amides.

d. L'acrylamide

Mottram*, et coll.* (2002) ont trouvé que de faibles quantités d'acrylamide pouvaient se former en présence de glutamine. Cependant le nombre de carbones de la chaîne latérale de cet acide aminé ne permet pas de former l'acrylamide selon la même voie que celle empruntée par l'asparagine. Dans ce cas c'est encore l'ammoniac libéré au cours de la dégradation de la glutamine qui contribue probablement à la production d'acrylamide.

En effet plusieurs études ont montré que l'ammoniac pouvait être à l'origine d'une partie de l'acrylamide formé dans les aliments au cours de la cuisson. Becalski*, et coll.* (2003) ont étudié deux voies de synthèse pour l'acrylamide (figure 22). La principale voie serait celle qui implique une réaction de Maillard suivie d'une dégradation de Strecker entre l'asparagine et le glucose (ou autres sucres réducteurs libres), deux molécules initialement présentes dans plusieurs matrices alimentaires telles que la pomme de terre (voir chapitre III : II, p 59). Selon la seconde voie, l'acrylamide serait formé à partir des produits d'oxydation des lipides et des composés azotés présents dans les aliments ou générés lors des traitements thermiques. Les triglycérides seraient dégradés thermiquement en acroléine qui, par oxydation, serait transformée en acide acrylique. Il a été montré que cet acide peut ensuite réagir avec l'ammoniac, issu de la dégradation de composés azotés du milieu, pour conduire à la formation d'acrylamide (Yasuhara*, et coll.*, 2003).

Afin de confirmer cette hypothèse, Yasuhara*, et coll.* (2003) ont étudié la formation d'acrylamide à partir de différents modèles de brunissement dont le mélange ammoniac/acide acrylique. Ils ont observé que la réaction entre l'acide acrylique et l'ammoniac à 180°C

produisait une quantité largement supérieure d'acrylamide comparée à la réaction entre l'asparagine et le glucose (190 000 µg/g ammoniac contre 1 200 µg/g asparagine).

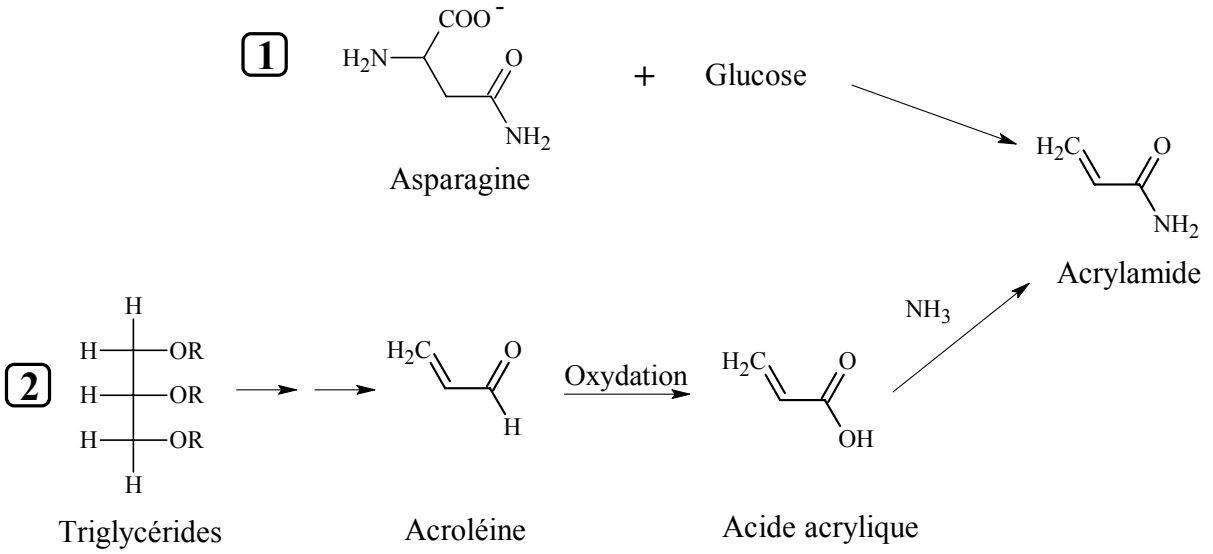


Figure 22 : Deux voies possibles de formation d'acrylamide (Becalski, *et coll.*, 2003).

Ensuite, ils ont testé l'influence de la température sur la formation d'acrylamide à partir d'un mélange ammoniac/acroléine. Les résultats obtenus sont repris dans la figure 23. Nous pouvons remarquer que de l'acrylamide est formé dès 25°C. Ensuite, la formation d'acrylamide augmente avec la température jusqu'à 180°C puis diminue à la température extrême de 200°C.

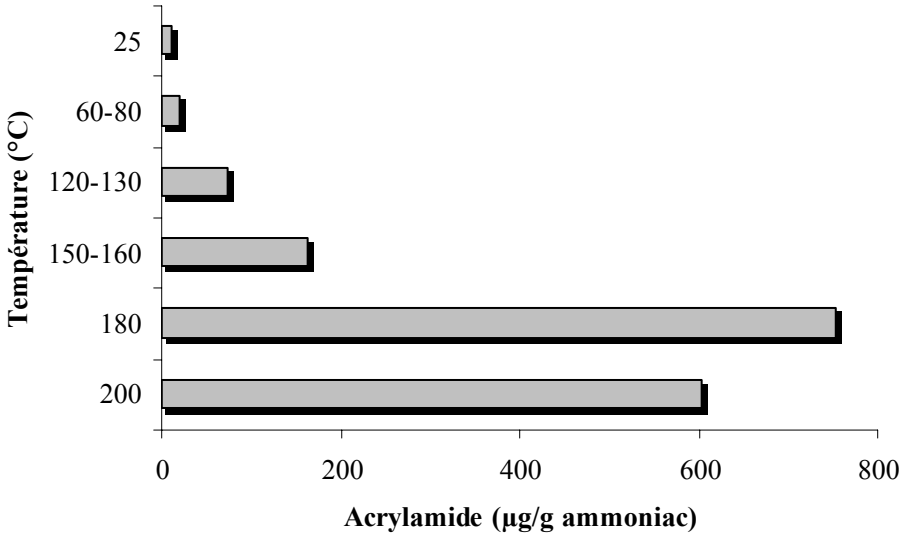


Figure 23 : Acrylamide formé à partir d'ammoniac et d'acroléine à différentes températures (Yasuhara*, et coll.*, 2003).

Même si les études *in vitro* semblent confirmer la formation d'acrylamide à partir des produits d'oxydation des triglycérides (voie n°2 de la figure 22), des analyses d'huiles de friture indiquent une faible formation d'acroléine.

Cette dernière observation suggère que la voie de formation d'acrylamide par l'ammoniac et l'acroléine n'est pas prédominante.

e. Les autres sources d'ammoniac

Nous venons de voir que la glutamine, en se dégradant, libère de l'ammoniac qui participe ensuite à de nombreuses réactions de Maillard. Cependant, la glutamine n'est certainement pas la seule source d'ammoniac dans les aliments. En effet, d'autres acides aminés libèrent de l'ammoniac plus ou moins rapidement lors de leur auto dégradation. Sohn & Ho (1995) ont testé 19 acides aminés à pH 8 chauffés pendant 2 h à 180°C. Quatre acides aminés, la glutamine, l'asparagine, l'acide aspartique et la cystéine, libèrent respectivement 100%, 125%, 60% et 82% d'ammoniac (pourcentage en mole d'NH_3 / mole d'acide aminé). Il n'est pas surprenant d'observer la formation d'ammoniac à partir des deux amides d'acides aminés acides qui subissent probablement une désamidation. Cependant, la libération d'ammoniac à partir de cystéine et d'acide aspartique chauffés à 180°C pendant 2 h montre

que les fonctions amines de ces deux acides aminés sont également thermolabiles. Ce n'est pas le cas des groupements α-NH_2 des autres acides aminés testés qui restent particulièrement stables dans les conditions de traitement thermique testées. Enfin, la libération importante d'ammoniac à partir de l'asparagine (environ 125%) indique que cet acide aminé subit une désamidation de sa fonction amide accompagnée d'une désamination partielle de sa fonction α-NH_2.

Dans le chapitre III : III (p 63) portant sur la formation d'acrylamide à partir de l'asparagine libre, nous avons vu qu'une seconde voie conduisait à la libération d'ammoniac par dégradation du 3-aminopropionamide (figure 15). Cette voie n'est pas considérée comme prépondérante dans la formation d'acrylamide, mais elle illustre parfaitement la possibilité de libération d'ammoniac au cours d'une réaction de Maillard. D'une façon générale, dans les aliments soumis à un traitement thermique, les acides aminés peuvent être modifiés par réaction de Maillard, puis dégradés par réaction de Strecker, entraînant une décarboxylation et une désamination qui constitue une source non négligeable d'ammoniac (Mottram, 1998).

L'urée qui est présente dans de nombreux produits alimentaires est également une source d'ammoniac. Cela a été particulièrement décrit dans les produits de la pèche car la conversion bactérienne de l'urée en ammoniac génère des arômes indésirables et altère la qualité globale des poissons au cours de la conservation (Cheuk & Finne, 1984). L'urée présente dans les produits carnés, principalement dans la viande de bœuf, semble aussi se dégrader en ammoniac par réaction chimique catalysée à forte température (Chen*, et coll.*, 2000). Une autre molécule présente dans les produits carnés, la carnosine, semble être une source importante d'azote pour la synthèse de composés aromatiques. Il est probable que cette contribution passe par la libération préalable d'ammoniac dans la matrice alimentaire (Chen & Ho, 2002).

Enfin d'autres sources d'ammoniac peuvent venir d'ingrédients ou d'additifs utilisés pour la préparation d'aliments transformés. C'est le cas de l'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) qui est un agent levant utilisé principalement en biscuiterie et pâtisserie. A forte température, l'hydrogénocarbonate d'ammonium se transforme en ammoniac, dioxyde de carbone et eau (figure 24).



Figure 24 : Décomposition de l'hydrogénocarbonate d'ammonium en ammoniac, eau et dioxyde de carbone.

L'implication de l'hydrogénocarbonate d'ammonium dans la formation d'acrylamide a été mis en évidence par Amrein*, et coll.* (2006). Ces auteurs montrent que la présence d'hydrogénocarbonate d'ammonium augmente la formation d'acrylamide d'un facteur 37 et 69 respectivement pour des incubations d'asparagine en présence de glucose et de fructose. Ils précisent que l'hydrogénocarbonate d'ammonium catalyse la formation de composés α-dicarbonylés. Par exemple, cet additif augmente de 30 fois la formation de glyoxal, précurseur principal de l'acrylamide. Ces travaux suggèrent que l'hydrogénocarbonate d'ammonium n'a qu'un rôle catalytique dans la formation de l'acrylamide par réaction de Maillard. Ceci avait déjà été prouvé par l'absence d'incorporation de l'azote de l'hydrogénocarbonate d'ammonium dans la structure de l'acrylamide (Amrein*, et coll.*, 2004). Il est intéressant de noter que lorsque l'hydrogénocarbonate d'ammonium est remplacé par un autre agent levant non azoté, l'hydrogénocarbonate de sodium, la quantité d'acrylamide se trouve diminuée de plus de 60%.

OBJECTIF

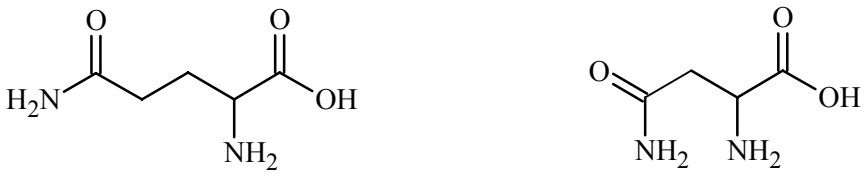
Nous venons de voir qu'il existe aujourd'hui des preuves incontestables du rôle clé joué par les acides aminés libres dans la formation de nombreux composés néoformés au cours du traitement thermique des aliments. L'implication des acides aminés libres dans la formation des arômes spécifiques des produits grillés a été largement étudiée, et quelques exemples existent du rôle que peuvent jouer certains acides aminés dans la production de molécules toxiques. Les amines hétérocycliques, qui contaminent les produits carnés très grillés, sont des composés mutagènes/cancérigènes issus de la réaction de Maillard entre les acides aminés libres, la créatine et les sucres réducteurs. L'asparagine, qui est un acide aminé libre présent en forte concentration dans la pomme de terre et autres produits végétaux, est le principal précurseur de l'acrylamide retrouvé dans de nombreux produits alimentaires.

Il apparaît aujourd'hui capital de surveiller de près l'ensemble des composés néoformés issus de la réaction de Maillard sur les acides aminés libres présents en concentration significative dans les matrices alimentaires. En particulier l'étude de la transformation de la glutamine au cours du traitement thermique des aliments nous paraît être une priorité.

Pourquoi s'intéresse-t-on à la réaction de Maillard appliquée à la glutamine libre ?

1. Nous avons montré dans la première partie de cette thèse que, tout comme l'asparagine, la glutamine libre était un acide aminé présent en forte proportion dans plusieurs matrices alimentaires de consommation courante.
2. On observe aussi que la glutamine possède une structure chimique très proche de celle de l'asparagine, avec deux azotes dont une fonction amide particulièrement fragile (figure 25).
3. Cet acide aminé est tout à fait intéressant car l'ammoniac libéré et l'α-NH_2 peuvent théoriquement participer indépendamment à de nombreuses réactions de Maillard.
4. Enfin, à notre connaissance, encore trop peu d'études se sont intéressées au devenir de la glutamine dans les aliments. Les produits volatils issus de l'ammoniac, de type alkylpyrazine, ont été très bien étudiés (extraction par solvant, distillation fractionnée, espace de tête statique…) et identifiés (principalement par GC-MS) au cours des années passées. Par contre il n'en est pas de même pour les composés non volatils. Il nous semble donc important d'approfondir l'étude de ces molécules formées par réaction de Maillard

directement avec la glutamine ou avec l'ammoniac, comme produit de dégradation de cet acide aminé.



Glutamine Asparagine

Figure 25 : Schéma de la glutamine et l'asparagine.

Notre objectif a donc été de rechercher, d'isoler et de caractériser les principaux produits de Maillard non volatils issus de la glutamine et de l'ammoniac libéré lors de sa dégradation.

Pour valider le rôle significatif de la glutamine dans la formation de composés de Maillard, nous avons dans un premier temps comparé la formation de composés bruns ou fluorescents induite par réaction de Maillard sur différents acides aminés dont la glutamine et l'ammoniac. La forte instabilité de la glutamine et sa dégradation préférentielle en acide pyroglutamique et ammoniac nous a conduit à comparer la formation de ce dernier à partir de différentes molécules azotées également présentes dans les aliments.

Sur des modèles simples nous avons ensuite recherché quels étaient les principaux fluorophores et chromophores issus de la réaction de Maillard sur la glutamine. Nous commencerons par exposer les résultats obtenus en présence d'un dicarbonyle très réactif : le méthylglyoxal. Dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats de notre recherche portant sur les produits de Maillard formés en solution entre la glutamine et le glucose.

Enfin, les molécules identifiées, l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique et les poly-hydroxyalkyl-pyrazines, seront recherchées dans une matrice particulièrement riche en glutamine : la tomate et ses produits dérivés. Cette recherche sera également effectuée dans des biscuits du commerce plus ou moins riches en hydrogénocarbonate d'ammonium. Cela permettra de vérifier que des molécules synthétisées et découvertes dans des modèles simples sont effectivement présentes dans des denrées alimentaires riches en glutamine ou ammoniac.

PARTIE II
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I : PRODUITS CHIMIQUES ET INSTRUMENTATION

I. LES PRODUITS CHIMIQUES

La plupart des produits utilisés pour nos expériences proviennent de Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). La L-glutamine, la L-asparagine, l'acide L-glutamique, l'acide pyroglutamique, le méthylglyoxal 40% en solution aqueuse, le chlorure d'ammonium ^{15}N, le phthaldialdehyde (OPA), le 2-mercaptoéthanol, le Brij 30® sont tous des réactifs de qualité analytique.

Le méthanol, l'acétonitrile, le propan-2-ol et l'hexane fournis par Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France) sont de pureté compatible avec la chromatographie liquide. L'acide formique 98/100%, l'ammoniac à 35%, l'acide acétique glacial et le D-fructose sont également fournis par Fisher Bioblock Scientific. Pour les analyses LC-MS, une eau ultra-pure de qualité HPLC a été commandée chez VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Le 1,4-dioxane, l'urée, le D-glucose, le dihydrogénophosphate de sodium et l'hydrogénophosphate de sodium proviennent du même fournisseur.

Le glucose marqué au ^{13}C sur les six carbones et l'eau deutériée 99,97% sont fournis par Euriso-Top (Saint-Aubin, France) et la glutamine marquée à l'azote ^{15}N sur l'α-amine par CortecNet (Paris, France).

Enfin, l'eau déminéralisée exempte de matières organiques, nécessaire à la préparation des tampons et des éluants HPLC (à l'exception des éluants destinés à la LC-MS), est obtenue après filtration sur un système Elga Purelab UHQ II.

II. LES TAMPONS

Les tampons phosphates choisis sont des sels de sodium. Ce cation est le principal électrolyte des matrices extracellulaires, à l'inverse du potassium qui est principalement retrouvé dans les compartiments intracellulaires. Pour nos modèles expérimentaux, il est donc préférable d'utiliser un sel de sodium.

Pour obtenir le pH souhaité (5 ; 7,4 ou 9), nous ajoutons plus ou moins de solution de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) 200 mM à une solution d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) 200 mM sous agitation. La concentration des tampons phosphates ainsi formés est de 200 mM. Elle peut être diminuée par simple dilution avec de l'eau déminéralisée sans changement de pH.

III. PREPARATION DE MODELES SIMPLES

Les modèles simples sont préparés à partir de différentes solutions mères d'acides aminés, de sucres, de méthylglyoxal. Ils sont ensuite incubés dans des tubes en Pyrex (SVL) d'une capacité de 10 mL. Ces tubes sont compatibles pour des chauffages à haute température comme 180°C. Les incubations sont réalisées en triple exemplaire et se déroulent, selon les expériences, soit dans un bain d'huile pouvant atteindre une température de 200°C, soit dans une étuve ventilée pour des périodes de chauffage plus longues. Après incubation, ces tubes sont refroidis dans la glace pendant 10 min puis préparés pour analyse.

IV. FILTRATION DES ECHANTILLONS ET DES SOLVANTS POUR HPLC

Chaque échantillon issu de modèles simples ou d'extraction de matrices alimentaires complexes, est filtré sous vide à travers une membrane de nylon ayant une porosité de 0,45 µm (CIL Cluzeau Info Labo, Sainte Foy La Grande, France).

Les solvants utilisés comme phase mobile en chromatographie liquide sont systématiquement filtré sur polypropylène hydrophile de diamètre 47 mm et de porosité 0,45 µm (référence : 514-4052 ; VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Ces filtres sont résistants aux acides et aux solvants organiques, cependant l'analyse LC-MS de solvants filtrés par cette technique indique une légère contamination venant des filtres utilisés. Cette contamination entraîne en spectrométrie de masse une élévation du bruit de fond incompatible avec une analyse de haute résolution. La filtration des solvants est donc limitée aux analyses chromatographiques couplées aux détecteurs à barrette de diode et de fluorescence.

V. HPLC/UV-FLUO

Les analyses HPLC sont réalisées sur un système Thermo Separation Products (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France) composé d'un dégazeur de solvants, d'une pompe binaire gradient P2000, d'un injecteur automatique AS3000 couplé à un détecteur UV2000 (Thermo Electron, Courtaboeuf, France) et un détecteur par fluorescence 2475 (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France). L'acquisition des chromatogrammes est réalisée à l'aide du logiciel ChromQuest. Un thermostat intégré régule la température des colonnes C18 utilisées. Les séparations chromatographiques sont généralement réalisées à une température de 20°C, à l'exception des analyses LC-MS qui sont effectuées à 35°C. Pour toutes les analyses réalisées en HPLC (avec détection par absorbance, par fluorescence ou par spectrométrie de masse), le volume d'échantillon injecté est 10 µL. Dans le cas où ce volume est différent, il sera alors indiqué.

VI. COLLECTEUR DE FRACTION

Certaines molécules sont purifiées par HPLC analytique ou semi-préparative. Dans ce cas un collecteur de fraction Gilson programmé en temps est placé à la sortie du détecteur. Des tubes en polypropylène (référence : 212-1811 ; VWR International, Fontenay-sous-Bois,

France) de 5 mL y sont alignés pour collecter les différentes fractions. Pendant la collecte, les échantillons sont conservés à 20°C, à l'abri de la lumière et de la poussière. En fin de collecte, les échantillons sont soit concentrés à l'aide d'un Speed-Vac (voir chapitre I : X, p 90) soit conservés à + 4°C jusqu'à concentration.

VII. LC-MS

Les analyses HPLC/MS sont réalisées sur un système Surveyor (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France) composé d'une pompe quaternaire MS Pump Plus et d'un injecteur automatique Autosampler Plus couplé à un détecteur à barrette de diode PDA Plus et un spectromètre de masse Finnigan LTQ.

1. Généralités sur le spectromètre de masse LTQ

Le spectromètre de masse LTQ est une trappe d'ions linéaire, aussi appelée trappe d'ions à deux dimensions en comparaison avec la trappe d'ions classique à trois dimensions (quadripôle circulaire). Cette nouvelle technologie offre de nombreux avantages. Elle permet principalement un meilleur piégeage des ions et une plus grande capacité de la trappe linéaire. Son double système de détection des ions et l'optimisation du système électronique associé augmentent aussi le nombre de scans applicables, par exemple, sur un pic chromatographique. Globalement, l'augmentation de la sensibilité de la trappe d'ions nous permettra non seulement d'identifier la structure de nouvelles molécules issues de la réaction de Maillard, mais également de faire des analyses quantitatives de ces mêmes produits dans des matrices alimentaires.

Le spectromètre de masse LTQ 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 (figure 26).

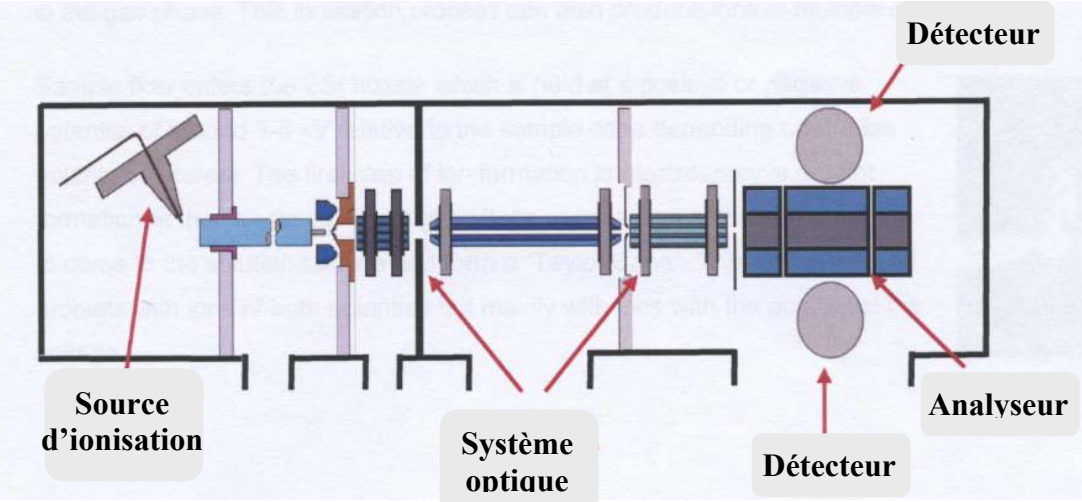


Figure 26 : Schéma simplifié du spectromètre de masse LTQ (Thermo Electron Corporation).

2. La source d'ionisation par électrospray

Le couplage que nous avons choisi entre l'HPLC et la spectrométrie de masse est l'ionisation par électrospray (ESI). Ce mode d'ionisation est en effet parfaitement adapté à l'analyse des petites molécules (< 2 000 daltons) chargées plus ou moins polaires que nous recherchons dans ce travail. La source ESI est une forme douce d'ionisation qui transforme les molécules transportées par l'éluant de la chromatographie en ions dans une phase gazeuse. Précisons que de nombreux ions sont déjà formés dans la phase mobile de la chromatographie (principalement les amines à pH acide et les acides carboxyliques à pH basique), et que l'ESI ne contribue alors qu'à la désolvatation néanmoins indispensable à l'entrée des ions dans la trappe.

L'ionisation et la désolvatation des molécules sont réalisées à l'aide d'un voltage élevé (de 3 à 5 kV) appliqué autour du capillaire de l'ESI. Un double balayage de gaz inerte (N_2), constitué d'un gaz fourreau et d'un gaz auxiliaire, permet une meilleure nébulisation du spray et complète la désolvatation.

3. Les solvants et les débits d'élution chromatographique sélectionnés pour nos analyses LC-MS

Pour une meilleure ionisation, le ou les éluant(s) d'HPLC sont sélectionnés en fonction des molécules que nous pensons former dans nos modèles simples de réaction de Maillard. Même si certains produits de Maillard possèdent des fonctions carboxyliques, la plupart d'entre eux ont une charge positive en milieu acide, portée par une ou plusieurs amines. C'est pour cette raison que toutes nos analyses LC-MS se font avec un éluant composé d'acide formique à la concentration de 0,1% dans de l'eau de qualité HPLC. L'acide formique est un donneur de proton qui devrait permettre une meilleure ionisation des molécules recherchées. Sa forte volatilité en fait aussi un solvant de choix pour cette technique d'analyse chimique. Enfin il a été montré que l'ajout d'un éluant organique augmentait la sensibilité de la spectrométrie de masse, c'est pourquoi nous ajoutons à l'éluant aqueux d'acide formique un pourcentage plus ou moins important d'acétonitrile compris généralement entre 5 et 50% (volume/volume). L'acétonitrile a un autre intérêt pour nos analyses puisque ce solvant est également utilisé pour optimiser la séparation chromatographique sur colonne de phase inverse C18. Les gradients de solvants utilisés pour les différentes séparations chromatographiques seront détaillés dans les chapitres suivants.

Contrairement à l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), l'ESI est peu compatible avec des débits élevés d'éluant HPLC. Les séparations chromatographiques sont donc réalisées sur des colonnes de faible diamètre (2 mm) avec un débit qui ne dépasse pas 300 µl/min. Dans ces conditions, la température du capillaire de l'électrospray est fixée entre 250 et 400°C, et les débits de gaz fourreau et auxiliaire sont respectivement ajustés entre 45 et 60, et entre 5 et 10 unités arbitraires.

4. La trappe d'ions linéaire (l'analyseur de masse)

Dans la trappe d'ions linéaire, les ions sont piégés en direction axiale et radiale à l'aide de voltages appliqués sur les quadripôles. Le confinement, ou refroidissement, des ions dans la trappe est amélioré en introduisant un gaz tampon (He) qui réduit l'énergie cinétique des ions sans pour autant induire leur fragmentation.

Pour entraîner une fragmentation, un voltage d'intensité et de durée définies (énergie de collision et temps d'activation) est appliqué sur une espèce ionique présélectionnée et

isolée dans la trappe. Dans ce cas, l'énergie cinétique des ions est rapidement transformée en énergie de vibration, elle-même amplifiée par les collisions successives entre les ions et les atomes d'hélium présents dans la trappe. C'est ainsi que les ions se fragmentent en libérant préférentiellement les fonctions chimiques reliées par des liaisons covalentes relativement fragiles. Cette technique, appelée MS/MS ou MS^2, permet de sélectionner un ion et de le fragmenter pour obtenir des informations sur sa structure chimique. Théoriquement, cette étape peut être répétée *n* fois dans une trappe d'ion, on parle alors de MS^n. Mais en pratique nous n'utilisons cette technique de fragmentation rarement plus de deux fois (MS^3) sur les molécules issues de la réaction de Maillard. La première fragmentation se fait sur les ions parents (ion pseudo-moléculaire) puis la deuxième et la dernière fragmentation se font sur les fragments de MS/MS.

Les trappes d'ions fournissent une énergie de collision généralement plus faible que les quadripôles. Cela a pour inconvénient de limiter le nombre de fragments à partir d'un ion pseudo-moléculaire. On observe souvent la perte unique d'une molécule d'eau, ce qui n'est pas d'une grande utilité pour identifier la structure chimique d'une molécule inconnue. Comme le montre le spectre de MS/MS de la figure 27 A, l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, produit de Maillard découvert dans plusieurs de nos modèles simples (m/z = 168), ne donne qu'un seul fragment (m/z = 150) avec une perte de – 18 unités de masse équivalente à l'élimination d'une molécule d'eau. Pour obtenir une fragmentation plus poussée, une analyse MS^3 est souvent proposée. Cependant nous avons décidé d'utiliser une méthode plus directe disponible sur le spectromètre de masse LTQ : l'activation de bande large (*Wideband activation* en anglais). Cette méthode permet d'exciter et de fragmenter tous les ions de masse située entre celle de l'ion pseudo-moléculaire étudié $[M+H]^+$ et la masse $[M+H-18]^+$. Cela conduit à une re-fragmentation systématique de l'ion fils $[M+H-H_2O]^+$ lorsqu'il est formé, et permet d'obtenir une fragmentation plus complète et plus riche en informations structurales. Cette pseudo-MS^3 est illustrée par le spectre de masse de la figure 27 B sur lequel nous observons trois fragments majoritaires (m/z = 122, 106 et 94) qui n'étaient pas détectables après simple MS/MS. Précisons que le premier fragment $[M+H-H_2O]^+$ de m/z égale à 150 n'est plus détectable sur ce spectre puisqu'il a été soumis à une seconde fragmentation dans la trappe d'ions.

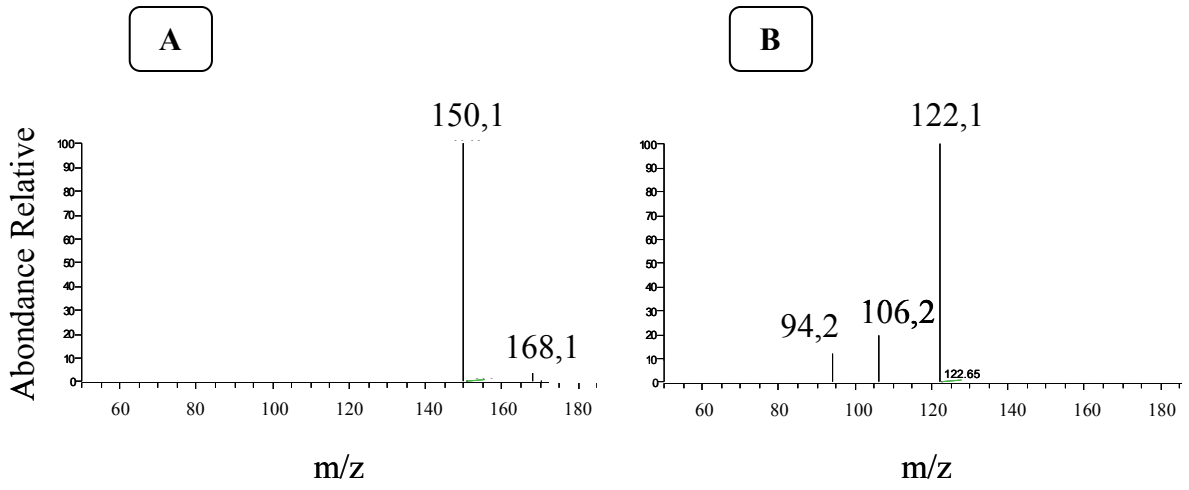


Figure 27 : Spectres de masse MS /MS sur l'ion m/z 168 avec (B) ou sans (A) activation de bande large.

VIII. MS-Q-TOF

Pour déterminer les formules brutes des molécules isolées, des analyses sur spectromètre de haute résolution MS-Q-TOF (Waters-Micromass) ont été réalisées par le docteur Serge Pilard à la Plateforme Analytique de l'Université de Picardie Jules Verne d'Amiens. Ces analyses réalisées aussi bien en mode positif (à pH acide) qu'en mode négatif (à pH basique) permettent d'obtenir les masses exactes des ions parents et des fragments.

IX. AUTRES SPECTROMETRIES

Les spectres de fluorescence et les mesures de fluorescence globale sont obtenus à l'aide d'un spectrofluorimètre Cary Eclipse (Varian, Les Ulis, France).

L'absorbance à 420 nm est mesurée par un spectrophotomètre Beckman DU500 (Beckman-Coulter France, Villepinte, France).

X. EVAPORATION-CONCENTRATION

Les échantillons collectés par chromatographie semi-préparative sont concentrés à l'aide d'un Speed-Vac (Thermo Savant, Courtaboeuf, France). Cette méthode permet d'éliminer les solvants d'HPLC (acide formique, eau et acétonitrile). Leur évaporation est réalisée à l'aide un système combiné de centrifugation, de vide et de chauffage. La centrifugation mise en œuvre autour de 400 g permet de maintenir les échantillons non volatiles dans les tubes de collecte. Le vide est utilisé pour évaporer les solvants et les entraîner vers un piège (- 50°C) où ils seront condensés à l'état solide. Enfin, une enceinte chauffée permet d'accélérer l'évaporation des solvants. Cependant en absence d'information sur la stabilité thermique des molécules que nous avons isolées, nos échantillons ne seront concentré qu'à température ambiante.

XI. SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

Cette technique utilise les propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique. Si le composé est suffisamment pur et en quantité suffisante, la RMN permet d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Il est possible d'utiliser la RMN du proton (^{1}H), du carbone (^{13}C), de l'azote (^{15}N) ou encore du phosphore (^{31}P). La faible abondance du ^{13}C dans la nature (environ 1,1%) rend la RMN du carbone peu sensible mais toutefois réalisable la plupart du temps si la concentration de l'échantillon est suffisante.

Les analyses RMN ont été réalisées à la Plateforme Analytique de l'Université de Picardie Jules Verne d'Amiens (par D. Cailleu et D. Mathiron) sur un spectromètre Bruker Avance 500 NB (petit trou) à 500,13 MHz pour le ^{1}H et 125,77 MHz pour le ^{13}C doté d'une sonde inverse triple noyau ^{1}H, ^{13}C et ^{15}N, de 5 mm. L'appareil fonctionne par accumulation de FIDs qui sont ensuite moyennés afin d'améliorer le rapport signal/bruit. Cela permet d'acquérir des spectres exploitables avec de faibles quantités d'échantillon. Les signaux obtenus nous fournissent des déplacements chimiques, référencés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les spectres sont traités à l'aide du logiciel X Win NMR de Bruker.

1. Spectres RMN à une dimension (1D)

Nous avons réalisé la RMN du proton sur les composés dissous dans de l'eau deutériée (D_2O, 99,97%) afin que les signaux du solvant interfèrent le moins possible avec ceux de la molécule à étudier.

Les spectres RMN du proton sont réalisés avec un angle de basculement de 90° d'une durée de 7 µs et un temps de relaxation de 4,3 s pour un temps d'acquisition 3,3 s. Une séquence de présaturation de type zgpr de Bruker a été également utilisée pour supprimer le signal lié aux protons résiduels du solvant. Elle consiste à effectuer une impulsion de 180° qui inverse toutes les magnétisations. Après une à deux secondes (temps insuffisant pour que l'eau revienne à son état initial mais suffisant pour les autres signaux), une impulsion de 90° est réalisée pour la lecture des signaux. Les données sont collectées en utilisant 32K points.

2. Spectres RMN à deux dimensions (2D)

L'utilisation de techniques de RMN à deux dimensions (^1H-^1H ou ^1H-^{13}C) permet de corréler les protons et les carbones entre eux et facilite grandement leur identification.

a. Spectres RMN à deux dimensions homonucléaires

Ces expériences mettent en évidence les corrélations existantes entre les différents protons d'une molécule. Parmi les différentes techniques existantes, nous avons réalisé une expérience COSY (COrrelated SpectroscopY) qui permet d'observer le couplage ${}^{n}J_{H\text{-}H}$ (n = 2, 3, 4) entre deux protons portés par des carbones voisins.

b. Spectres RMN à deux dimensions hétéronucléaires

Nous avons mis en œuvre une expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) qui met en évidence les corrélations hétéronucléaires entre les noyaux de ^{13}C et les protons qu'ils portent en observant les couplages $^{1}J_{C-H}$. Ce type d'approche permet d'identifier les signaux des différents carbones lorsque l'attribution des protons a été faite.

CHAPITRE II : METHODES

I. DOSAGE DES ACIDES AMINES

1. Principe

Le dosage d'acides aminés par HPLC nécessite une dérivation pré- ou post-colonne chromatographique. La dérivation par l'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA) est une dérivation pré-colonne qui, en diminuant le caractère hydrophile des acides aminés, permet leur rétention et leur séparation chromatographique sur colonne de phase inverse. Cette dérivation permet également une détection sensible des acides aminés dérivés par fluorescence. La réaction de dérivation est présentée dans la figure 28.

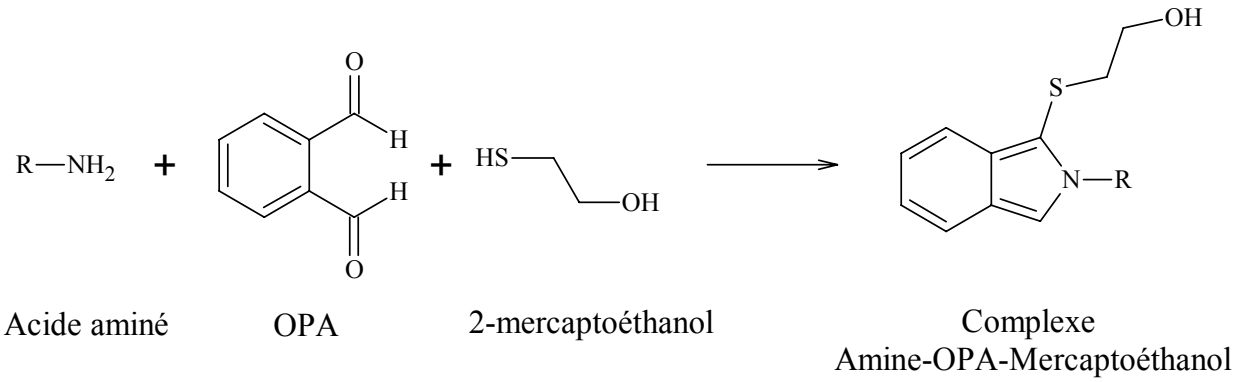


Figure 28 : Schéma de dérivation d'un acide aminé avec l'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA) et le 2-mercaptoéthanol.

2. Protocole

a. Préparation des différentes solutions

Réactif OPA-mercaptoéthanol –Vingt cinq milligrammes d'OPA sont dissous dans 625 µL de méthanol dans un tube de 10 mL en polypropylène. Après dissolution complète, 5,6 mL de tampon borate 400 mM pH 9,5 et 25 µL de 2-mercaptoéthanol sont ajoutés. Cette solution ainsi préparée est stable pendant 2 mois à 4°C. Chaque semaine, 25 µL de 2-mercaptoéthanol doivent être ajoutés pour maintenir la concentration de ce solvant sulfuré dans la solution d'agents dérivants. Précisons que le 2-mercaptoéthanol est un produit dangereux. Sa manipulation se fait donc sous hotte ventilée avec des gants et des lunettes de protection.

Solution Brij – Une solution Brij est préparée en ajoutant 1 mL de surfactant Brij 30® (polyoxyethylene 4 lauryl ether) à 14 mL de tampon borate 400 mM pH 9,5.

Un tampon phosphate 400 mM pH 4,3 est également préparé à partir de dihydrogénophosphate de sodium.

Solution de dérivation – Enfin, la solution de dérivation qui doit être préparée quotidiennement, est composée d'un mélange équivolumique de réactif OPA-mercaptoéthanol et de solution Brij.

b. Dérivation

Vingt microlitres de solution de dérivation sont ajoutés à 10 µL d'échantillon ou standard d'acide aminé dans un insert de 250 µL, puis mélangés à l'aide d'un vortex. Après 60 s de réaction à température ambiante, 50 µL de tampon phosphate sont ajoutés. Dix microlitres d'échantillon ainsi préparés sont injectés dans les 60 s qui suivent l'addition du tampon. En absence de système de dérivation pré-colonne automatisé, la forte instabilité des dérivés fluorescents formés (complexes Amine-OPA-Mercaptoéthanol) nous oblige à faire des analyses de façon extemporanée. Des solutions standards de concentrations croissantes sont injectées (trois répétitions de 10 µL) pour obtenir une droite d'étalonnage.

c. Conditions chromatographiques

Les échantillons sont injectés sur colonne Adsorbosphere OPA-HR, de dimensions 150 x 4,6 mm avec une granulométrie de 5 µm (Alltech, France). La phase mobile, composée de 90 % (v/v) d'un mélange A d'acétate de sodium 25 mM pH 5,9 (92,5% v/v), de 1,4-dioxane (4,5% v/v) et de propan-2-ol (3% v/v) et de 10% d'un mélange B de méthanol (97% v/v), de 1,4-dioxane (1,5% v/v) et de propan-2-ol (1,5% v/v), est éluée à un débit de 1 mL/min. Ce type d'élution ou les deux éluants demeurant toujours à la même concentration (mode isocratique) est utilisé pour la quantification de la glutamine dans nos modèles simples de réaction de Maillard. Par contre un mode gradient détaillé dans le tableau 3 a été développé pour l'analyse de la glutamine dans les matrices alimentaires. Les acides aminés dérivés sont détectés par fluorescence aux longueurs d'onde respectives d'excitation et d'émission de 325 et 465 nm (Gain = 6 et EUFS = 4 000).

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
9	93	7
15	82	18
20	15	85
23	100	0
30	100	0

Tableau 3 : Gradient d'élution pour l'analyse de la glutamine dans les matrices alimentaires (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps).

d. Exemple de chromatogramme

Avec le gradient présenté ci-dessus (tableau 3), un standard de glutamine est élué et détecté à un temps de rétention de 8,3 min (figure 29 A). Dans une matrice complexe, constituée de différents acides aminés, la glutamine est également détectée à 8,3 min. La bonne résolution du système chromatographique permet une excellente séparation des différents acides aminés dérivés (figure 29 B).

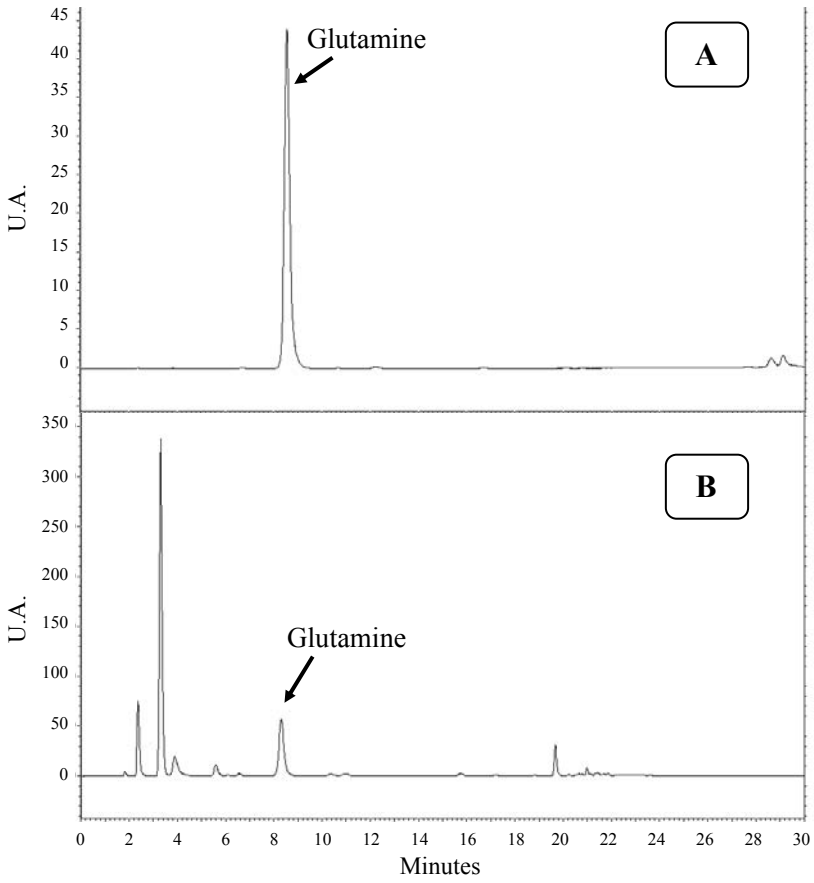


Figure 29 : Analyses chromatographiques d'un standard de glutamine (A) et d'un extrait de tomate fraîche (B) après dérivation à l'OPA (détection par fluorescence à $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 325/465nm).

II. DOSAGE DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE

1. Principe

L'acide pyroglutamique est isolé par chromatographie en phase inverse et détecté par absorbance à 214 nm et par spectrométrie de masse. L'absence de fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire ne permet pas de quantifier l'acide pyroglutamique par MS-MS.

2. Protocole

a. Conditions chromatographiques

Le dosage de l'acide pyroglutamique est réalisé par RP-HPLC-UV-MS sur un système Surveyor (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France) décrit en détail dans le chapitre I : VII. L'analyse est effectuée sur une colonne Luna C18(2) de format 150 x 2,0 mm, avec une granulométrie de 5 µm et une porosité de 100 Å (Phenomenex, Le Pecq, France). La phase mobile est éluée à un débit de 0,3 mL/min avec un gradient linéaire (tableau 4) commençant avec 100% d'acide formique (0,1% v/v dans l'eau de qualité LCMS) pour atteindre en 7 min un mélange composé de 95% d'acide formique (0,1% v/v dans l'eau ; éluant A) et de 5% d'acide formique dans l'acétonitrile (0,1% v/v ; éluant B). La détection du pyroglutamate se fait en UV à la longueur d'onde de 214 nm et par MS en isolant l'ion $[M+H]^+ = 130$. Les paramètres de l'électrospray sont les suivants : débit de gaz fourreau = 40 U.A. ; débit de gaz auxiliaire = 10 U.A. ; voltage du spray = 5 kV ; température du capillaire = 275°C.

Des standards d'acide pyroglutamique de concentrations croissantes sont injectés (trois répétitions de 10 µL) pour obtenir une droite d'étalonnage.

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
7	95	5
7,5	95	5
10	50	50
15	50	50
17	100	0
22	100	0

Tableau 4 : Gradient d'élution pour l'analyse de l'acide pyroglutamique (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps).

b. Exemple de chromatogramme

Dans les conditions énoncées ci-dessus, l'acide pyroglutamique est élué entre 2,8 et 4 min comme présenté dans la figure 30.

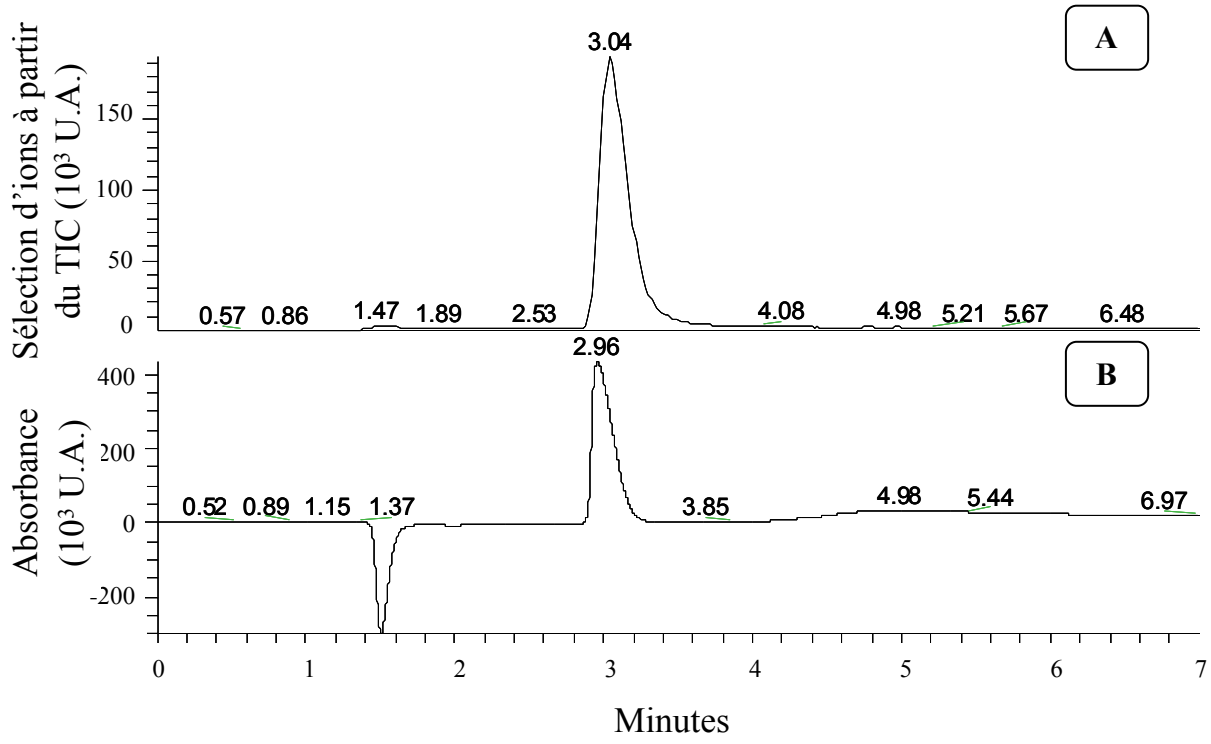


Figure 30 : Chromatogramme d'un standard d'acide pyroglutamique. Détection par MS en isolant l'ion de m/z 130 (A) et en UV à 214 nm (B).

III. DOSAGE DE L'AMMONIAC

1. Principe

La teneur en ammoniac d'une solution est mesurée par électrochimie à l'aide d'une électrode spécifique (modèle 95-12) couplée à un analyseur EA940 Orion Research (Thermo Orion, Beverly, MA, Etats-Unis).

L'électrode de mesure d'ammoniac possède une membrane hydrophobique qui permet de séparer la solution à analyser de l'électrolyte placé à l'intérieur de l'électrode. Cette membrane est par contre perméable à l'ammoniac dissous qui va se déplacer de l'échantillon vers l'électrolyte jusqu'à obtention d'une pression partielle identique des deux cotés de la membrane. L'électrode de mesure d'ammoniac répond ainsi à la pression partielle de l'ammoniac dissous en milieu aqueux. D'après la loi de Henry, la pression partielle de l'ammoniac dissous est proportionnelle à sa concentration :

$$[NH_3]_{aqueux} = K_h \times P_{NH3}$$

Avec $[NH_3]_{aqueux}$ = concentration de l'ammoniac dissous ; K_h = constante de Henry ; P_{NH3} = pression partielle en ammoniac

C'est ainsi que peut être dosé l'ammoniac dans une solution aqueuse. Précisons que la constante de Henry, K_h, varie en fonction de la température et de la force ionique du milieu à analyser.

2. Protocole

L'électrode 95-12 ne peut mesurer que l'espèce ammoniac en solution. Aussi il est important de transformer tous les ions ammonium (NH_4^+) en ions ammoniac (NH_3) dans les échantillons à analyser. Au pH de nos modèles simples de dégradation d'amine (généralement entre 5 et 10), seule une partie de l'ammoniac se trouve sous forme NH_3. Les échantillons sont donc systématiquement ajustés à pH 12 à l'aide d'une solution de soude 10 M avant dosage. La figure 31 montre qu'à ce pH la conversion des ions ammonium en ammoniac est totale.

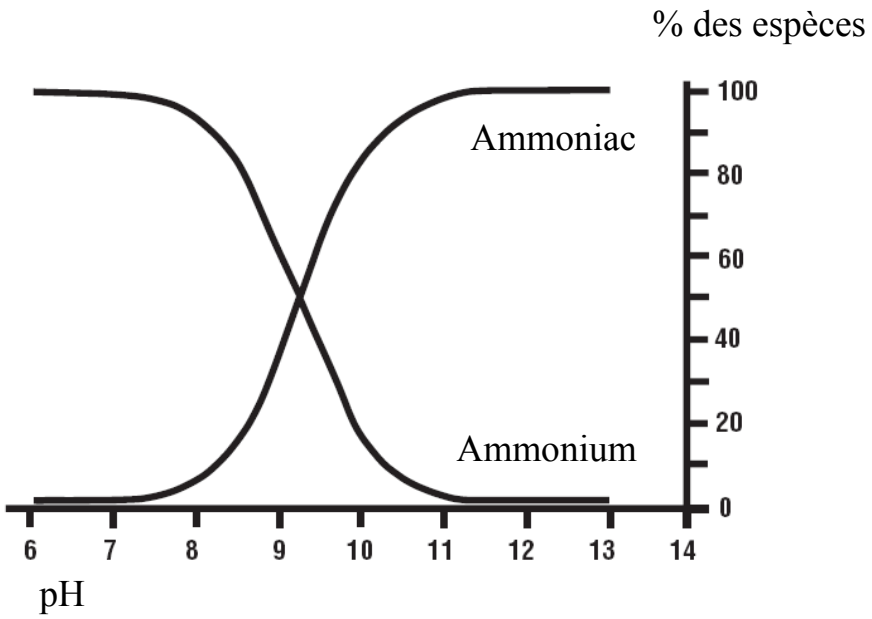


Figure 31 : Pourcentage d'ammoniac et d'ammonium en fonction du pH.

Une courbe d'étalonnage est faite en utilisant des concentrations croissantes de solutions aqueuses d'ammoniac pur qui entourent les concentrations estimées des échantillons à mesurer. Les échantillons standards sont analysés à la même température que les échantillons inconnus. Après mesure du potentiel électrique (en millivolts) pour chaque standard, une droite de calibration est tracée en utilisant les valeurs logarithmiques des concentrations d'ammoniac en abscisse et les changements de potentiel de l'électrode en ordonnée (figure 32). Cette calibration est utilisée pour calculer la concentration d'ammoniac dans nos modèles simples de dégradation d'amine.

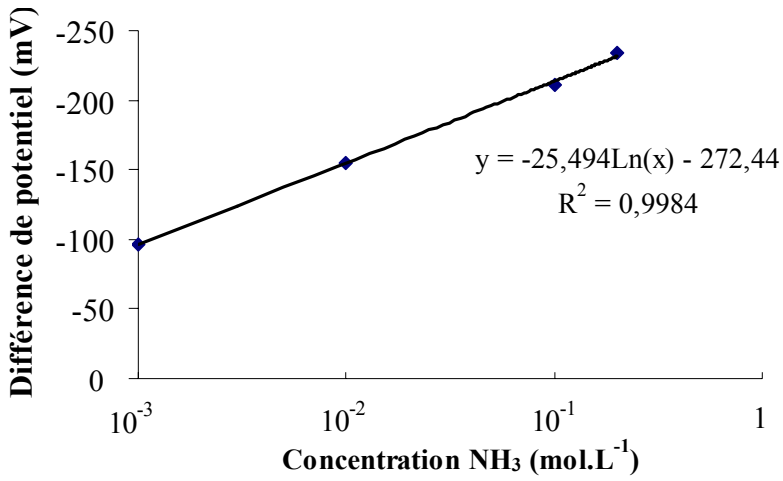


Figure 32 : Droite de calibration de l'électrode d'ammoniac.

IV. PURIFICATION ET CONCENTRATION DE QUELQUES PRODUITS DE MAILLARD

1. Principe

Après détection de quelques produits de Maillard par HPLC couplée à un détecteur UV-Visible ou de fluorescence, nous avons tenté de les isoler et de les purifier pour obtenir une identification structurale complète.

Chaque molécule d'intérêt a été isolée par chromatographie en phase inverse sur une colonne analytique de dimension classique (250 x 4,6 mm). Les échantillons ainsi purifiés ont été analysés par LC-DAD-MS, Q-TOF et spectrométrie de fluorescence.

Afin de confirmer la structure chimique de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, qui semble être un fluorophore majeur dans nos mélanges réactionnels, nous avons réalisé une analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN). Pour obtenir des spectres RMN interprétables, il est nécessaire d'avoir au moins un milligramme de dérivé pyridine pur. Après optimisation des conditions de synthèse de cette molécule, nous l'avons isolée par double chromatographie en phase inverse (semi-préparative et analytique) et concentrée au Speed-Vac.

2. Procédé

Les produits de Maillard détectés soit par UV soit par fluorescence sont isolés par RP-HPLC sur colonne analytique Synergi MAX-RP 250 x 4,6 mm, avec une granulométrie de 4 µm (Phenomenex, Le Pecq, France). Pour leur séparation, nous appliquons un gradient qui débute par un mélange 98/2 (v/v) d'éluant A (acide formique 0,1% v/v dans l'eau) et d'éluant B (acide formique 0,1% v/v dans l'acétonitrile) qui est linéairement modifié pour atteindre 5% d'éluant B en 10 min. Ce pourcentage 95/5 (v/v) est ensuite maintenu pendant 16 min (tableau 5). Un débit d'élution de 1 mL/min permet de recueillir les molécules d'intérêt après passage dans la cellule du détecteur UV ou de fluorescence. Des fractions de 1 à 2 mL sont récupérées dans des tubes de 5 mL en polypropylène placés sur le portoir d'un collecteur de fraction Gilson (Gilson SAS, Villiers Le Bel, France). Cette purification chromatographique est répétée environ 30 fois pour obtenir une quantité suffisante d'échantillon. Les fractions d'une même molécule sont regroupées et évaporées sous vide à l'aide d'un Speed-Vac dont le principe a été exposé précédemment (Thermo Savant, Courtaboeuf, France).

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
10	95	5
26	95	5
31	50	50
41	50	50
46	100	0
60	100	0

Tableau 5 : Gradient d'élution pour la purification de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps).

Pour obtenir environ 1 mg d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, deux purifications sont réalisées à partir d'un mélange glutamine/méthylglyoxal (50/100mM) incubé à 120°C pendant 3 heures, dans un tampon phosphate 200mM, à pH 7,4.

La première purification est effectuée sur une colonne semi-préparative Luna C18(2), de 10 mm de diamètre et de 250 mm de long, avec une granulométrie de 5 µm. Cette colonne est munie d'une pré-colonne de même phase et de dimensions 10 x 10 mm (Phenomenex, Le Pecq, France). La phase mobile et le gradient sont les mêmes que précédemment (tableau 5). Cependant la vitesse d'élution est fixée à 3 mL/min. La détection avant collecte se fait par UV à 320 nm (maximum d'absorption du dérivé de pyridine). Quatre-vingt injections (100 µL) sont indispensables pour tenter de recueillir la quantité nécessaire pour l'analyse en RMN. Les fractions de 6 mL collectées sont évaporées et concentrées dans un volume de 600 µL. La deuxième purification est réalisée sur colonne analytique Synergi MAX-RP comme décrit dans le paragraphe précédent. Après évaporation des solvants, nous obtenons environ 1,1 mg d'une poudre blanche dont la pureté est testée par HPLC-UV-Fluorescence, MS (LTQ) et Q-TOF.

V. PREPARATION D'UN ECHANTILLON D'ACIDE 5-HYDROXY-2,6-DIMETHYLNICOTINIQUE EN VUE D'UNE ANALYSE RMN

La poudre d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique est reprise dans 2 x 300 µL d'eau deutériée (D_2O) 99,97% suivi d'une évaporation sous vide. L'échantillon est repris une dernière fois dans 300 µL de D_2O 99,97% et placé dans un tube RMN (Shigemi, Allison Park; PA, Etats-Unis) préalablement rincé avec la même solution de D_2O.

Pour augmenter la résolution de l'analyse, l'échantillon est concentré dans un tube RMN de volume réduit (figure 33) (Shigemi Inc, Allison Park, PA, USA). L'échantillon (A) (300 µL) est introduit dans un tube de 190 mm de long et de 5 mm de diamètre (B) dans lequel est ensuite placé un insert de 180 mm (C) afin de piéger l'échantillon. Le matériau du tube RMN utilisé pour cette analyse est de susceptibilité magnétique proche de celle de l'échantillon préparé dans l'eau deutériée.

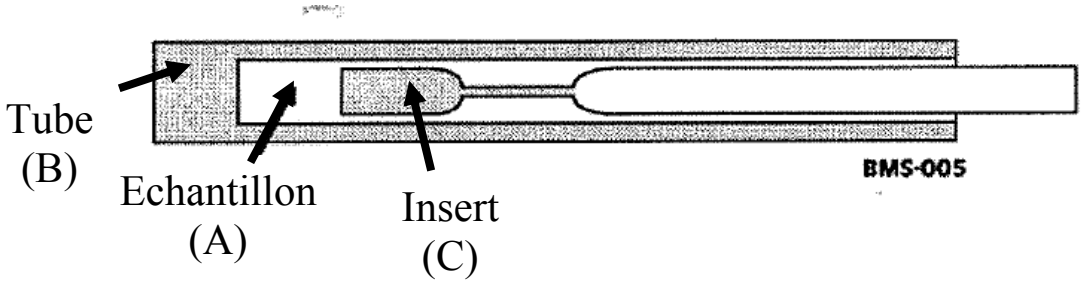


Figure 33 : Microtube RMN symétrique Shigemi pour solvant D_2O (CortecNet, France).

VI. ANALYSE STATISTIQUE

La plupart des échantillons modèles sont réalisés en triple exemplaire. Les résultats sont exprimés par leur moyenne accompagnée de l'écart-type.

Dans la PARTIE III chapitre II : I.2.b (p 122), les différences entre l'absorbance ou la fluorescence observée des échantillons de glutamine et des échantillons des autres molécules testées sont analysées à l'aide du test de Mann-Whitney (Bialès, 1988). La même analyse statistique est réalisée pour les différences de formation des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines (PARTIE III chapitre III : IX.2 ; p 217) observées avec le fructose et les autres sucres réducteurs testés.

PARTIE III
RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

CHAPITRE I : ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA GLUTAMINE EN MILIEU AQUEUX

Connaissant la forte instabilité de la glutamine en milieu aqueux, nous allons étudier son auto-dégradation en acide pyroglutamique et ammoniac en fonction du pH et de la température de chauffage.

Nous avons vu également que d'autres molécules étaient susceptibles de produire de l'ammoniac au cours de leur dégradation. Nous allons donc comparer, en fonction du temps et de la température d'incubation, la libération d'ammoniac à partir de la glutamine, de l'asparagine, de l'urée et de l'acide glutamique.

I. INFLUENCE DU pH ET DE LA TEMPERATURE SUR LA DEGRADATION DE LA GLUTAMINE EN ACIDE PYROGLUTAMIQUE

1. Protocole expérimental

Une solution de L-glutamine (2 mL) à une concentration de 10 mM est préparée dans un tampon phosphate 200 mM pH 5 ; 7,4 et 9. La solution de glutamine à pH 7,4 est incubée à 37°C dans une étuve et, à 100°C ; 120°C ; 150°C et 180°C dans un bain d'huile. Les solutions à pH 5 et 9 sont incubées en bain d'huile à 120°C.

Le dosage de l'acide pyroglutamique a été réalisé par HPLC-UV-MS comme décrit dans le chapitre consacré aux méthodes (PARTIE II chapitre II : II ; p 96)

2. Résultats et discussion

Les cinétiques de formation d'acide pyroglutamique à partir de la glutamine en fonction de la température d'incubation et du pH sont représentées respectivement sur les figure 34 A et figure 34 B.

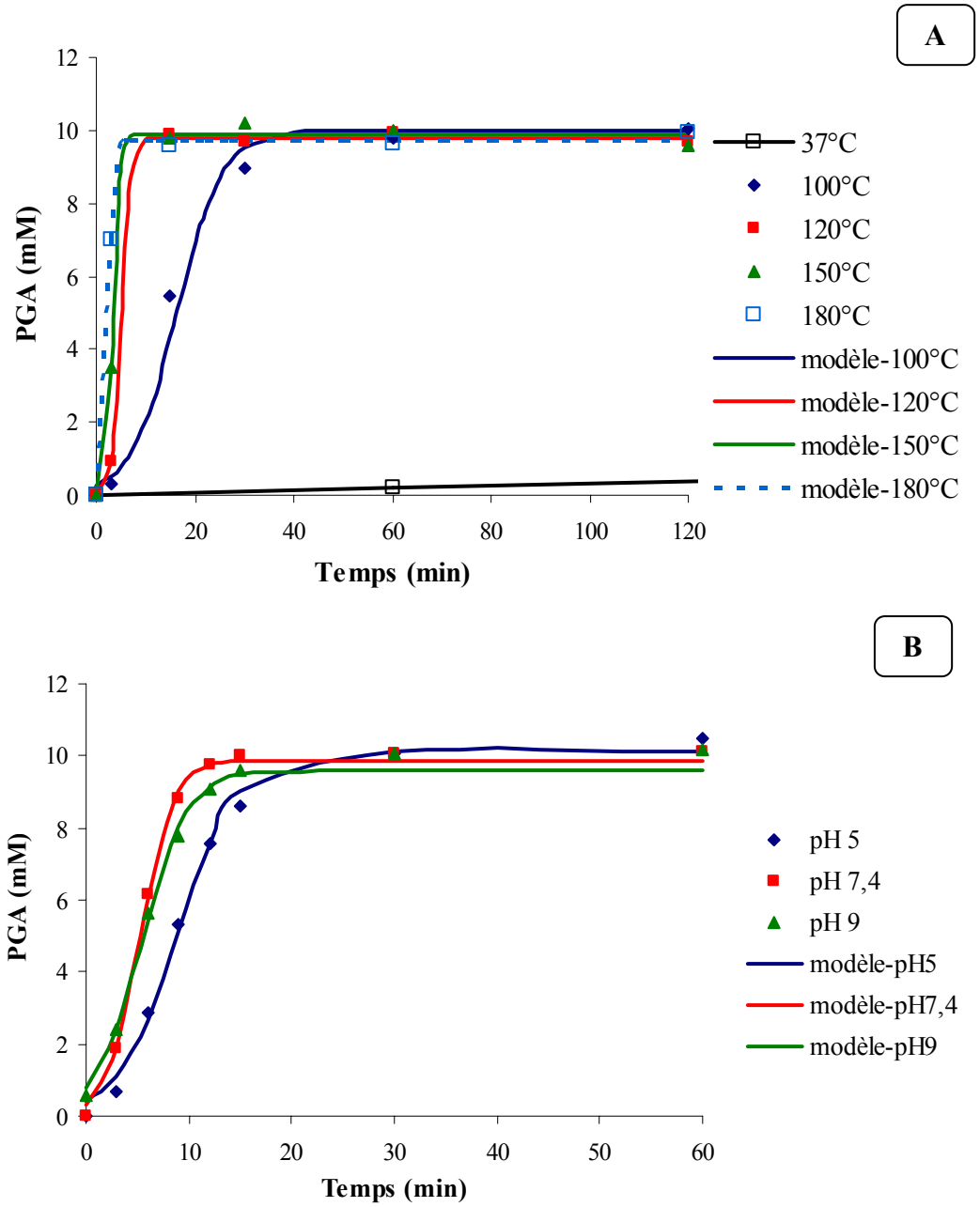


Figure 34 : Formation d'acide pyroglutamique en fonction du temps selon la température à pH 7,4 (A) et selon le pH à 120°C (B).

Après analyse des données expérimentales, nous obtenons des courbes de forme sigmoïde dont l'équation peut être représentée par :

$$Y = \frac{a}{1 + b.e^{-rt}}$$

Les paramètres de cette équation pour chaque condition de température et de pH sont répertoriés dans le tableau 6.

	100°C	120°C	150°C	180°C	pH5	pH7.4	pH9
a	10,00	9,80	9,88	9,72	8,95	9,88	9,60
b	35,91	245,09	169,46	152,12	33,40	29,59	11,67
r	0,220	1,076	1,514	1,991	0,437	0,641	0,454

Tableau 6 : Paramètres des cinétiques de formation de l'acide pyroglutamique à partir de la glutamine en fonction de la température et du pH d'incubation.

Nous observons que la vitesse de formation d'acide pyroglutamique dépend de la température de chauffage, sa formation est d'autant plus rapide que la température augmente. A partir d'une température de 120°C, une dégradation complète de la glutamine est obtenue en seulement 15 min d'incubation. A 100°C, une heure d'incubation est nécessaire pour obtenir 100% d'acide pyroglutamique. Et à 37°C, nous observons la transformation de 60% de la glutamine en acide pyroglutamique en 48 h d'incubation (donnée non présentée sur la figure 34).

Nous sommes tentés d'attribuer la forme sigmoïde des courbes à un artefact expérimental résultant du temps de latence pour atteindre la température de réaction, temps que nous n'avons pas évalué. En raison de ce temps de montée en température en début d'incubation et de la probable limitation en substrat en fin d'incubation, nous avons réalisé une deuxième modélisation des courbes uniquement sur la portion linéaire (figure 34 B). En modélisant cette portion de courbe, nous obtenons les mêmes vitesses de réaction (k_1 = 0,75 min^{-1}) pour les pH acide et basique. Pour le pH neutre, la vitesse est plus élevée mais cela

reste à être confirmé car nous n'avons utilisé que trois points expérimentaux, ce qui est insuffisant. Pour la figure 34 A, nous sommes confrontés au même type de courbe mais il ne nous paraît pas raisonnable de modéliser ces courbes sur la portion linéaire en raison d'un nombre de points expérimentaux insuffisant.

En suivant la formation de l'acide pyroglutamique à partir de la glutamine, nous avons confirmé l'instabilité de cet acide aminé à différentes températures et différents pH. Il s'avère qu'en une heure d'incubation, il est totalement dégradé quels que soient le pH et la température d'incubation, à l'exception de 37°C, température à laquelle sa dégradation est nettement ralentie.

Ces résultats suggèrent que la glutamine présente initialement dans les aliments riches en eau, à des concentrations relativement élevées par rapport aux autres acides aminés libres, subit une forte dégradation lors du traitement thermique et même au cours de la conservation de ces aliments. Nos observations permettent d'expliquer pourquoi, après un long temps d'affinage (690 jours), il ne reste pratiquement plus de glutamine dans le jambon de Parme (Sforza*, et coll.*, 2006). Les concentrations de glutamine en fonction du temps d'affinage sont présentées en détail dans la PARTIE I chapitre III : II (p 59). Une dégradation analogue de la glutamine a été observée sur des fèves de cacao grillées. Après 3 min de traitement thermique à 135°C, les auteurs ont montré que les fèves perdaient un peu plus de 78% de leur glutamine libre (Serra Bonvehi & Ventura Coll, 2002).

Enfin, nous observons que l'acide pyroglutamique est parfaitement stable quelles que soient les conditions de traitements thermiques testées. Ce lactame ne semble sensible ni au chauffage, ni aux conditions acide ou basique de nos solutions modèles. Nous avons également testé la stabilité du pyroglutamate en présence de sucre réducteur ou de composé dicarbonylé. Son incubation (10 mM) en présence de glucose ou de méthylglyoxal (de 5 à 50 mM pour chaque réactant) à 120°C pendant 4 heures n'entraîne aucune dégradation significative. En conclusion, nous pouvons affirmer que l'acide pyroglutamique est un produit terminal stable de la dégradation de la glutamine induite par traitement thermique en milieu aqueux.

II. COMPARAISON DU TAUX DE FORMATION D'AMMONIAC PAR DEGRADATION DE LA GLUTAMINE ET AUTRES PRECURSEURS

En se dégradant, la glutamine libère non seulement de l'acide pyroglutamique, mais aussi de l'ammoniac. Théoriquement, en absence de toute autre molécule, la dégradation thermique de la glutamine devrait produire une quantité équimolaire de pyroglutamate et d'ammoniac (figure 16, p 66).

S'il apparaît certain que la dégradation thermique de la glutamine et de l'asparagine (voir la PARTIE I chapitre III : IV.2.e ; p 75) libère de l'ammoniac, il faut préciser qu'il n'en est pas de même pour tous les acides aminés.

Les équipes de Merritt & Robetson (1967), puis de Lien & Nawar (1974) ont montré que l'ammoniac était le principal produit de dégradation des acides aminés soumis à une pyrolyse programmée jusqu'à 700°C. Cependant, ces études ne sont pas représentatives de la plupart des traitements thermiques appliqués aux denrées alimentaires. Afin d'obtenir une meilleure estimation de la dégradation des acides aminés dans les aliments chauffés, Sohn & Ho (1995) ont mesuré la désamination de 19 d'entre eux dans des modèles simples incubés à 180°C pendant 2 heures à pH 8. Ils ont montré que, dans ces conditions, la désamination de la plupart des acides aminés était inférieure à 10% (mol/mol). Même dans le cas des acides aminés possédant plus d'un atome d'azote dans leur structure chimique (tryptophane, histidine, arginine et lysine) seule une faible quantité d'ammoniac est libérée au cours de ce traitement thermique.

Par contre, la cystéine, l'acide aspartique et l'asparagine semblent posséder une fonction α-NH_2 suffisamment labile pour libérer un pourcentage élevé d'ammoniac. Enfin, les auteurs confirment la forte désamidation de la glutamine et de l'asparagine, comme décrit précédemment.

Dans ce travail de thèse, il nous a paru important de comparer les cinétiques de formation d'ammoniac à partir de la glutamine, de l'urée identifiée comme étant un précurseur d'ammoniac dans certaines matrices alimentaires, et d'autres acide aminés possédant des structures proches de celle de la glutamine.

1. Protocole expérimental

Trois acides aminés (asparagine, glutamine et acide glutamique) et l'urée sont dissous dans un tampon phosphate 200 mM pH 9 à une concentration de 100 mM. Ces solutions sont ensuite incubées dans un bain d'huile à 120°C dans des tubes SVL (Pyrex) de 10 mL pendant 30, 60, 120, 180 et 240 min. Après refroidissement immédiat dans la glace, l'ammoniac est dosé dans chaque solution par électrochimie (voir la PARTIE II chapitre II : III ; p 98).

Les résultats que nous présentons ci-dessous sont extraits d'un article que nous avons publié dans la revue scientifique Amino Acids (Niquet & Tessier, 2007). Par souci d'uniformité des données, le pH de tous les modèles simples regroupés dans cette publication a été fixé à 9. Cela était alors justifié par le souci d'optimiser les modèles de réaction de Maillard que nous présenterons dans le chapitre II.

2. Résultats et discussion

La teneur en ammoniac libéré par la glutamine, l'asparagine, l'urée et l'acide glutamique à 120°C en fonction du temps est représentée sur la figure 35 A et à 180°C pour les trois premiers réactants sur la figure 35 B.

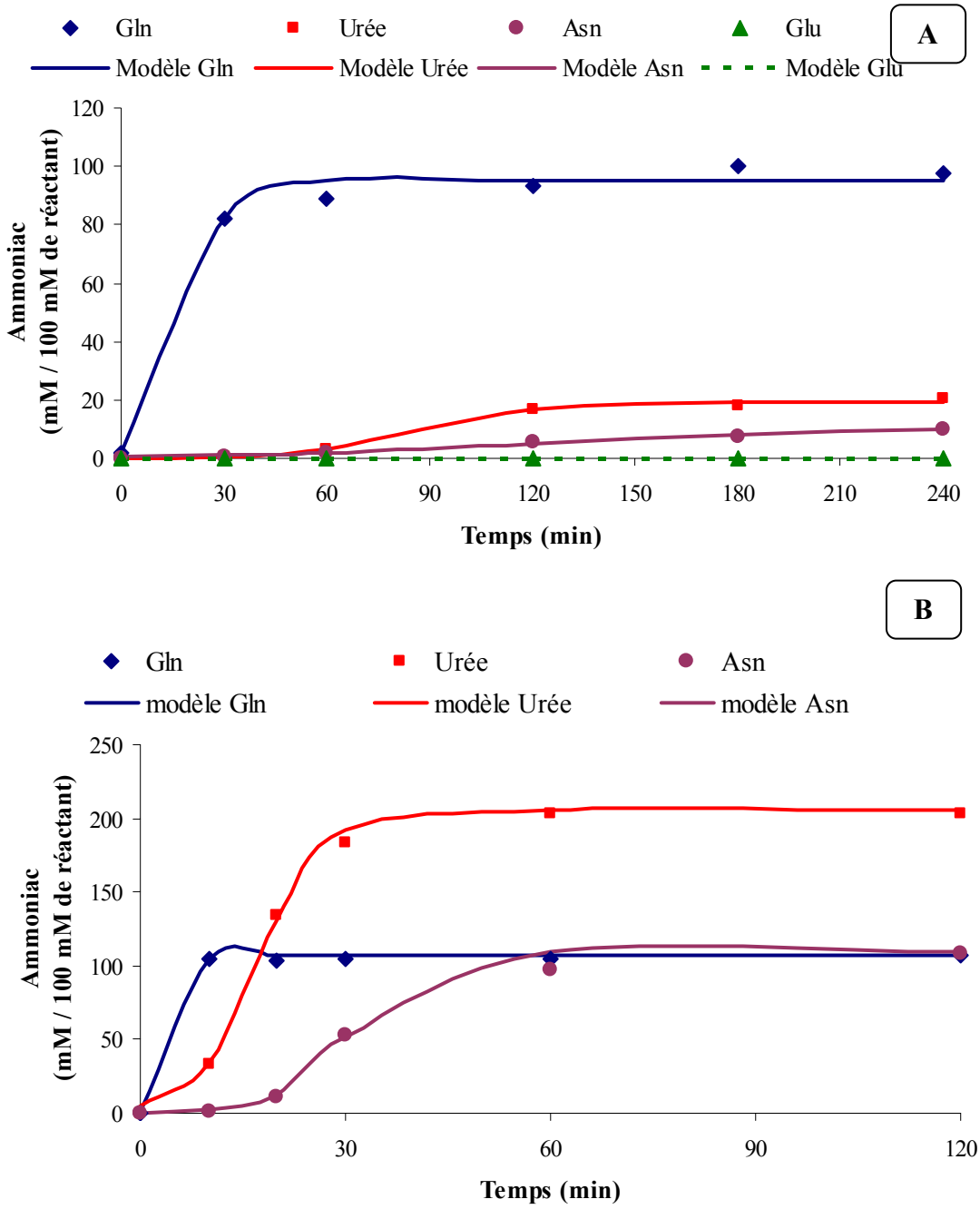


Figure 35 : A - Formation d'ammoniac à 120°C à partir de solutions aqueuses de glutamine, urée, asparagine et acide glutamine en fonction du temps. B - Formation d'ammoniac à 180°C à partir de solutions aqueuses de glutamine, urée et asparagine en fonction du temps.

L'allure plus ou moins sigmoïde des courbes est attribuable au temps nécessaire pour atteindre la température réactionnelle dans les solutions aqueuses (temps qui n'a pu être mesuré).

A 120°C, la glutamine est le meilleur précurseur d'ammoniac avec une libération équimolaire rapide. Après 60 min de chauffage, un plateau est obtenu avec une formation de 100 % d'ammoniac (mol/mol). Dans les mêmes conditions, nous obtenons un plateau pour l'urée à 120 min avec un taux de formation d'ammoniac de seulement 20%. Pour l'asparagine, la formation d'ammoniac est encore plus lente que pour l'urée puisque nous n'observons que 10% d'ammoniac après 240 min d'incubation. Enfin, aucune formation d'ammoniac n'est détectée lorsque la solution d'acide glutamique est soumise au même traitement thermique.

A 180°C, la glutamine libère 100% d'ammoniac après seulement 10 min d'incubation. En revanche, l'urée s'est totalement décomposée en ammoniac en 60 min de chauffage, en générant deux moles d'ammoniac pour une mole d'urée initialement introduite. L'asparagine, ne libérant que 10% d'ammoniac à 120°C, a conduit à la formation de 100% d'ammoniac à 180°C en 120 min de chauffage.

Aux deux températures testées, la formation d'ammoniac est plus rapide pour la glutamine que pour l'asparagine. L'absence d'ammoniac obtenue lorsque l'acide glutamique est chauffé nous indique que la formation d'ammoniac à partir de la glutamine est due à une désamidation et non à une désamination. C'est aussi ce que nous pouvons supposer pour l'asparagine qui libère au maximum une mole d'ammoniac par mole d'asparagine. Si nos conclusions sur la désamidation de la glutamine, et l'absence de désamination de l'acide glutamique sont en parfaite adéquation avec celles de Sohn & Ho (1995), il n'en est pas de même pour la dégradation de l'asparagine qui, selon ces auteurs, libèrerait plus d'une mole d'ammoniac. Il y aurait donc une libération d'ammoniac supplémentaire venant de la fonction α-NH_2 de l'asparagine. Pour justifier la différence observée entre la glutamine et l'asparagine, Sohn & Ho ont repris l'hypothèse de Wright (1991) selon laquelle la différence du nombre de groupements méthylène sur les chaînes latérales des deux acides aminés basiques serait à l'origine de la différence de stabilité de leur fonction amine. Nous pouvons ajouter qu'en ce qui concerne la glutamine, la formation de l'acide pyroglutamique (aussi liée à la présence du groupement CH_2 supplémentaire) pourrait expliquer la forte stabilité de la fonction α-NH_2 engagée dans la formation du cycle lactame thermostable.

Entre 120°C et 180°C, la température a un effet sur la vitesse de formation de l'ammoniac à partir de la glutamine, bien que la dégradation totale soit toujours atteinte rapidement (entre 10 et 30 min). Par contre nous observons un effet de la température plus important sur la libération d'ammoniac à partir de l'asparagine puisque un traitement à 180°C pendant 1 h semble nécessaire pour atteindre une désamidation totale de cet acide aminé. Nos résultats viennent corroborer les observations faites par Sohn & Ho (1995).

Le taux de formation d'ammoniac à partir de l'urée est également fortement dépendant de la température et du temps de chauffage. En effet, une température supérieure à 120°C et un temps d'incubation supérieur à 15 min sont nécessaires pour que l'urée se décompose de manière importante en ammoniac. De ce fait, nos résultats suggèrent que la glutamine serait un meilleur précurseur d'ammoniac que l'urée lors de la cuisson des viandes. Précisons que ces deux amines sont présentes en concentration semblable dans les matrices alimentaires d'origine carnée (Chen*, et coll.*, 2000 ; Flores*, et coll.*, 2000).

Nous pouvons conclure qu'en raison de sa forte instabilité, la glutamine libre est un des principaux précurseurs des nombreux composés aromatiques (pyrazines, pyrroles, pyridines…) formés par réaction de Maillard au cours du traitement thermique des aliments (voir étude bibliographique PARTIE I chapitre III : IV.2). Ainsi, dans les chapitres suivants, nous allons rechercher quels sont les produits de Maillard issus la glutamine ou de l'ammoniac libéré par lactamisation ou désamination cyclisante.

CHAPITRE II : ETUDE DE LA REACTION ENTRE LA GLUTAMINE ET LE METHYLGLYOXAL

Nous savons que la glutamine et l'ammoniac peuvent participer à la réaction de Maillard mais les PRM issus de cet acide aminé ne sont que partiellement identifiés. Dans ce chapitre, nous rechercherons les produits formés par réaction chimique entre la glutamine et le méthylglyoxal qui est un précurseur très important des réactions de glycation.

Nous avons choisi ce dicarbonyle, aussi appelé pyruvaldéhyde, pour plusieurs raisons. Premièrement, malgré sa forte instabilité et des techniques de dosages peu précises, il apparaît que le méthylglyoxal est présent dans de nombreuses matrices alimentaires (Kajita & Senda, 1972 ; Ohmori*, et coll.*, 1987). De plus, même si les composés α-dicarbonylés sont nettement moins concentrés que les sucres réducteurs dans les aliments, il n'en demeure pas moins qu'ils contribuent significativement à la réaction de Maillard puisque leur réactivité avec les amines semble largement supérieure à celle des hexoses ou des pentoses dont ils dérivent (voir la PARTIE I chapitre III : I.2 ; p 49). Enfin, Hollnagel & Kroh (1998) précisent que le méthylglyoxal est généralement plus répandu que le glyoxal dans les matrices alimentaires. Cela s'explique peut être par une dégradation favorisée des réductones en méthylglyoxal aux pH légèrement acides de la plupart des aliments. Au contraire le glyoxal serait plutôt formé à pH basique. Notre choix de composé α-dicarbonylé s'est ainsi orienté vers le méthylglyoxal.

Nous avons utilisé des modèles simples en solutions aqueuses tamponnées. Nous sommes conscients que ces modèles ont leurs limites et ne sont pas représentatifs des conditions physicochimiques des aliments. Par exemple nous n'avons testé aucun modèle en activité d'eau réduite. Pour favoriser la réaction de Maillard entre la glutamine et le méthylglyoxal, et découvrir de nouveaux PRM, nous avons dans un premier temps fixé et contrôlé le pH de nos modèles simples à 9. Une étude plus détaillée de l'effet du pH sur la formation des PRM issus de la glutamine sera présentée ensuite.

La grande majorité des produits de Maillard (pentosidine, CML, CEL, pyrraline, argpyrimidine, mélanoïdines…) a été découverte dans des mélanges réactionnels simples avant d'être plus facilement identifiés dans les aliments. Ceci est la preuve que l'utilisation des modèles simples pour la découverte de nouveaux produits de Maillard est une technique pertinente.

Enfin, ce n'est que dans le chapitre IV que nous rechercherons la présence des molécules nouvellement identifiées dans des aliments du commerce (sauces tomates et biscuits) et dans des matrices alimentaires brutes dont nous contrôlerons le traitement thermique en laboratoire (tomates crues et formulations modèles de biscuits secs).

I. ETUDE DE LA FORMATION DE CHROMOPHORES ET DE FLUOROPHORES

De par leur structure chimique, les PRM possèdent fréquemment des propriétés d'absorbance dans le proche UV-visible et de fluorescence. Ces molécules ont généralement dans leur structure des noyaux benzéniques ou autres hétérocycles possédant des électrons π délocalisés sur les liaisons des cycles. Grâce à ce genre de structures, de nombreux PRM ont la propriété d'absorber dans l'ultraviolet proche (200 à 400 nm) ou dans le visible (400 à 750 nm). La longueur d'onde de 420 nm a été fréquemment utilisée pour quantifier de manière globale les PRM dans des modèles simples. Nous reprendrons cette technique spectrométrique pour suivre la formation des produits bruns de Maillard dans nos modèles.

D'autres PRM tels que la pentosidine (Sell & Monnier, 1989) et la molécule LM-1 (Tessier*, et coll.*, 1999), irradiés par une lumière ultraviolette, fluorescent dans le domaine visible. Le terme de « glycofluorophore » a d'ailleurs été employé par Wolff*, et coll.* (1989). Cette caractéristique spectrale commune à de nombreux PRM est fréquemment utilisée pour suivre leur apparition dans des modèles simples (Kato*, et coll.*, 1989 ; Baisier & Labuza, 1992), ou dans des matrices plus complexes. Nous utiliserons ainsi la spectrofluorimétrie pour suivre les cinétiques d'apparition des fluorophores dans nos modèles expérimentaux et pour identifier de nouveaux produits de Maillard.

1. Cinétiques de formation de chromophores et de fluorophores en fonction du rapport molaire Gln/MG

a. Protocole expérimental

Une solution de glutamine (10 mM) est incubée en présence de concentrations croissantes en méthylglyoxal (0, 5, 10, 20 et 50 mM) dans un tampon phosphate 200 mM, à pH 9, dans un bain d'huile à 120°C pendant 0, 30, 60, 120 et 240 min.

La formation de produits bruns est mesurée par absorption à 420 nm. L'intensité de fluorescence est mesurée à une longueur d'excitation de 330 nm et d'émission de 450 nm, maxima d'excitation et d'émission obtenus pour un mélange de glutamine/méthylglyoxal incubé 2 h à 120°C quel que soit le rapport molaire étudié. Ce choix de longueurs d'onde est également justifié par l'observation d'une évolution des maxima en fonction du temps. Il semble que les fluorophores ayant pour maxima d'excitation et d'émission respectivement, 330 et 450 nm se forment au cours du temps aux dépens d'intermédiaires fluorescents ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 300/415 nm) observés aux temps précoces (Annexe I). Nos cinétiques montrent donc uniquement la formation des fluorophores stables ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 330/450 nm).

Les échantillons les plus concentrés en PRM ont été préalablement dilués afin d'effectuer les mesures d'absorbance et de fluorescence dans leur zone de linéarité (linéarité entre l'intensité du signal et la concentration de chromophores et de fluorophores).

b. Résultats

Les échantillons ont été préparés dans un tampon de force ionique importante (200 mM) afin de limiter d'éventuelles baisses de pH au cours de la réaction de Maillard. Cependant ce tampon n'a pas été suffisant pour maintenir parfaitement le pH initial. C'est ainsi que nous avons observé des baisses de pH dans toutes les conditions d'incubation.

Il a été montré que la réaction de Maillard acidifie le milieu réactionnel s'il n'est pas suffisamment tamponné (Tessier & Birlouez-Aragon, 1998). En retour, une acidification du milieu, consécutive à la formation de PRM, conduit généralement à un ralentissement de la vitesse de la réaction de Maillard qui est fortement dépendante du pH. Il peut en résulter une courbe de formation des PRM d'allure sigmoïde. Cependant, nous verrons plus tard que la

synthèse du principal fluorophore qui semble responsable de la fluorescence globale mesurée est au contraire favorisée à pH neutre ou légèrement acide.

Les cinétiques d'apparition des pigments bruns (mesure d'absorbance à 420 nm) et des fluorophores (λ_{ex} = 330 nm et λ_{em} = 450 nm) sont représentées sur la figure 36.

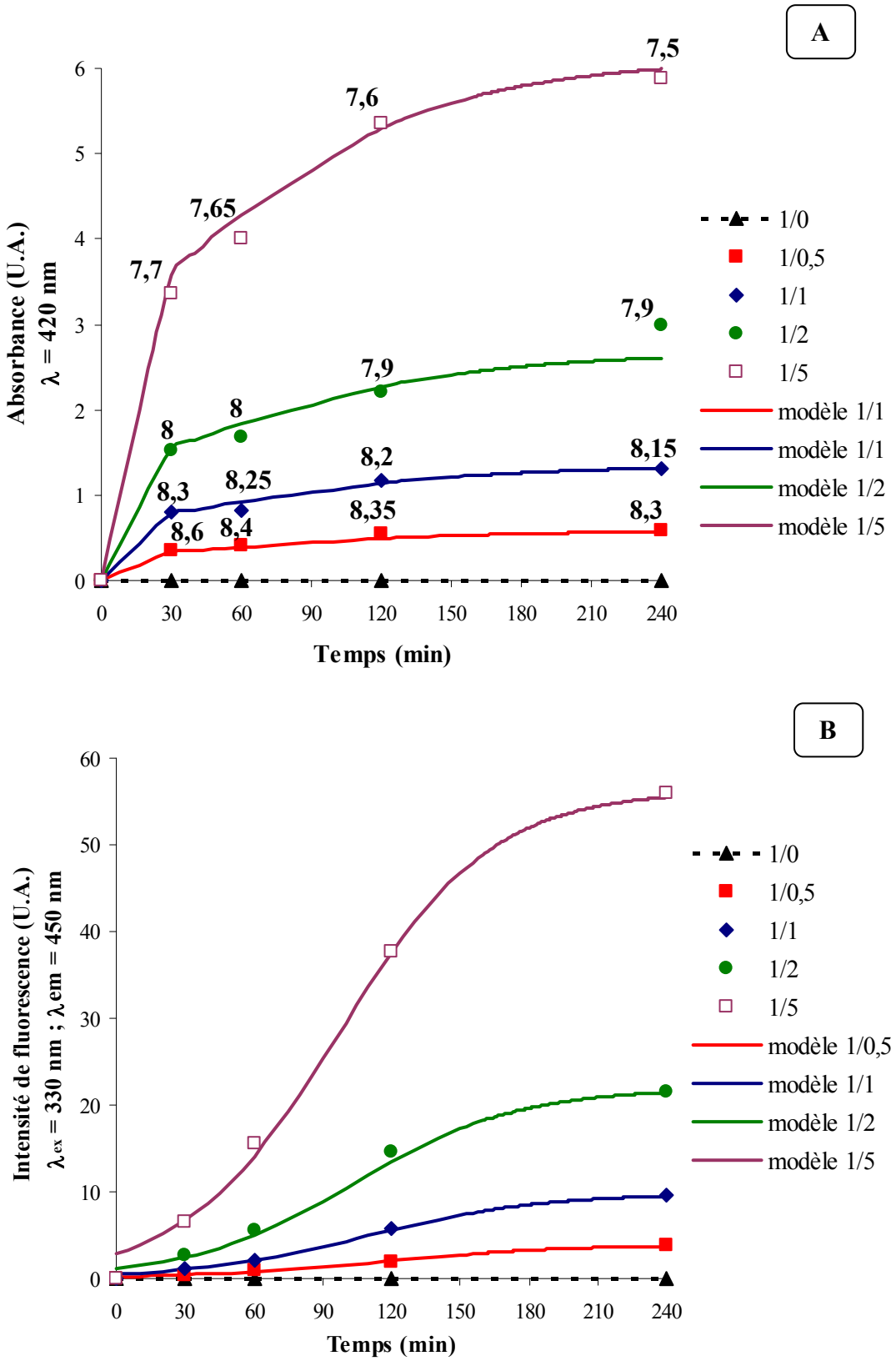


Figure 36 : Formation de produits de Maillard mesurée par (A) absorption à 420 nm et (B) par fluorescence à 330 et 450 nm, longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement, à partir de solutions chauffées à 120°C de glutamine et de méthylglyoxal

en fonction du rapport molaire glutamine/méthylglyoxal. La figure A présente en plus la mesure de pH à chaque point des différentes cinétiques.

Nous obtenons des courbes de forme sigmoïde d'équation :

$$Y = \frac{a}{1 + b.e^{-rt}}$$

Les paramètres de cette équation pour chaque rapport molaire sont répertoriés dans le tableau 7.

UV 420 nm

	1/0,5	**1/1**	**1/2**	**1/5**
a	0,59	1,36	2,68	6,11
b	1,18	1,18	1,18	1,18
r	0,0150	0,0152	0,0157	0,017

Fluorescence

	1/0,5	**1/1**	**1/2**	**1/5**
a	3,92	9,80	21,91	56,24
b	18,21	18,21	18,21	18,21
r	0,0250	0,0266	0,02808	0,030

Tableau 7 : Paramètres des cinétiques de formation de produits de Maillard mesurée par absorbance à 420 nm et par fluorescence (λ_{ex} = 330 nm et λ_{em} = 450 nm).

Aucun brunissement n'est observé dans la solution de glutamine incubée seule. L'intensité du brunissement augmente avec la concentration de méthylglyoxal (figure 36 A). Un pseudo-plateau est observé respectivement après 30 et 120 min de chauffage pour les faibles et fortes concentrations de méthylglyoxal. Après l'obtention d'un maximum, le brunissement est relativement stable jusqu'à la fin du traitement thermique pour chaque

rapport molaire. Même si, en absence d'un contrôle parfait du pH initial, nous ne pouvons pas conclure quant à l'allure générale des cinétiques présentées, nous pouvons cependant émettre quelques hypothèses.

Le ralentissement de formation de brunissement observé est probablement associé à un épuisement des réactants au cours des incubations, mais aussi à une diminution de pH. Cependant, malgré une baisse de pH qui diminue avec la baisse du rapport molaire (de pH 9 à pH 8,3 pour la plus faible concentration de méthylglyoxal), nous observons des allures de courbe similaires avec un ralentissement rapide de la formation de composés bruns (le paramètre b ne variant pas avec la concentration en méthylglyoxal). Cette observation nous laisse supposer que ce ralentissement n'est lié qu'à l'épuisement d'au moins un des deux substrats mis en jeu, ou à un équilibre entre la formation et la dégradation des chromophores mesurés.

De même que pour le brunissement mesuré à 420 nm, aucune fluorescence détectable n'est observée en absence de méthylglyoxal (figure 36 B). Nous montrons que la formation de fluorophores est dépendante de la concentration de méthylglyoxal. Celle-ci est en effet accélérée lorsque la concentration de méthylglyoxal augmente de 5 à 50 mM. Entre 0 et 30 min, nous observons une phase d'induction pour chaque rapport molaire. Ensuite, une accélération de la vitesse de réaction apparaît, suivie d'un ralentissement entre 120 et 240 min d'incubation.

Le paramètre b est indépendant de la concentration. En revanche, en reportant le paramètre a en fonction de la concentration en méthylglyoxal, nous obtenons des droites d'équation d'une part $y = 1,2096\ x + 0,1146$ pour l'absorbance à 420 nm et d'autre part $y = 11,615\ x - 1,7141$ pour la fluorescence. Ce paramètre est donc proportionnel à la concentration en méthylglyoxal et pourrait s'écrire de la manière suivante : $a = \alpha\ [MG]_0$.

c. Discussion

Comme attendu, le taux de formation des produits de Maillard est influencé par le rapport molaire des deux réactifs. Concernant l'apparition de couleur et de fluorescence, nous observons un maximum pour le rapport molaire glutamine/méthylglyoxal le plus élevé 1/5. Les résultats de nos modèles de réaction de Maillard sont en concordance avec ceux de la littérature. A ce propos, Baisier & Labuza (1992) avaient déjà conclu qu'un excès de

composés carbonylés par rapport aux composés aminés entraînait généralement une augmentation du niveau de brunissement des solutions modèles.

Dans nos conditions, nous observons une phase d'induction pour la formation des fluorophores. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux publiés par Tanaka*, et coll.* (1986) qui attribuent cette phase d'induction à la formation de précurseurs de PRM. Cependant nous n'avons pas retrouvé cette première phase en suivant la formation des pigments bruns. Il est fort probable que le vitesse de leur formation soit catalysée par la température élevée que nous avons choisie (120°C), réduisant en conséquence la période d'induction.

2. Comparaison de la formation de pigments bruns et de fluorophores entre différents précurseurs d'ammoniac

Après avoir prouvé que la glutamine était une source importante d'ammoniac, et après avoir montré que cet acide aminé pouvait participer à la formation de pigments bruns et de fluorophores, nous avons voulu comparer sa réactivité avec celle d'autres molécules de structure chimique voisine ou bien génératrices d'ammoniac.

a. Protocole expérimental

Une solution de méthylglyoxal (400 mM) est mélangée à volume égal à chacune des solutions de glutamine, asparagine, acide glutamique, urée ou ammoniac (200 mM) afin d'obtenir respectivement les concentrations finales de 200 et 100 mM. Les mélanges ainsi préparés, à pH 9, sont immédiatement incubés en bain d'huile à 120°C pendant 2h. La réaction de Maillard est stoppée par refroidissement rapide des échantillons dans un bain de glace.

Les mesures d'absorbance et de fluorescence sont réalisées aux mêmes longueurs d'ondes que précédemment (p 116).

b. Résultats et discussion

La figure 37 A montre l'intensité de brunissement non enzymatique obtenue par incubation de différents précurseurs d'ammoniac pendant 2h à 120°C en présence de méthylglyoxal. La fluorescence des PRM est quant à elle présentée sur la figure 37 B.

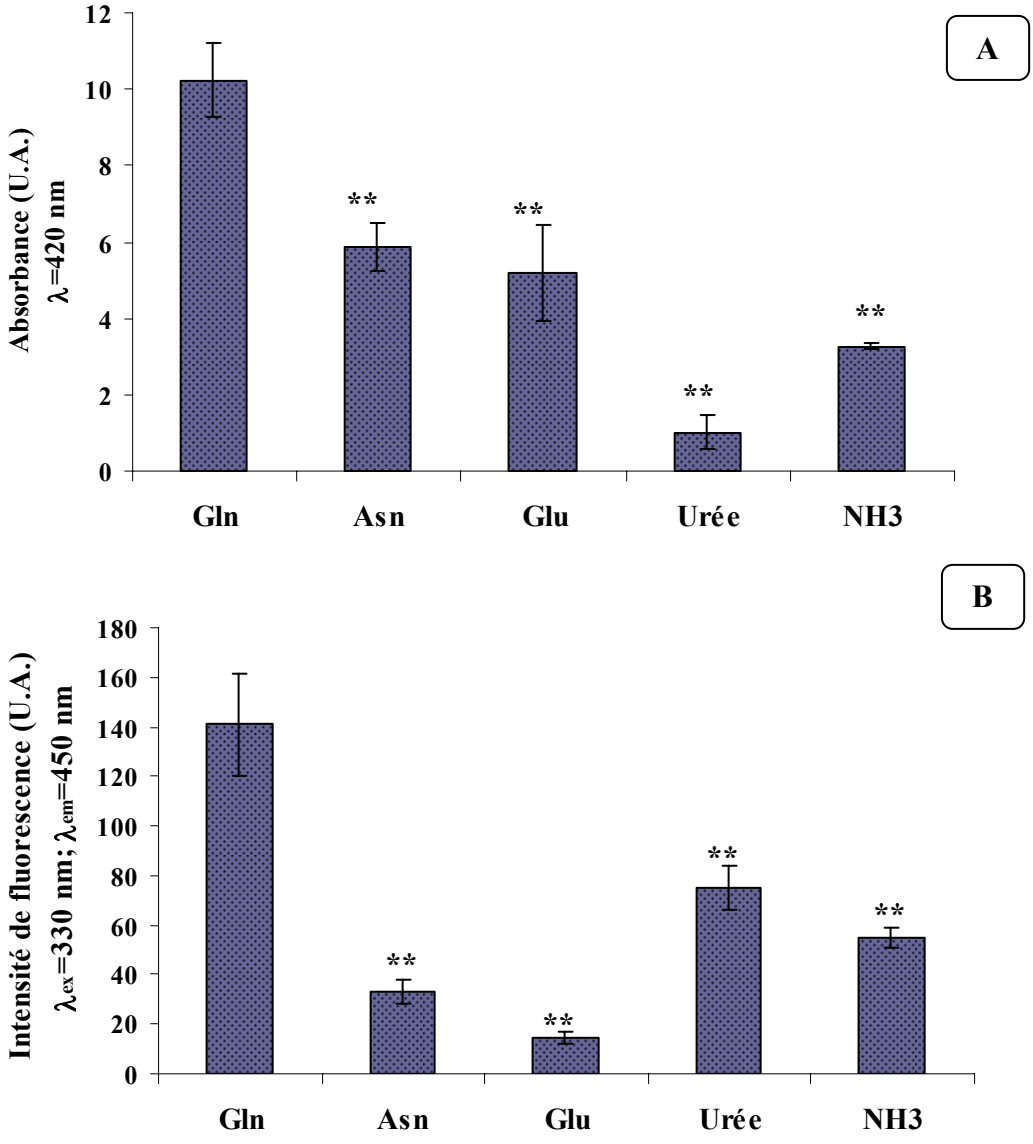


Figure 37 : Formation de pigments bruns (A) mesurés par absorption à 420 nm et de fluorophores (B) mesurés par fluorescence à 330 (λ_{ex}) et 450 (λ_{em}) nm à partir de solutions aqueuses de glutamine, asparagine, acide glutamique, urée et ammoniac

chauffées à pH 9 à 120°C pendant 2 h en présence de méthylglyoxal. Significativité entre glutamine et autres amines calculée à l'aide du test de Mann-Whitney (, $p < 0,05$).**

Nous constatons que la formation de pigments bruns (figure 37 A) est significativement plus importante pour la glutamine que pour les autres molécules. La glutamine se trouve être la plus réactive, suivie de l'asparagine et de l'acide glutamique. L'urée apparaît comme étant la moins réactive puisque le brunissement ne représente que 10% de celui observé à partir de la glutamine. Nous avons aussi mesuré l'intensité d'absorbance obtenue après incubation d'ammoniac et de méthylglyoxal. Dans ce cas, le brunissement ne représente pas plus d'un tiers du brunissement observé avec la glutamine.

Il apparaît aussi que la fluorescence la plus intense (figure 37 B) est obtenue avec la glutamine. Cependant l'ordre de réactivité des différents précurseurs d'ammoniac établi précédemment pour le brunissement se trouve modifié pour la fluorescence. Dans ce cas, la réactivité de la glutamine est suivie par celle de l'urée puis de l'ammoniac. Il est intéressant de noter encore une fois que la glutamine produit 2,5 fois plus de fluorescence que l'ammoniac. Enfin, l'asparagine et l'acide glutamique sont deux acides aminés qui présentent une faible réactivité.

c. Discussion

Avec cette étude, nous pouvons conclure que, parmi les molécules testées, la glutamine est le principal précurseur des produits bruns et des fluorophores formés par réaction de Maillard en présence de méthylglyoxal à 120°C. Nous pouvons attribuer cette forte réactivité à l'extrême instabilité de cet acide aminé ainsi qu'à la présence de deux atomes d'azote sur sa structure chimique. Dans nos conditions d'incubation, la glutamine est aussi beaucoup plus réactive que l'urée qui a pourtant été décrite comme étant un précurseur important de la réaction de Maillard (Chen*, et coll.*, 2000). Nous pouvons donc suggérer que parmi d'autres donneurs potentiels d'ammoniac ou d'autres porteurs d'amines, la glutamine libre participe activement à l'apparition de pigments bruns dans des matrices alimentaires riches en glutamine.

A ce stade de nos investigations, la libération rapide d'ammoniac par la glutamine ne semble pas être la seule réaction à l'origine de la forte réactivité que nous avons mesurée pour

cet acide aminé. En effet la comparaison des intensités de fluorescence (et d'absorbance) de la glutamine et de l'ammoniac nous laisse supposer que les fluorophores formés proviendraient non seulement de l'ammoniac libéré par désamidation, mais aussi de l'α-NH_2 non engagée dans la formation du PGA. Comme le résume le schéma de la figure 38, nous pouvons concevoir que la glutamine conduirait à la formation de fluorophores qui lui seraient propres (fluorophores I) et de fluorophores non spécifiques qui seraient issus de la réaction entre l'ammoniac et les composés dicarbonylés (fluorophores II). Nous pouvons alors aisément imaginer une compétition entre deux voies de synthèse de fluorophores.

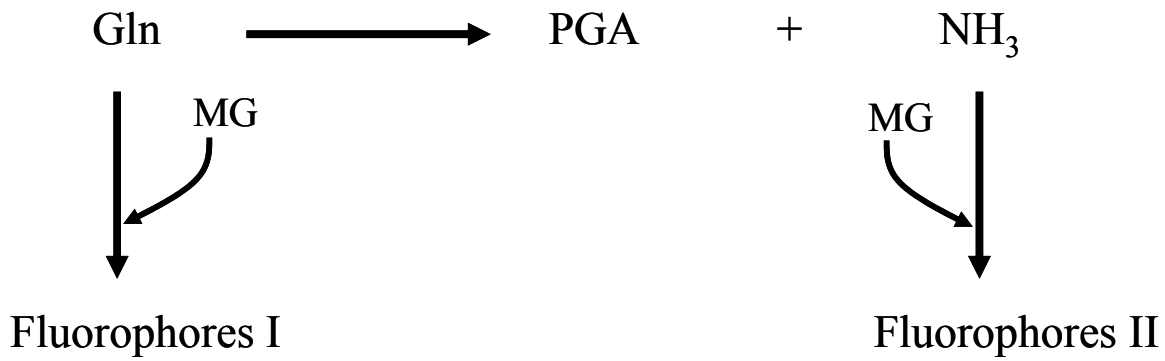


Figure 38 : Première hypothèse de synthèse de fluorophores à partir de la glutamine et d'ammoniac en présence de méthylglyoxal.

3. Comparaison des profils chromatographiques de deux mélanges glutamine + méthylglyoxal et ammoniac + méthylglyoxal

La découverte d'une synthèse très importante de fluorophores dans le mélange réactionnel « glutamine + méthylglyoxal » nous a conduit à poursuivre nos investigations en essayant de séparer par chromatographie les différents PRM responsables de la fluorescence observée dans nos échantillons aux longueurs d'ondes spécifiques de 330 et 450 mn (λ_{ex} et λ_{em}). Il est important de noter que les spectres de fluorescence sont identiques entre les deux types de mélange (glutamine et ammoniac) (Annexe II).

De plus, nous présentons dans ce chapitre une analyse chromatographique comparative des deux mélanges réactionnels contenant de la glutamine ou de l'ammoniac en présence de méthylglyoxal. Nous pourrons ainsi comparer les profils chromatographiques des deux mélanges et éventuellement identifier des fluorophores spécifiques à la glutamine.

a. Conditions chromatographiques

Nous ne revenons pas sur la préparation des deux mélanges réactionnels qui a été détaillée dans le chapitre précédent (p 121).

Les échantillons sont analysés par HPLC couplée à une détection par fluorescence (voir détails des appareils dans la partie Matériel et Méthodes). L'analyse est réalisée sur une colonne Synergi Max-RP de dimensions 250 x 4,6 mm, avec une granulométrie de 4 µm (Phenomenex, Le Pecq, France). La phase mobile est éluée à un débit de 1 mL/min avec un gradient linéaire (tableau 8) commençant avec 100% d'acide formique (0,1% v/v dans l'eau UHQ) pour atteindre en 7 min un mélange composé de 95% d'acide formique (0,1% v/v dans l'eau ; éluant A) et de 5% d'acide formique dans l'acétonitrile (0,1% v/v ; éluant B). La détection des fluorophores se fait par fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives de 330 et 450 nm.

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
7	95	5
14	95	5
20	50	50
25	50	50
27	100	0
40	100	0

Tableau 8 : Gradient d'élution pour l'analyse de fluorophores (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps).

b. Résultats et discussion

Les profils chromatographiques des deux mélanges sont pratiquement identiques (figure 39). Dans les deux cas, nous observons un pic chromatographique majoritaire avec un temps de rétention de 13 min. En utilisant la formule présentée ci-dessous, nous estimons que ce pic représente environ 74 % de la fluorescence globale détectée par chromatographie. Les autres pics, d'aires nettement plus faibles, sont détectés entre 7 et 21 min.

$$\text{Pourcentage de fluorescence attribuée au pic majoritaire} = \frac{\text{Aire du pic majoritaire}}{\text{Somme des aires de tous les pics chromatographiques}} \times 100$$

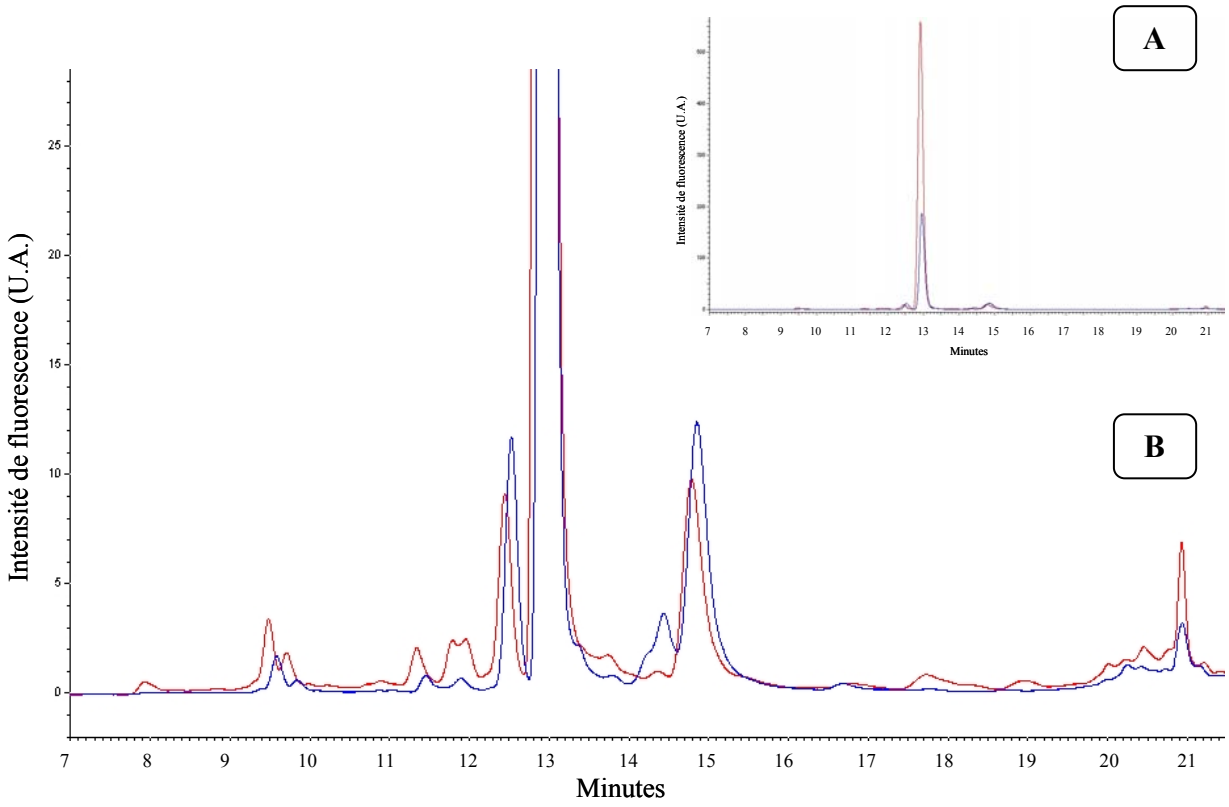


Figure 39 : Chromatogrammes d'un mélange glutamine+méthylglyoxal (—) et d'un mélange ammoniac+méthylglyoxal (—) avec une détection par fluorescence λ_{ex} = 330

nm et λ_{em} = 450 nm (A : profil entier du chromatogramme ; B : profil agrandi sur l'axe des ordonnées).

Les résultats de cette analyse comparative indiquent qu'il n'y a pas de véritable différence qualitative de fluorescence entre les deux mélanges. Nous en déduisons qu'il n'existe pas de fluorophores spécifiques de la glutamine dans nos conditions de traitement thermique.

De plus, cette expérience confirme la nette différence d'intensité de fluorescence obtenue avec la glutamine et l'ammoniac. La comparaison des sommes des aires de tous les pics chromatographiques révèle encore que la glutamine produit 2,5 fois plus de fluorescence que l'ammoniac. Ce résultat corrobore celui qui a été présenté dans le chapitre précédent, et qui a été obtenu par simple spectrofluorimétrie.

Dans le chapitre précédent, nous avions fait l'hypothèse que la glutamine contribuait à la formation de deux types de fluorophores : des fluorophores qui lui seraient spécifiques (fluorophores I) et des fluorophores qui seraient issus de l'ammoniac libérée au cours de la lactamisation (fluorophores II). Nous pouvons maintenant conclure qu'un seul type de fluorophores est formé.

A la vue des résultats présentés ci-dessus, nous pouvons émettre une nouvelle hypothèse selon laquelle la glutamine non dégradée en PGA participerait à la réaction de Maillard (par attaque nucléophile de l'α-NH_2) et formerait les mêmes composés que ceux obtenus à partir d'ammoniac issu de la lactamisation. En effet, il a déjà été montré que la fonction α-amine d'acides aminés participe à la formation d'hétérocycles azotés de type alkylpyrazine (Hwang*, et coll.*, 1995b).

Il existerait alors deux voies de synthèse (figure 40) pour former les mêmes fluorophores. Et une forte réactivité de l'α-NH_2 portée par la glutamine associée à une désamination pourrait expliquer la différence d'intensité de fluorescence que nous observons entre la glutamine et l'ammoniac.

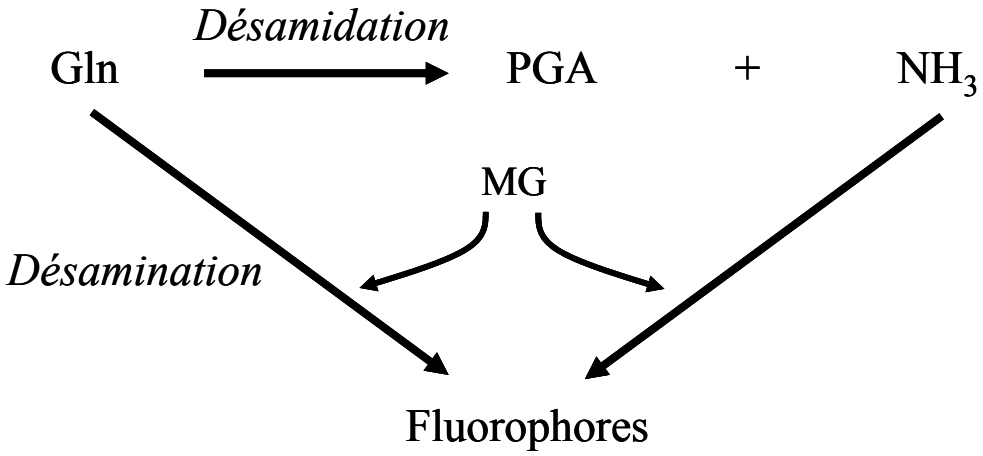


Figure 40 : Seconde hypothèse de synthèse de fluorophores à partir de la glutamine et de l'ammoniac en présence de méthylglyoxal.

Finalement, trois observations nous laissent prétendre à la formation des mêmes fluorophores soit à partir de la glutamine soit à partir de l'ammoniac, en présence de méthylglyoxal.

Premièrement, nous obtenons les mêmes spectres de fluorescence pour les deux mélanges (Annexe II).

Deuxièmement, nous calculons un rapport intensité de fluorescence/absorbance égal à 14 pour le mélange composé de glutamine et de méthylglyoxal contre 17 pour le mélange ammoniac+méthylglyoxal (figure 37 B). Cette différence est beaucoup plus faible comparée à celle obtenue avec la glutamine et l'urée (14 contre 74). Cela signifierait alors que les mélanges glutamine/méthylglyoxal et urée/méthylglyoxal conduisent à la formation de différents produits de Maillard. Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer cette différence car l'urée, qui est un amide, ne peut réagir directement avec un composé dicarbonylé. Elle ne devrait pouvoir réagir qu'une fois désamidée. Cela mériterait une étude plus approfondie qui ne sera pas conduite dans le cas présent.

Et troisièmement, nous obtenons, par chromatographie couplée à une détection par fluorescence, deux profils identiques (figure 39) pour les mélanges glutamine/méthylglyoxal et ammoniac/méthylglyoxal, indiquant ainsi l'équivalence qualitative de formation des différents fluorophores.

Ainsi, nous avons de fortes présomptions quant la formation de fluorophores identiques par désamidation et par désamination de la glutamine.

4. Dosage de l'acide pyroglutamique formé à partir d'un mélange glutamine + méthylglyoxal

Il n'existe pas de méthode analytique directe qui permettre de vérifier l'hypothèse formulée ci-dessus. Cependant, grâce au dosage du PGA dans les modèles simples, nous allons tenter de prouver l'implication de la glutamine dans la formation de fluorophores sans dégradation préalable en PGA et ammoniac.

Le PGA est un parfait indicateur de la quantité de glutamine dégradée par simple traitement thermique. Puisqu'une molécule de glutamine se transforme en une molécule de PGA et une molécule d'ammoniac, nous pouvons évaluer le pourcentage de glutamine impliquée dans une réaction de dégradation directe ou dans une réaction de Maillard en dosant le PGA. Précisons que nous avons prouvé précédemment que le PGA est une molécule stable dans nos conditions d'incubation, et qu'après 2h d'incubation à 120°C la glutamine a totalement disparu du milieu réactionnel.

En adaptant les équations que nous avons publiées récemment (Niquet & Tessier, 2007), nous pouvons présenter le pourcentage de fluorescence émise par les produits issus de la glycation de l'α-amine de la glutamine (sans formation de PGA) de la façon suivante :

$$\text{Pourcentage de fluorescence issu de la glutamine sans formation de PGA} = \frac{[Gln]_{t0} - [\text{PGA formé}]_{t2h} - [Gln]_{t2h}}{[Gln]_{t0}} \times 100$$

$[Gln]_{t0}$ représente la concentration initiale de glutamine dans nos modèles simples, et $[Gln]_{t2h}$ et $[\text{PGA formé}]_{t2h}$ représentent respectivement la concentration de glutamine et de PGA en fin de réaction. Dans nos conditions $[Gln]_{t0}$ est égale à 100 mM et $[Gln]_{t2h}$ est égale à 0 mM.

Afin d'évaluer le pourcentage de produits fluorescents issus de la glutamine, nous avons donc dosé l'acide pyroglutamique formé dans un mélange composé de glutamine

(100 mM) et de méthylglyoxal (200 mM) à pH 9 incubé à 120°C pendant 2 h. Le même dosage a été réalisé sur une solution de glutamine incubée dans les mêmes conditions sans méthylglyoxal.

Les résultats de ces dosages confirment qu'en absence de composé dicarbonylé, la glutamine se transforme totalement en PGA, soit 100 mM de PGA formé. Par contre, lorsqu'un rapport molaire 1/2 est établi entre la glutamine et le méthylglyoxal, nous ne retrouvons que 83 mM de PGA en solution. A l'aide de la formule présentée ci-dessus, nous pouvons conclure que 17% de la glutamine ne s'est pas dégradée en PGA et ammoniac, et pourrait former des produits de Maillard, peut-être impliqués dans la formation de fluorescence.

Puisqu'il est admis qu'une fonction amide ne peut participer à la formation d'une imine, nous pouvons conclure à une probable participation de l'α-amine de la glutamine dans la formation de fluorophores en présence de méthylglyoxal. Cependant le pourcentage de 17% ne permet d'expliquer que partiellement la forte différence d'intensité de fluorescence que nous observons entre la glutamine et l'ammoniac. D'autres expériences nous permettrons de revenir sur cette estimation (paragraphe II.7 ; p 177).

II. ETUDE DE QUATRE FLUOROPHORES PRODUITS PAR REACTION ENTRE LA GLUTAMINE ET LE METHYLGLYOXAL

Nous avons cherché à identifier les fluorophores formés par réaction de Maillard entre la glutamine et le méthylglyoxal (figure 39). Dans un premier temps, nous avons décidé d'isoler et de purifier les principaux fluorophores par chromatographie pour ensuite tenter de caractériser leur structure chimique à l'aide de différentes techniques analytiques.

Après identification, nous étudierons les cinétiques de formations des principaux produits fluorescents en fonction du pH et de la température d'incubation en milieu aqueux.

Enfin, nous ferons une étude plus approfondie sur le fluorophore identifié comme étant majoritaire dans nos modèles simples. Nous étudierons entre autres sa stabilité thermique et l'influence de différentes amines sur sa formation. Une expérience de compétition entre le méthylglyoxal et le glucose sera aussi présentée en fin de chapitre.

1. Introduction

L'analyse chromatographique d'un mélange de glutamine et de méthylglyoxal, chauffé à 70°C pendant 3 jours est représenté sur la figure 41. La température relativement faible de chauffage utilisée dans cette expérience et le pH acide ont été préférés à la température de 120°C et au pH alcalin généralement utilisés jusqu'à présent dans nos modèles simples. En effet, nous avons constaté que ces nouvelles conditions permettaient d'obtenir un bon compromis entre la synthèse du fluorophore principal et celle d'autres fluorophores que nous allons tenter d'isoler.

Le profil chromatographique présenté sur la figure 41 nous permet d'observer quatre pics ou groupe de pics majoritaires. Afin d'apporter la meilleure clarté possible dans l'ensemble du texte de la thèse, nous avons décidé de les nommer dès à présent par leur nom chimique le plus complet :

- A : Acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique au temps de rétention de 9,5 min
- B : Acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique au temps de rétention de 13,2 min
- C : Composé hétérocyclique C au temps de rétention 15 min
- D : Composé hétérocyclique D au temps de rétention s'étalant 15,8 à 17 min.

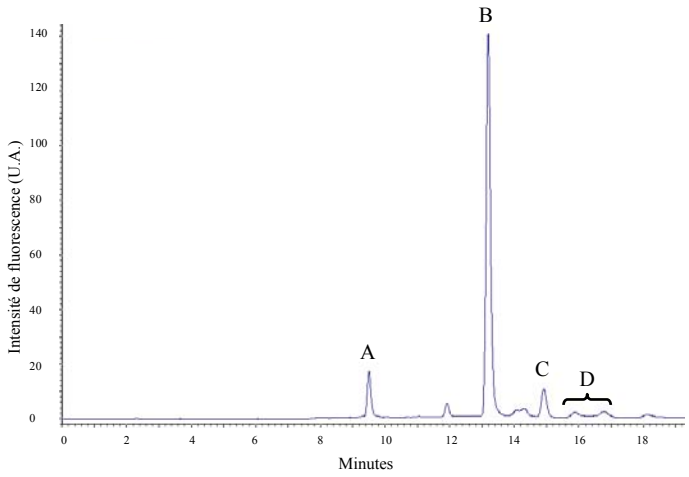


Figure 41 : Chromatogramme obtenu en HPLC/Fluo (λ_{ex} = 330 nm et λ_{em} = 450 nm) à partir d'une solution de glutamine et méthylglyoxal en milieu tampon pH 5 incubée pendant 3 jours à 70°C.

2. Identification structurale des quatre fluorophores

a. Séparation de chacun des fluorophores

Les quatre molécules sont séparées par HPLC selon les conditions chromatographiques présentées page 125, collectées en sortie de cellule du détecteur UV et concentrées au Speed-Vac. La quantité maximale de charge sur notre colonne analytique de diamètre 4,6 mm a été estimée à 1 mg. Il faut préciser que la quantité maximale de charge correspond à la quantité maximale d'échantillon pouvant être injecté sans perte importante de résolution. Cette quantité est bien évidemment dépendante de la taille de la colonne HPLC. Dans nos conditions, les quatre molécules fortement concentrées émettent un signal de fluorescence qui est saturant et qui, par conséquence, ne permet pas d'identifier finement leur temps d'élution. Pour remédier à ce problème de saturation du signal, nous avons utilisé une détection UV à 320 et 360 nm qui permet de détecter et de collecter chaque molécule à la sortie de la colonne.

Chaque molécule ainsi préparée est analysée par LC-MS-MS afin d'identifier sa structure chimique.

Les chromatogrammes présentés sur la figure 42 ont été obtenus par LC-MS. Ils représentent une sélection d'ions issue du courant total d'ions (en anglais : Total Ion Current ou TIC) en fonction du temps. L'analyse LC-MS des quatre fluorophores isolés par HPLC-UV montre que la technique de purification que nous avons mis en place a été efficace. En effet la pureté HPLC-MS des quatre molécules est toujours supérieure à 98%.

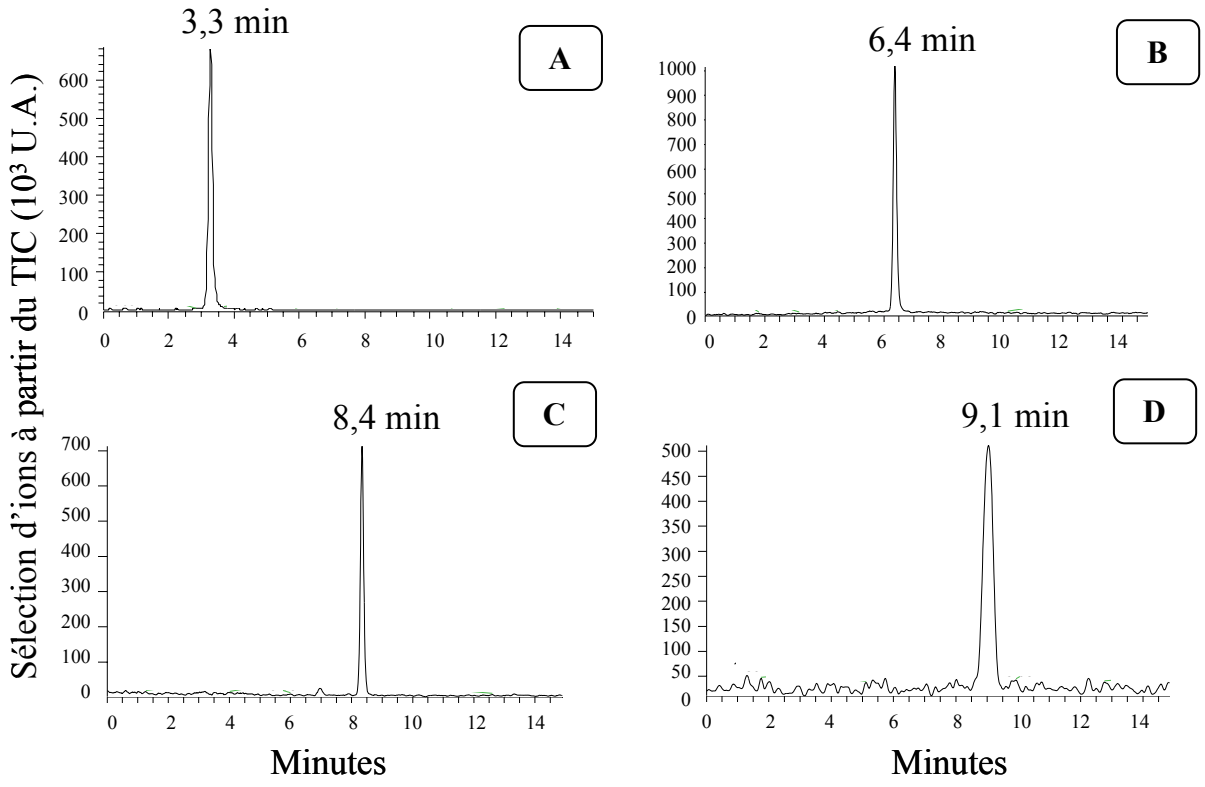


Figure 42 : Chromatogrammes de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), de l'hétérocycle C (C) et de l'hétérocycle D (D) obtenus en LC-MS.

Ces analyses avaient aussi pour objectif de transposer notre technique chromatographique mise au point initialement sur colonne analytique (dimensions : 250 × 4,6 mm) avec une double détection UV-Fluo, vers une chromatographie sur colonne de dimension réduite (colonne *narrowbore* de 150 × 2 mm) avec une double détection UV-MS. Après avoir identifié les temps de rétention des quatre principaux fluorophores formés dans le mélange réactionnel glutamine+méthylglyoxal nous pouvons analyser ce mélange par LC-MS sans purification préalable.

Après optimisation des conditions chromatographiques sur colonne Luna C18(2) de dimensions 150 × 2,0 mm, avec une granulométrie de 5 µm (Phenomenex, Le Pecq, France), nous avons sélectionné une phase mobile constituée de deux éluants : l'acide formique (0,1% v/v dans l'eau UHQ, éluant A) et l'acétonitrile contentant 0,1% (v/v) d'acide formique (éluant B). Le débit est fixé à 0,3 mL/min et le gradient est détaillé dans le tableau 9.

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
7	95	5
14	95	5
20	50	50
25	50	50
27	100	0
40	100	0

Tableau 9 : Gradient d'élution pour l'analyse de quatre fluorophores par LC-MS (pourcentages d'éluants A et B en fonction du temps).

Le chromatogramme de la figure 43 montre une parfaite résolution des quatre molécules avec les temps de rétention suivants :

- t_r = 3,5 min : acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique
- t_r = 6,5 min : acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique
- t_r = 8,5 min : composé hétérocyclique C
- t_r = 9,1 min : composé hétérocyclique D

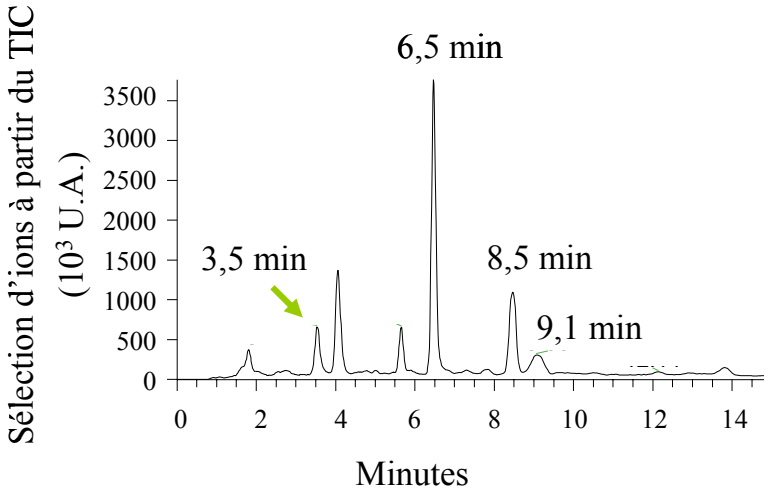


Figure 43 : Chromatogramme d'un mélange glutamine+méthylglyoxal obtenu en LC-MS.

L'ordre d'élution des quatre fluorophores est identique à celui qui est obtenu sur colonne analytique. Cependant, nous constatons une accélération de l'élution (une réduction des temps de rétention) qui est principalement attribuée à l'augmentation de la température de la colonne de phase inverse (35°C en HPLC-UV-MS contre seulement 20°C en HPLC-UV-Fluo).

b. Caractéristiques spectrales

L'étude des spectres d'absorption électronique et d'émission de fluorescence peut théoriquement servir à l'identification et à la détermination d'une structure chimique. L'identification des maxima et épaulements des spectres peut être un élément important de caractérisation structurale. Cependant il est évident que nous allons utiliser en priorité les spectres de masse ainsi que les spectres RMN du proton et du carbone pour tenter de déterminer la structure des quatre fluorophores.

L'identification des spectres d'absorbance et de fluorescence reste intéressante pour de futures applications.

♦**Spectres d'absorbance**

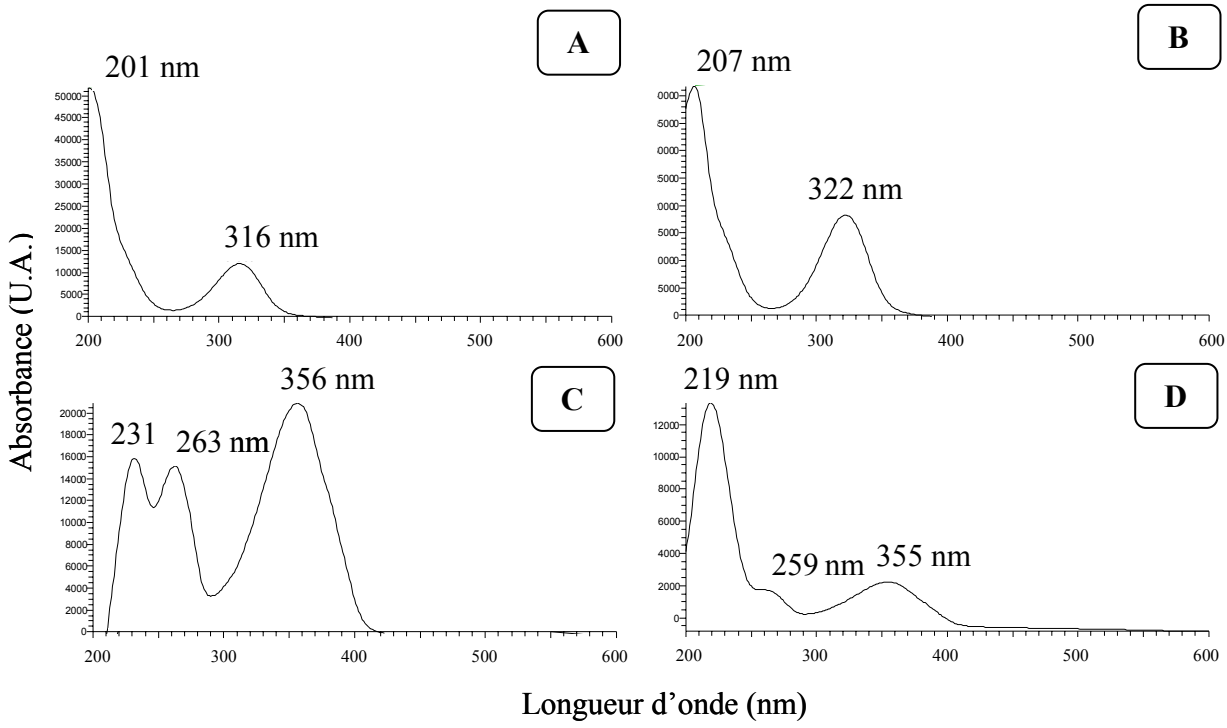


Figure 44 : Spectres d'absorbance de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D) dans l'éluant HPLC composé d'acide formique à pH 2,5.

Les spectres d'absorbance de la l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique et de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique sont presque identiques (figure 44 A & B). Ils possèdent respectivement deux transitions correspondant aux bandes dont les maxima d'absorption sont 201 et 316 nm ; et 207 et 322 nm. Les spectres d'absorbance des composés hétérocycliques C et D sont nettement plus complexes avec, aux fréquences testées, trois maxima par molécule : 231, 263 et 356 nm pour l'hétérocycle C et 219, 259 et 355 nm pour l'hétérocycle D (figure 44 C & D).

♦**Spectres de fluorescence**

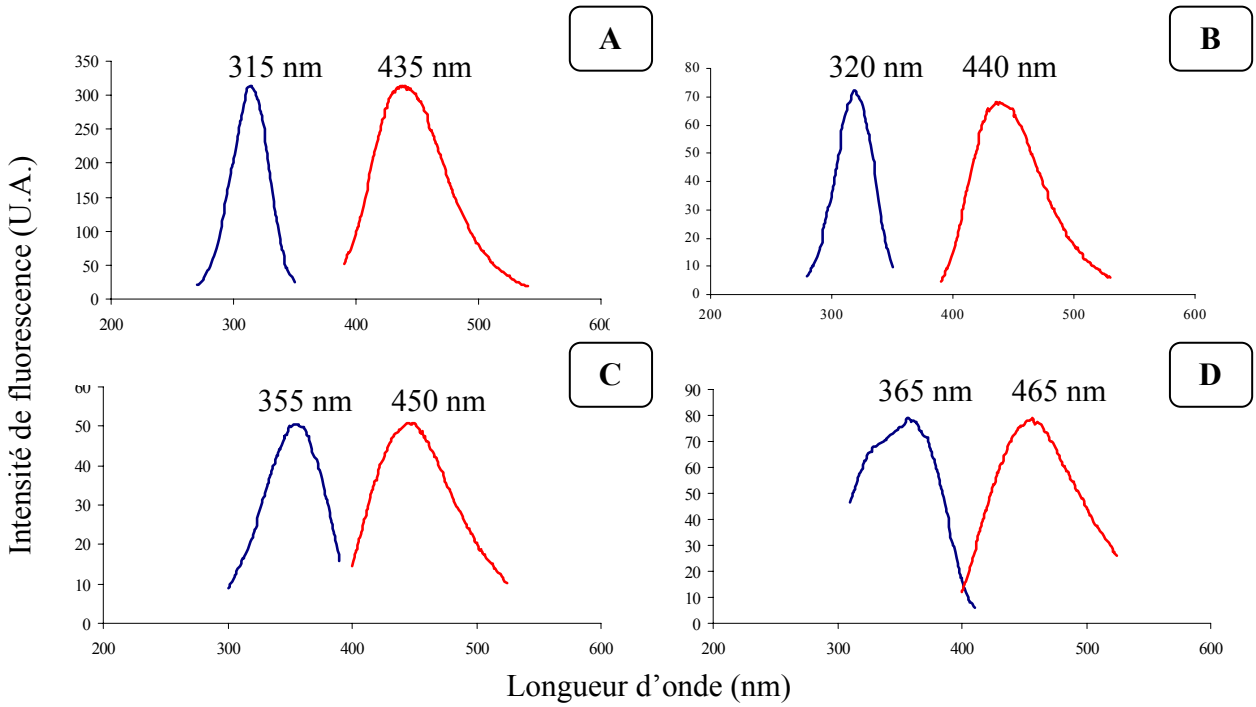


Figure 45 : Spectres de fluorescence de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D) en milieu tampon phosphate 200 mM à pH 7.

Comme cela est généralement attendu, les maxima des quatre spectres d'excitation (graphes bleus de la figure 45) sont très proches de ceux des spectres d'absorption correspondants (figure 44). Les longueurs d'onde maximales de la lumière émise par chaque fluorophore varient de 435 pour l'acide nicotinique mono-méthylé à 465 nm pour l'hétérocycle D (graphes rouges de la figure 45).

Il est important d'observer que la position des maxima des spectres d'excitation et d'émission des quatre fluorophores formés par réaction entre la glutamine et le méthylglyoxal est n'est pas très éloignée de celle qui est généralement décrite pour les produits de Maillard fluorescents (Moreaux*, et coll.*, 1996 ; Tessier*, et coll.*, 2003).

La forme ionisée et la forme moléculaire d'une base faible ou d'un acide faible possèdent des structures électroniques différentes. En conséquence, elles auraient aussi des spectres électroniques différents. En se référant à cette théorie, il nous a paru intéressant de regarder quel était l'effet du pH sur la forme et l'intensité des spectres du fluorophore majoritaire de notre modèle simple. Nous avons donc réalisé les spectres de fluorescence à différents pH sur l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (figure 46).

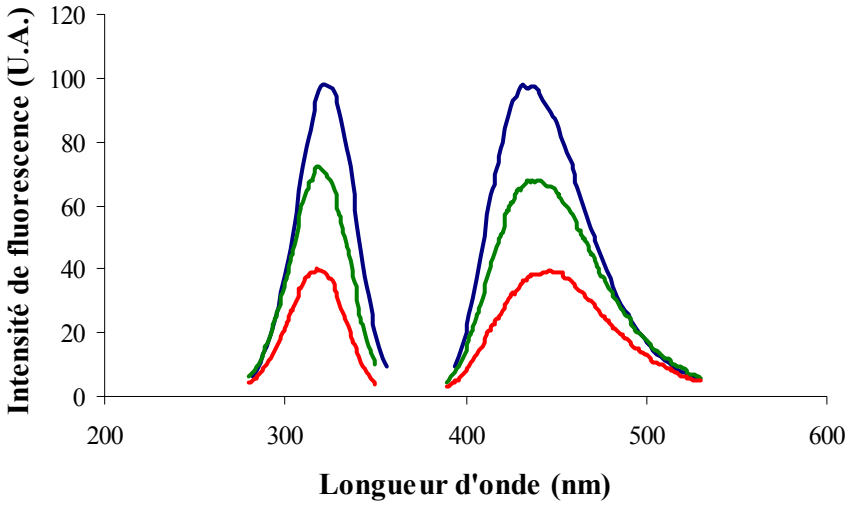


Figure 46 : Spectres de fluorescence de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction du pH : pH 3 (—) ; pH 7 (—) et pH 10 (—).

Nous constatons que le pH a une influence sur l'intensité de fluorescence de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique mais pas sur ses maxima d'émission et d'excitation. En effet, un milieu acide a tendance à augmenter l'intensité de fluorescence sans déformation de spectre (figure 46).

Une intensité d'absorbance faible, et donc un coefficient d'extinction molaire faible, à pH 10 sembleraient indiquer que le fluorophore est majoritairement sous forme moléculaire à pH basique (Hamon*, et coll.*, 1979). Cela signifierait que cette molécule est une base faible. Cependant la théorie précise que dans ce cas il y aurait aussi un déplacement du maximum de longueur d'onde d'excitation. En conclusion, nous pensons qu'il est difficile de se fier à ce type de donnée pour identifier la structure chimique d'une molécule. De plus, les spectres de masse et de RMN que nous allons présenter seront nettement plus précis et non équivoques.

♦**Spectres de masse et MS^2**

Les spectres de masse que nous avons obtenus vont non seulement nous permettre de déterminer la masse moléculaire des quatre fluorophores, mais également nous fournir des indications allant de la formule brute jusqu'à la structure moléculaire.

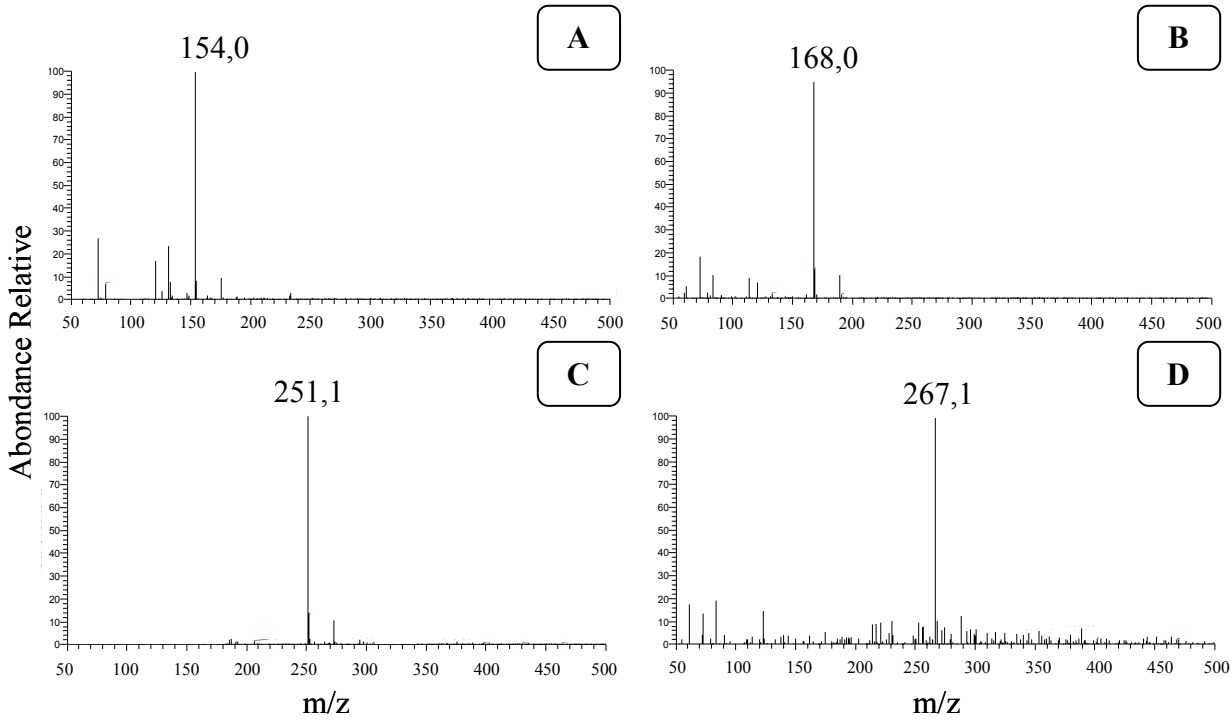


Figure 47 : Spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D).

Les spectres de masse sont regroupés sur la figure 47. Ils permettent d'identifier la masse moléculaire de chaque fluorophore. L'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique et l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique ont respectivement des masses moléculaires de 153 et 167. On observe qu'elles ne sont distantes que de 14 unités de masse. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ce sont deux structures proches avec une fonction méthyle supplémentaire sur la molécule de masse 167. Les deux composés hétérocycliques ont des masses moléculaires égales à 250 et 266.

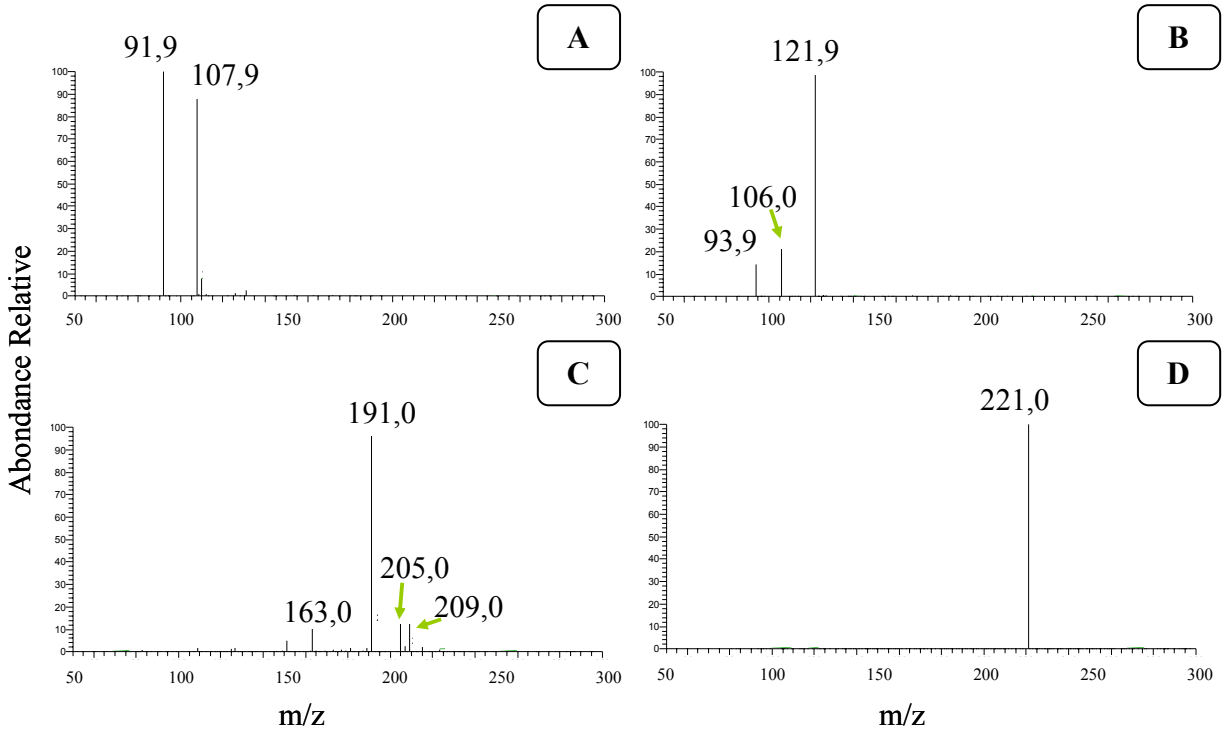


Figure 48 : Spectres MS² de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D).

La recherche des principaux fragments de chaque fluorophore a été réalisée en MS/MS avec activation de bande large. Comme nous l'avons détaillé dans la partie Matériel et Méthodes (p 88), cette pseudo-MS^3 permet une fragmentation plus complète et plus riche en informations structurales.

Par conséquent, nous ne détectons pas le fragment classique de masse $[M+H-18]^+$ sur les spectres MS/MS de la figure 48. Par contre, différents fragments sont observés et peuvent être expliqués par la perte de quelques fonctions caractéristiques. La fragmentation de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique permet de détecter deux fragments majoritaires de m/z égales à 108 et 92 qui correspondent respectivement à la perte d'un HCOOH (-46) et d'un H_2O+CO_2 (-18-44) (figure 48 A). L'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique se fragmente selon le même schéma avec une perte de HCOOH (-46) et une double perte de H_2O+CO_2 (-18-44). Un fragment supplémentaire est observé (m/z = 94) et attribué à une double perte de HCOOH+CO (-46-28) (figure 48 B). Le composé hétérocyclique C donne un spectre MS/MS relativement complexe avec des pertes de C_2H_2O (-42), de HCOOH (-46), de $H_2O+C_2H_2O$ (-18-42) et de $HCOOH+C_2H_2O$ (-46-42). Enfin le composé hétérocyclique D ne donne qu'un

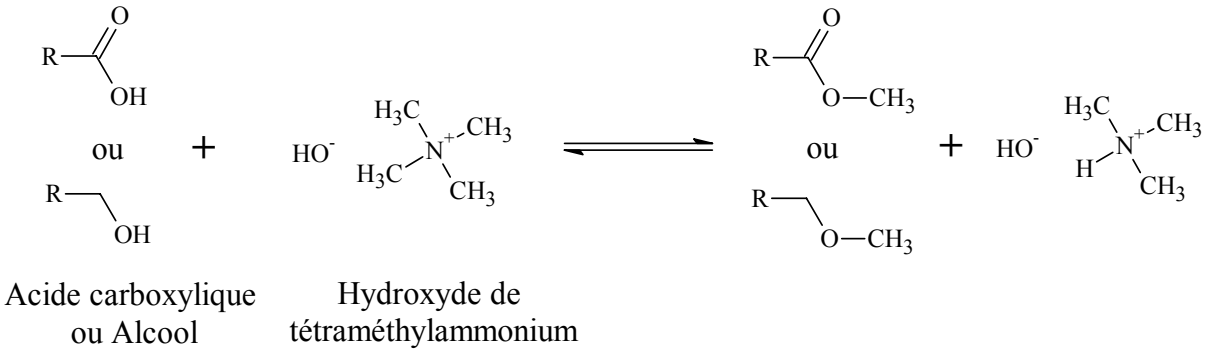
seul fragment de m/z égale à 221 qui indique une perte de HCOOH (-46). Une fragmentation MS^3 sur l'ion 221 a été réalisée. Cependant une fragmentation très complexe s'est révélée peu informative.

La découverte de ces différents fragments est un élément supplémentaire d'identification structurale sur lequel nous reviendrons en fin de chapitre.

c. Recherche de fonctions hydroxylées et carboxyliques sur le principal fluorophore

L'emploi d'analyses organiques fonctionnelles est de moins en moins fréquent pour la caractérisation de nouvelles molécules. Cependant, l'identification des fonctions principales d'une molécule par chimie analytique organique est souvent très efficace.

L'analyse MS/MS du fluorophore majoritaire, de masse 167, semble indiquer la présence d'un acide carboxylique. Nous avons donc recherché, sur cette molécule, ce type de fonction en formant un dérivé qui sera détecté par changement de temps de rétention et augmentation de m/z en LC-MS. La dérivatisation que nous avons sélectionnée repose sur l'action du tétraméthylammonium (TMAH) sur les fonctions OH. Le TMAH entraîne une méthylation de l'alcool ou de l'acide carboxylique aboutissant à la formation respective d'une fonction éther ou ester (figure 49). Cette réaction est réalisée en milieu organique afin de limiter sa réversibilité. En effet il a été montré que l'eau déplaçait l'équilibre vers la régénération du substrat.



Acide carboxylique ou Alcool

Hydroxyde de tétraméthylammonium

Figure 49 : Schéma réactionnel de la méthylation d'un acide carboxylique ou d'un alcool par le TMAH.

A un volume de 75 µL d'une fraction pure de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique préparée dans le méthanol, nous ajoutons 5 µL d'une solution commerciale de TMAH à 25% dans le méthanol. Après 5 min de réaction, le mélange ainsi préparé est analysé par LC-MS.

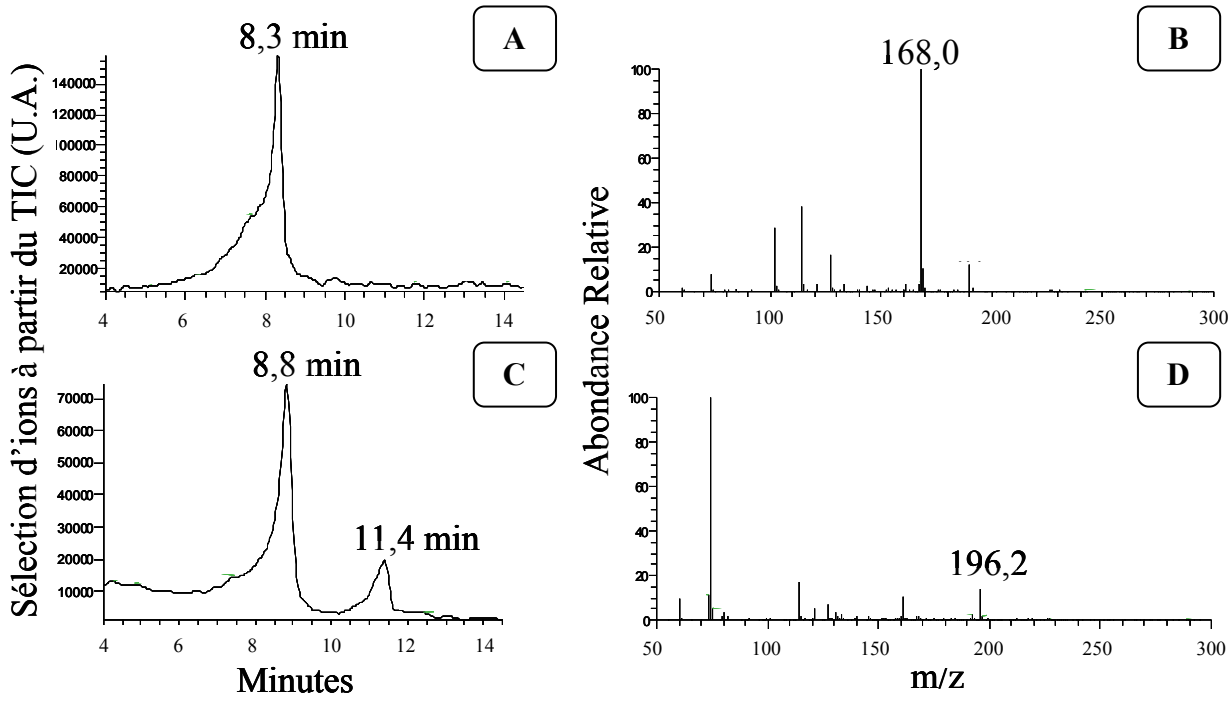


Figure 50 : Analyse chromatographique de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique avant (A) et après (C) réaction avec le TMAH, avec les spectres de masse associés au pic élué à 8,3 min (B) et au pic élué à 11,4 min (D).

Avant ou après réaction avec le TMAH, l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique est élué entre 8,3 et 8,8 min (Figure 50 A & C). La perte de résolution observée dans ces conditions (déformation des pics chromatographiques avec traînée en début de pic) est probablement provoquée par la présence de méthanol dans les échantillons. Après réaction avec le TMAH, un deuxième pic apparaît avec un temps de rétention de 11,4 min (figure 50 C). Ce pic, qui correspond à un ion moléculaire de m/z égale à 196, est le produit dérivé du fluorophore dont nous recherchons la structure (Figure 50 D). La différence de masse entre le produit initial et sa structure dérivée par le TMAH est de 28, soit 2 fois 14. Cela signifie que deux fonctions hydroxyles ont été méthylées.

D'après la masse moléculaire du fluorophore étudié (167) et le spectre MS/MS, il existe une forte probabilité pour que cette molécule possède 3 atomes d'oxygène. Nous pouvons donc prédire que cette pyridine présente au sein de sa structure deux groupements OH et un groupement CO. Les différentes fonctions possibles sont soit une fonction alcool et une fonction carboxylique, soit deux fonctions alcool et une fonction cétone ou aldéhyde.

d. Analyse du nombre de protons dits « échangeables » sur le fluorophore majoritaire

Un proton échangeable est un proton porté par des groupements amines et hydroxyles. Sur ce type de fonctions, les atomes d'hydrogène ne sont pas liés de manière parfaitement stable et peuvent être échangés avec les atomes d'hydrogène présents dans le solvant.

Pour l'analyse RMN de l'échantillon purifié d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, nous l'avons solubilisé dans 300 µL de D_2O à 99,97%. Nous avons tiré profit de cette préparation pour rechercher quel était le nombre de protons échangeables sur cette molécule. Dans ce cas, l'échange se fait entre un atome d'hydrogène et un atome de deutérium qui est un isotope stable de l'hydrogène. Après analyse LC-MS de l'échantillon préparé dans de l'eau deutériée, on observe que le rapport m/z de l'ion est de 171, soit trois unités de masse de plus que l'ion analysé dans un solvant aqueux. Nous avons donc un ion $[M+D]^+$ qui contient deux atomes de deutérium.

Nous pouvons donc conclure que la pyridine testée possède deux protons échangeables. Par ailleurs, cette mesure montre une parfaite concordance avec le résultat de méthylation. En effet, nous pouvons concevoir que les deux protons échangeables sont portés par un acide carboxylique et un hydroxyle.

e. Estimation du nombre d'atomes de carbone et d'azote

Les spectres de masse peuvent également nous fournir des indications sur le nombre d'atomes de carbone et d'azote contenus dans chaque composé. Dans ce chapitre, nous allons exposer dans un premier temps la théorie qui sous-tend ces méthodes d'estimation, puis nous l'appliquerons à nos spectres de masse et ferons des propositions de formules brutes.

♦Calcul du nombre d'atomes de carbone

En règle générale, les atomes possèdent plusieurs isotopes : un ou deux isotopes majoritaires suivis de quelques isotopes de poids plus élevés. Sur une molécule organique, l'isotopie des atomes de carbone a pour conséquence de faire apparaître sur un spectre de masse un pic situé à une unité de masse du pic moléculaire le plus abondant. Ce pic est dû à la présence de l'isotope ^{13}C représentant environ 1,1% du carbone naturel. La hauteur de ce pic est proportionnelle au nombre de carbone de la molécule analysée. En effet, la probabilité de rencontrer un atome de ^{13}C dans une molécule contenant par exemple deux carbones est deux fois plus importante que celle attendue dans un composé monocarboné, et ainsi de suite si on augmente le nombre de carbone. Pour une molécule présentant *n* carbones, le pic $[M+H+1]^+$ représente $n \times 1,1\%$ la hauteur du pic $[M+H]^+$. Nous pouvons alors appliquer la formule suivante :

$$\text{Nombre d'atomes de carbone} = \frac{\text{Intensité du pic } [M+H+1]^+ \text{ (en \%)}}{1,1}$$

Il est utile de préciser que d'autres atomes possèdent aussi des isotopes naturels de masse supérieure comme l'hydrogène (0,016% de ^{2}H), l'azote (0,38% de ^{15}N) ou l'oxygène (0,04% de ^{17}O et 0,20% de ^{18}O), principaux atomes qui nous intéressent dans notre étude sur les produits de Maillard. Ces isotopes participent à l'intensité des pics de masses supérieures à $[M+H]^+$ mais dans une moindre intensité par rapport au ^{13}C.

Pour nos quatre molécules, nous allons tenter de calculer leur nombre d'atomes de carbone avec cette méthode. La figure 51 nous montre deux spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique issus d'une analyse en LC-MS (A) et d'une analyse en infusion (B) sur lesquels nous avons reporté les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+1]^+$.

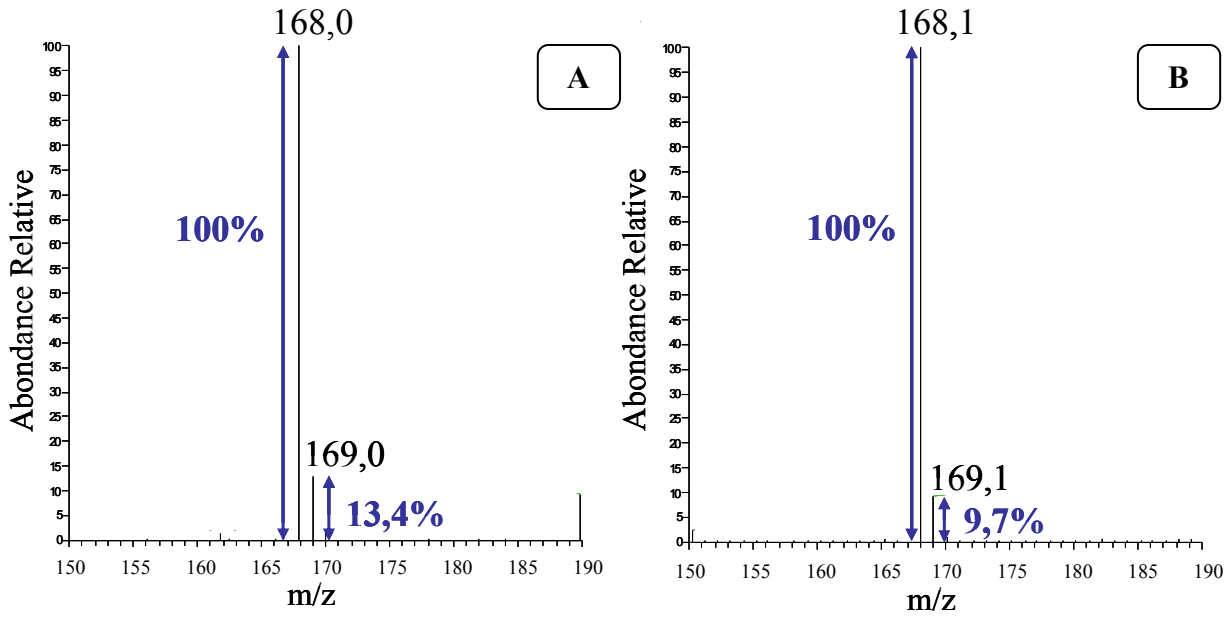


Figure 51 : Spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique extraits d'une injection en LC-MS (A) et d'une infusion (B) avec les intensités des pics m/z 168 et 169 permettant le calcul du nombre d'atomes de carbone.

Ainsi, avec l'intensité du pic de l'ion $[M+H+1]^+$ (m/z = 169), nous pouvons calculer le nombre d'atomes de carbone théorique contenus dans cette molécule. Le calcul est le suivant :

- En LC-MS : Nombre d'atomes de carbone = 13,4 / 1,1 = 12,2
- Par infusion : Nombre d'atomes de carbone = 9,7 / 1,1 = 8,8

Nous observons que selon le type d'analyse réalisée, nous n'obtenons pas le même nombre d'atomes de carbone. Nous avons effectué ce même calcul pour les trois autres composés. Cependant, dans ce cas, une seule analyse en LC-MS a été réalisée. Les spectres de masse regroupés dans la figure 52 permettent le calcul du nombre d'atomes de carbone pour chaque molécule.

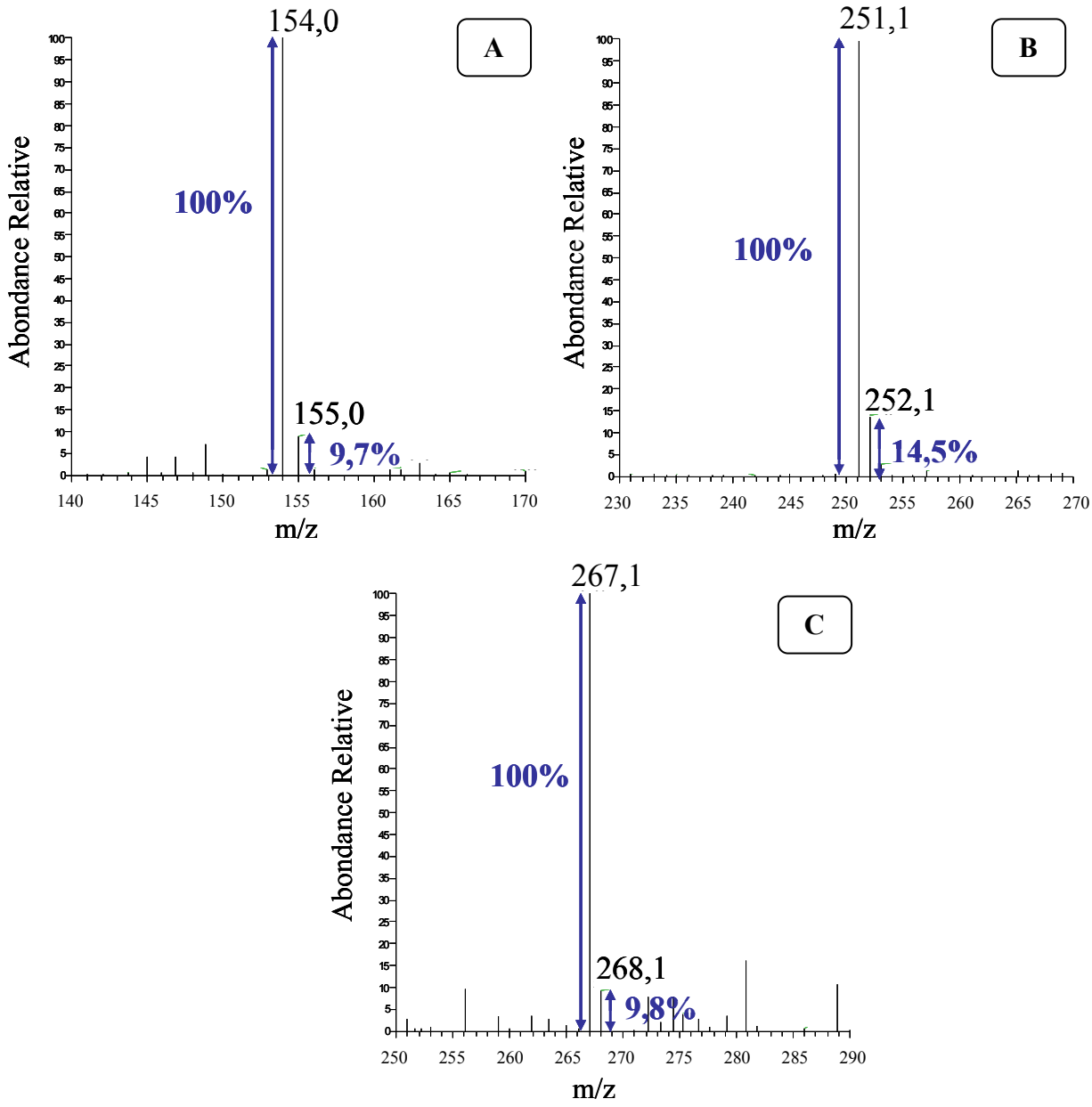


Figure 52 : Spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique (A), le composé hétérocyclique C (B) et le composé hétérocyclique D (C) avec les intensités des pics $[M+H]^+$ et $[M+H+1]^+$ pour le calcul du nombre d'atomes de carbone.

Composé	Intensité du pic $[M+H+1]^+$ (%)	Nombre d'atomes de carbone calculé	
		LC-MS	*Infusion*
Acide 5-hydroxy-2(ou 6)-méthylnicotinique	9,7	8,8	
Acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique	13,4	12,2	8,8
Hétérocycle C	14,5	13,2	
Hétérocycle D	9,8	8,9	

Tableau 10 : Estimation du nombre d'atomes de carbone pour nos quatre fluorophores.

Le tableau 10 résume les différents calculs que nous avons faits pour estimer le nombre d'atomes de carbone pour chaque fluorophore. Cependant, ces données sont à utiliser avec précaution. En effet, dans le cas de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, nous avons calculé ce nombre d'atomes à partir d'un spectre de masse extrait d'une analyse en LC-MS et à partir d'un autre spectre issu d'une analyse en infusion. La différence de 3 carbones obtenue entre les deux estimations nous incite à une certaine réserve quant à la fiabilité de ce calcul. De plus une molécule de masse moléculaire égale à 167 qui possède au moins un atome d'azote peut difficilement avoir 12 carbones dans sa structure chimique. Ce résultat est peut-être dû à un enregistrement de signal différent entre les deux analyses. De plus il faudrait s'assurer d'une non-saturation des pics à l'aide de l'utilisation du mode « profil » et non « centroïde » comme cela a été fait. Les résultats que nous présentons ici seront donc vérifiés par une analyse plus précise en spectrométrie de masse à haute résolution (MS-Q-TOF).

♦ Evaluation du nombre d'atomes d'azote : « la règle de l'azote »

La masse molaire d'une molécule (constituée des atomes C, H, N, O) est toujours paire sauf si elle contient un nombre impair d'azote.

Dans notre cas, les composés hétérocycliques C et D génèrent des ions $[M+H]^+$ impairs (m/z = 251 et 267, respectivement), leur masse moléculaire M est donc paire. Cela signifie que ces deux composés sont constitués d'un nombre pair d'atomes d'azote soit 2 ou 4. Un nombre plus important d'atomes d'azote ne serait pas possible pour des molécules de faibles masses.

A l'inverse, avec les deux pyridines, nous obtenons des ions $[M+H]^+$ pairs (m/z = 154 et 168), le nombre d'atomes d'azote présents dans ces deux molécules serait donc impair, soit 1 ou 3, puisque leur masse moléculaire M est impaire.

f. Détermination du nombre d'atomes d'azote

S'il est admis que la « règle de l'azote » utilisée ci-dessus est généralement fiable, nous avons néanmoins souhaité déterminer de manière rigoureuse et précise le nombre exact d'atome d'azote pour chaque fluorophore.

Nous avons incubé du chlorure d'ammonium ^{15}N en présence de méthylglyoxal, à 120°C pendant 2 h. Après analyse LC-MS des mélanges NH_3+MG et $^{15}NH_4Cl$+MG, nous avons comparé les spectres de masse de chaque fluorophore (figure 53).

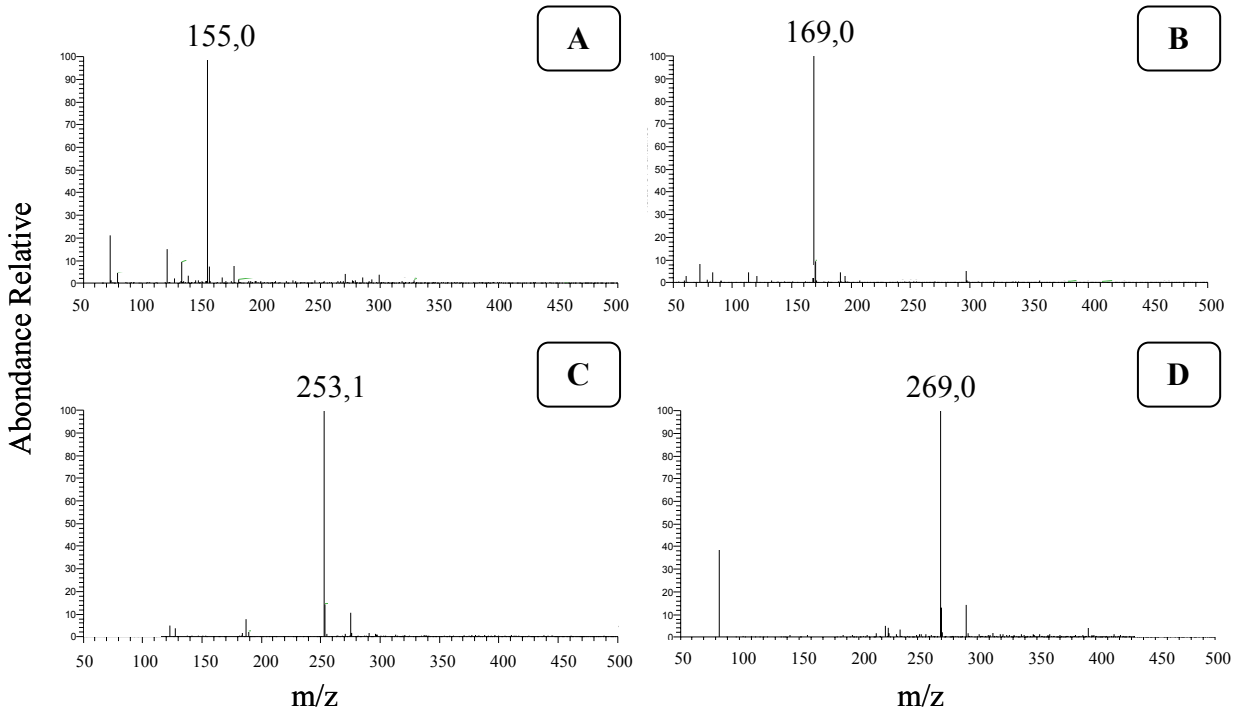


Figure 53 : Spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique ^{15}N (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique ^{15}N (B), du composé hétérocyclique C ^{15}N (C) et du composé hétérocyclique D ^{15}N (D) obtenus après analyse en LC-MS d'un mélange de $^{15}NH_4Cl$ et de méthylglyoxal.

Dans cette expérience, nous avons incubé un mélange NH_3+MG en remplacement du mélange glutamine+MG habituellement utilisé dans notre étude. Précisons que les spectres de masse des quatre fluorophores sont identiques dans les deux cas.

Les spectres de masse de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique et de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique formés en présence de $^{15}NH_4Cl$ révèlent respectivement des ions de m/z égales à 155 et 169 (figure 53 A & B). Une différence d'une seule unité de masse est observée entre ces ions et ceux qui étaient issus de la ^{14}N-glutamine ou de l'$^{14}NH_3$ (figure 47 A & B). Ces résultats confirment donc la présence d'un seul atome d'azote dans la structure de ces deux fluorophores.

La règle de l'azote a permis encore une fois de faire une bonne prédiction du nombre d'azote présent sur les composés hétérocycliques puisque la comparaison des spectres de masse obtenus avec ^{15}N (figure 53 C & D) et avec ^{14}N (figure 47 C & D) montre des différences de deux unités de masse. En conclusion, nous pouvons affirmer que ces deux composés possèdent au sein de leur structure deux atomes d'azote.

g. Caractérisation de la formule brute

Malgré le fait que l'on connaisse le nombre d'atome d'azote pour chaque fluorophore, que l'on ait évalué le nombre d'atomes de carbone, et que l'on ait des éléments d'information sur les groupements fonctionnels de certains d'entre eux, nous ne connaissons toujours pas leur formule brute.

Cela nous a conduit à compléter notre étude structurale par des analyses en spectrométrie de masse à haute résolution (MS-Q-TOF) qui devraient nous permettre de déterminer les masses exactes et les formules brutes pour chacun de nos quatre composés.

La Figure 54 montre les spectres de masse réalisés sur le spectromètre de masse Q-TOF pour les quatre fluorophores dont nous recherchons la formule brute. Pour chaque composé, est représenté le spectre de masse expérimental et le spectre de masse théorique associé à une seule possibilité de formule brute. Nous pouvons observer que les mesures expérimentales sont très proches des valeurs théoriques (écart inférieur à 0,001%).

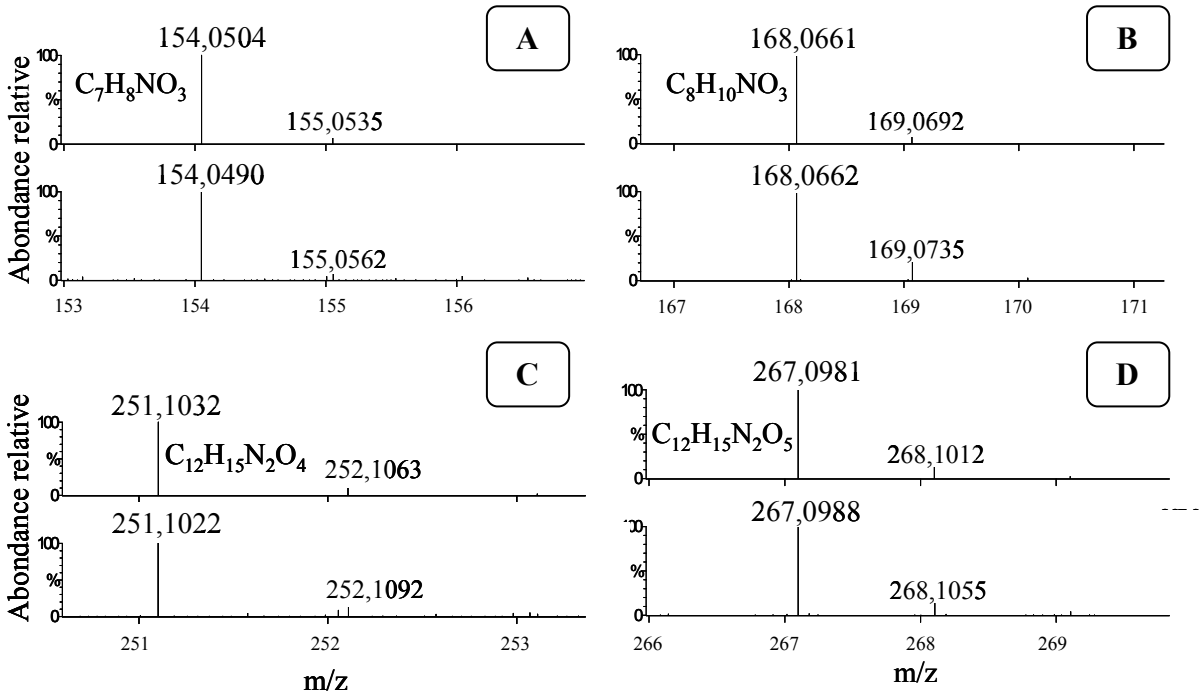


Figure 54 : Spectres de masse réalisés sur le spectromètre Q-TOF de l'acide 5-hydroxy-2(ou6)-méthylnicotinique (A), de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (B), du composé hétérocyclique C (C) et du composé hétérocyclique D (D). Pour chaque composé, sont présentés le spectre de masse théorique d'une formule brute donnée (en haut) et le spectre de masse expérimental du composé analysé (en bas).

Pour chaque molécule, nous avons donc identifié une formule brute qui semble convenir puisque la différence entre la masse de la formule brute théorique et la masse expérimentale est toujours inférieure à 2 mDa. Ces données sont résumées dans le tableau 11.

Composé	Masse Q-TOF MH^+	Formule brute MH^+
Acide 5-hydroxy-2(ou 6)-méthylnicotinique	154,0489	$C_7H_8NO_3$
Acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique	168,0662	$C_8H_{10}NO_3$
Hétérocycle C	251,1022	$C_{12}H_{15}N_2O_4$
Hétérocycle D	267,0988	$C_{12}H_{15}N_2O_5$

Tableau 11 : Résultats d'analyses en spectrométrie de masse à haute résolution de nos quatre fluorophores.

Ces résultats confirment nos différentes expériences réalisées pour déterminer le nombre d'atomes d'azote par molécule. Les deux fluorophores de plus petites masses possèdent effectivement un seul atome d'azote au sein de leur structure, et les deux fluorophores de masses supérieures ont chacune deux atomes d'azote. Ils confirment aussi le nombre d'oxygène que nous avions estimé pour la molécule de m/z égale à 168. En revanche, nous observons une différence avec les calculs du nombre d'atomes de carbone (voir tableau 10 ; p 147) qui ne semblent pas fiables dans nos conditions.

h. Analyse RMN

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une autre technique qui permet une étude fine de la structure d'une molécule. Pour obtenir une certitude structurale, il n'existe pas de meilleur outil analytique que la RMN. Cependant, pour obtenir des spectres RMN de bonnes qualités, il faut généralement un échantillon pur en quantité suffisante (au moins 1 mg). C'est pour cette raison qu'il est difficile d'obtenir ce type de spectres dans la recherche de nouvelles molécules issues de modèles simples comme les modèles de la réaction de Maillard. Néanmoins, avec des sondes plus adaptées aux faibles quantités, il serait théoriquement possible d'analyser une quantité inférieure au mg.

Malgré les difficultés de synthèse et de purification, nous avons tenté de produire au moins 1 mg du fluorophore le plus abondant. Comme nous l'évoquerons dans le paragraphe 5.b de ce chapitre (p 167), grâce à l'étude de la cinétique de formation de ce fluorophore en fonction de la température et du pH, nous avons pu identifier les conditions permettant d'optimiser la synthèse de cette molécule à partir d'un mélange ammoniac+méthylglyoxal. Après synthèse, cette molécule a été purifiée selon la méthode décrite dans la PARTIE II chapitre II : V (p 102), puis analysée en RMN afin de déterminer sa structure.

Le spectre RMN du proton est présenté dans la figure 55.

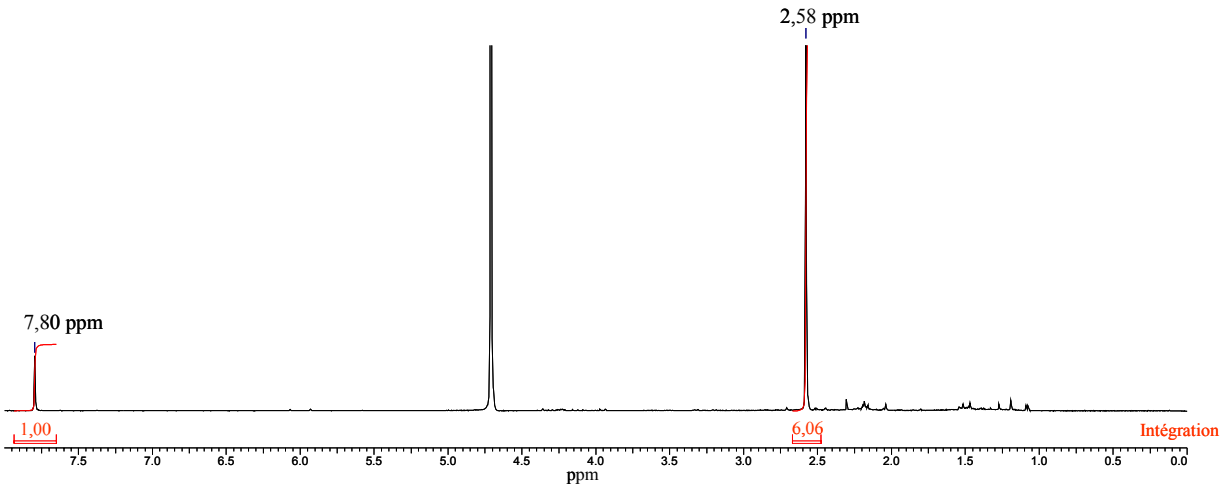


Figure 55 : Spectre RMN du proton de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique.

Seulement deux déplacements chimiques sont détectés à 2,6 et 7,8 ppm, le signal à 4,7 ppm étant attribué à l'eau résiduelle contenue dans l'échantillon. La détermination du nombre de protons existant sur les différentes fonctions d'une molécule est réalisée en calculant la surface des pics détectés. Après intégration de ces pics, nous obtenons un rapport 1/6 entre le proton localisé à 7,8 ppm et les protons localisés à 2,6 ppm.

Dans les tables de RMN du proton, les déplacements chimiques faibles correspondent à des groupements aliphatiques et les déplacements élevés à des protons portés par des carbones formant des liaisons multiples. Nous pouvons attribuer le déplacement chimique de 2,6 ppm à des protons de deux groupements méthyles et le déplacement de 7,8 ppm à un proton aromatique.

Nous savons que cette nouvelle molécule possède 9 protons au sein de sa structure. En RMN du proton, nous n'observons que 7 protons, les deux autres étant certainement des hydrogènes labiles invisibles en milieu D_2O. Ce résultat confirme ce que nous avions déjà observé par LC/MS (p 140) et par analyse organique fonctionnelle (p 141) à savoir que cette structure chimique possède deux groupements OH.

Les deux groupements méthyles sembleraient être identiques car nous n'identifions qu'un seul et unique déplacement chimique pour les deux CH_3 à 2,6 ppm. Sans analyse complémentaire cela signifierait que leurs environnements électroniques des noyaux seraient identiques, et que nous aurions ainsi une molécule relativement symétrique. Une analyse en RMN-2D ^{1}H-^{13}C nous a permis d'éclaircir ce point (figure 56).

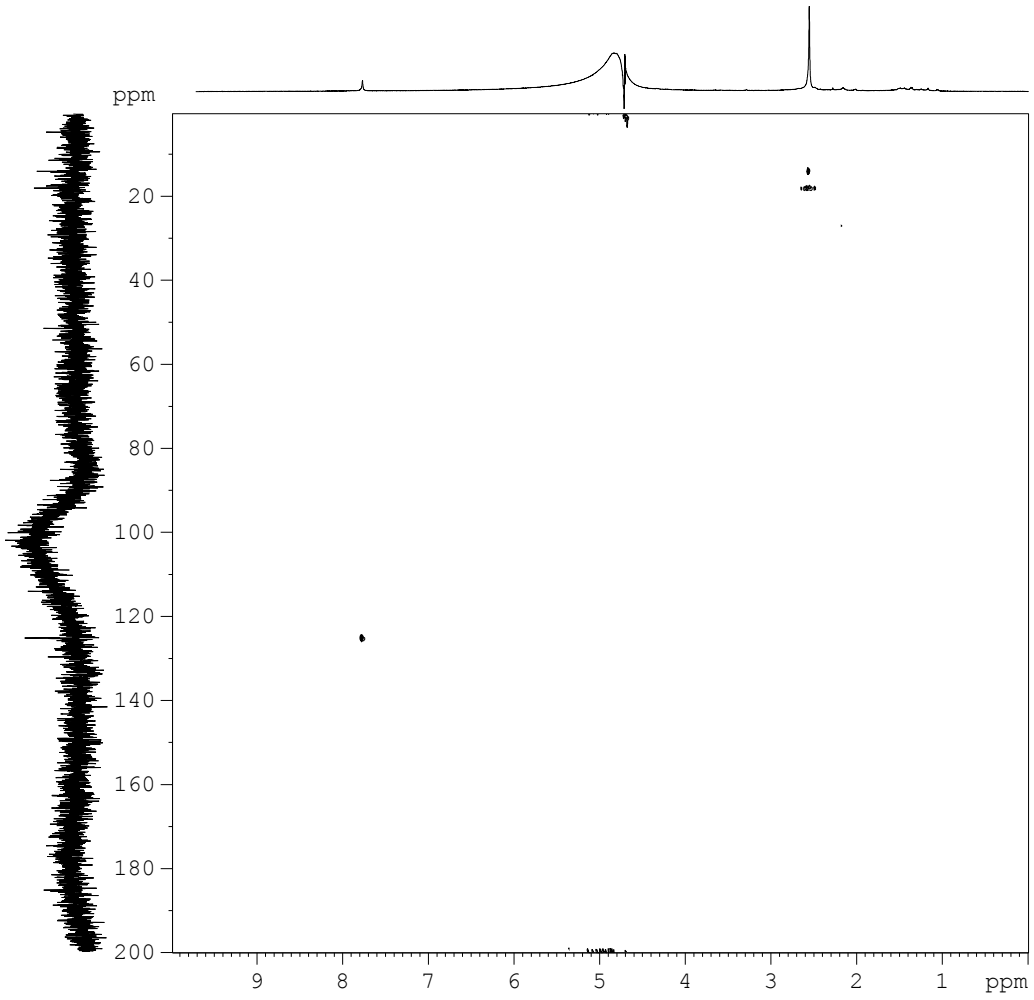


Figure 56 : Spectre RMN-2D ^{1}H-^{13}C de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (HSQC).

En effet, cette analyse permet de discriminer les deux groupements méthyles, puisque deux taches de corrélation sont identifiées au déplacement chimique de 2,6 ppm. Cela permet de conclure que les deux CH_3 n'ont pas un environnement électronique strictement identique

malgré le fait qu'ils présentent un seul déplacement chimique en RMN du proton. La molécule n'est donc pas rigoureusement symétrique.

i. Présentation de la formule chimique développée de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique

Si nous résumons l'ensemble des données que nous avons obtenues par différentes méthodes analytiques, nous pouvons lister les caractéristiques suivantes :

- Cette molécule absorbe à 320 nm et est fluorescente
- Sa formule brute est : $C_8H_9NO_3$
- Elle possède deux hydrogènes échangeables au sein de sa structure
- En MS/MS, une perte de 44 unités de masse en mode négatif ($-CO_2$) et de 46 unités de masse en mode positif (-HCOOH) indique qu'il y a une fonction acide
- Ce composé présente deux fonctions méthyles quasiment identiques et un proton aromatique

A l'aide de ces informations, nous pouvons proposer une structure chimique développée ainsi qu'un schéma de fragmentation en MS/MS de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (figure 57).

Le nouveau fluorophore identifié est donc une pyridine substituée en position 2 et 6 par des groupements méthyles, en position 3 par un acide carboxylique et en position 5 par un hydroxyle.

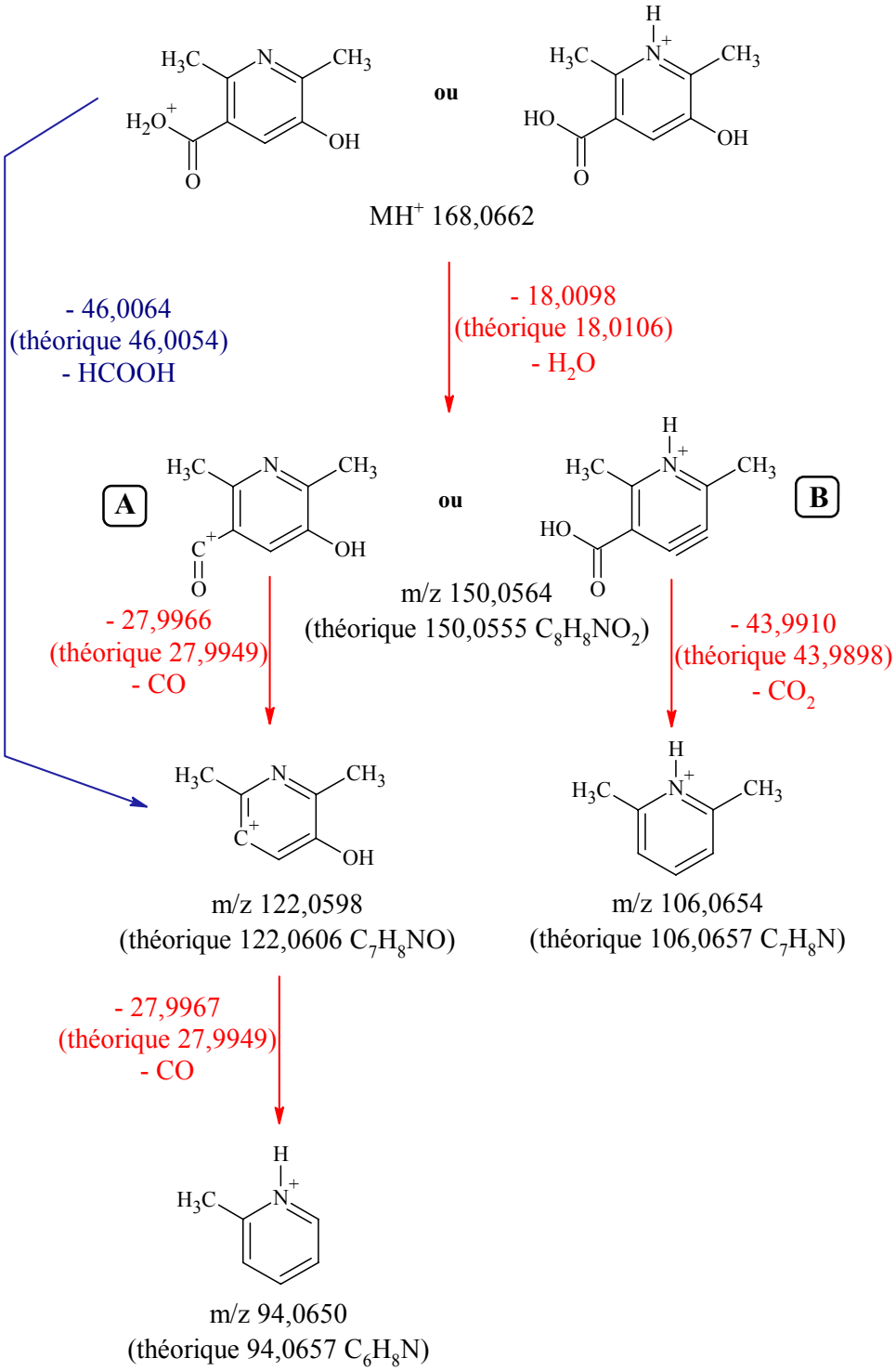


Figure 57 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique à l'aide de l'analyse en MS-Q-TOF. Pour chaque fragmentation et chaque fragment, la valeur théorique de masse provenant d'une table de spectrométrie de masse est inscrite.

Le schéma proposé ci-dessus (figure 57) permet d'expliquer la formation des quatre fragments MS/MS de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. Précisons que la protonation peut se situer soit au niveau de la fonction carboxylique, soit au niveau de l'atome d'azote du noyau pyridinique. Cependant, même si cette deuxième proposition de protonation est plus probable, elle ne permet pas d'expliquer tous les fragments.

Nous observons tout d'abord la perte d'une molécule d'eau s'effectuant au niveau de la fonction hydroxyle sur le cycle (A) ou de l'acide carboxylique (B). A partir de là, deux pertes sont possibles. L'ion fils de rapport m/z 106 provient d'une perte de CO_2 (perte de la fonction carboxylique) lorsque la protonation se trouve sur l'atome d'azote (B). Aucun autre fragment ne proviendra de cet ion. En revanche, nous observons deux pertes successives de CO à partir de l'autre ion proposé (A). Cela conduit à la formation d'ions fils de m/z 122 et 94. L'ion de m/z 122 peut être directement issu de la fragmentation de l'ion parent par perte de HCOOH, couramment observée dans le cas d'un acide carboxylique.

En collaboration avec Ina Nemet, Doctorante à l'Institut Rudjer Boskovic de Zagreb, nous proposons un schéma de synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (figure 58). Dans ce schéma, nous avons repris le mécanisme de dégradation de la glutamine qui conduit à la formation d'acide pyroglutamique et d'ammoniac. L'ammoniac ainsi formé se glyque avec une forme dimérique du méthylglyoxal issue d'une condensation aldolique entre un monohydrate de méthylglyoxal et un méthylglyoxal non hydraté, à pH basique. Ensuite, nous proposons une succession d'étapes comprenant une seconde glycation de l'ammoniac avec une molécule de méthylglyoxal monohydraté. Enfin, après perte d'une molécule d'acide formique (qui explique en partie l'acidification du milieu, et la perte d'un carbone), cyclysation de la molécule, oxydation et perte de deux molécules d'eau, nous obtenons la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique.

Le mécanisme de formation que nous proposons reste cependant à confirmer par différentes analyses chimiques.

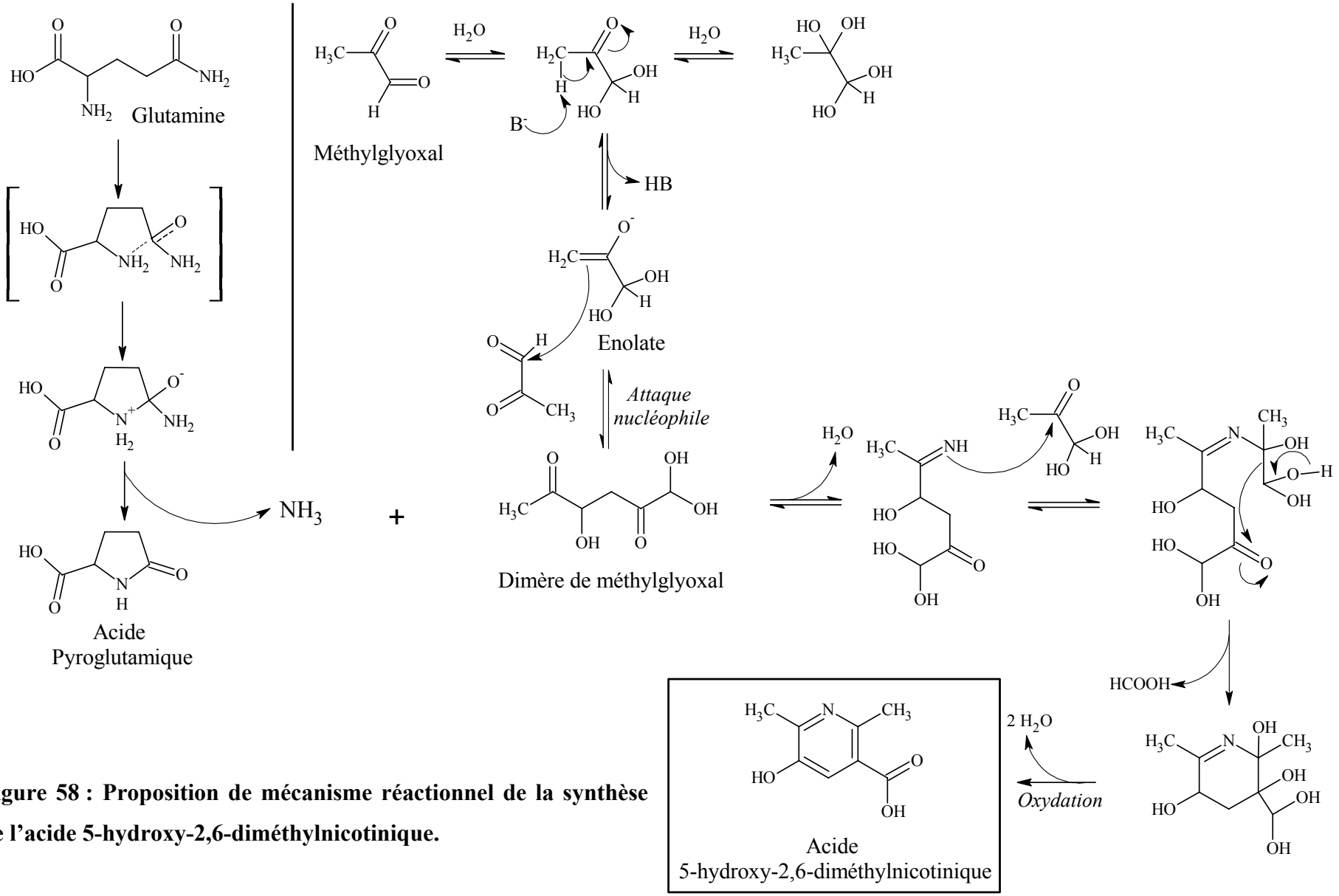


Figure 58 : Proposition de mécanisme réactionnel de la synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique.

j. Proposition de structures pour les autres fluorophores

Pour les trois autres fluorophores issus de la réaction de Maillard entre la glutamine et le méthylglyoxal, nous n'avons pas réalisé d'analyse RMN par manque de temps. Cependant, il nous est tout de même possible de proposer des structures qui mériteront, par la suite, d'être vérifiées par RMN.

Parmi ces trois composés, nous avons prouvé que l'ion de m/z égale à 154 ne possède qu'un atome d'azote au sein de sa structure. De plus, en MS/MS, nous identifions les mêmes fragments que ceux formés à partir de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, avec seulement une différence constante de 14 unités de masse. Cette différence pourrait correspondre à un groupement méthyle en moins sur l'ion 154. Il est donc fort probable que la structure de cette seconde pyridine soit semblable à celle décrite en détail pour l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. La seule différence résiderait dans le fait qu'elle ne possèderait qu'une seule fonction méthyle. Cette hypothèse est confortée par la similitude des spectres électroniques mesurés (spectres d'absorbance et de fluorescence).

Il faut admettre que, sans analyse RMN, nous ne pouvons confirmer avec certitude cette structure chimique. De plus, nous ne sommes pas en mesure de fournir la position exacte des trois substituants. En effet, le groupement méthyle peut se placer aussi bien en position 2 ou 6 de la pyridine. Connaissant les limites de notre analyse, nous proposons le nom d'acide 5-hydroxy-2(ou 6)-méthylnicotinique pour ce deuxième fluorophore identifié dans le mélange réactionnel de glutamine et de méthylglyoxal. La figure 59 présente le même type de schéma de fragmentation en MS/MS que celui présenté pour l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique.

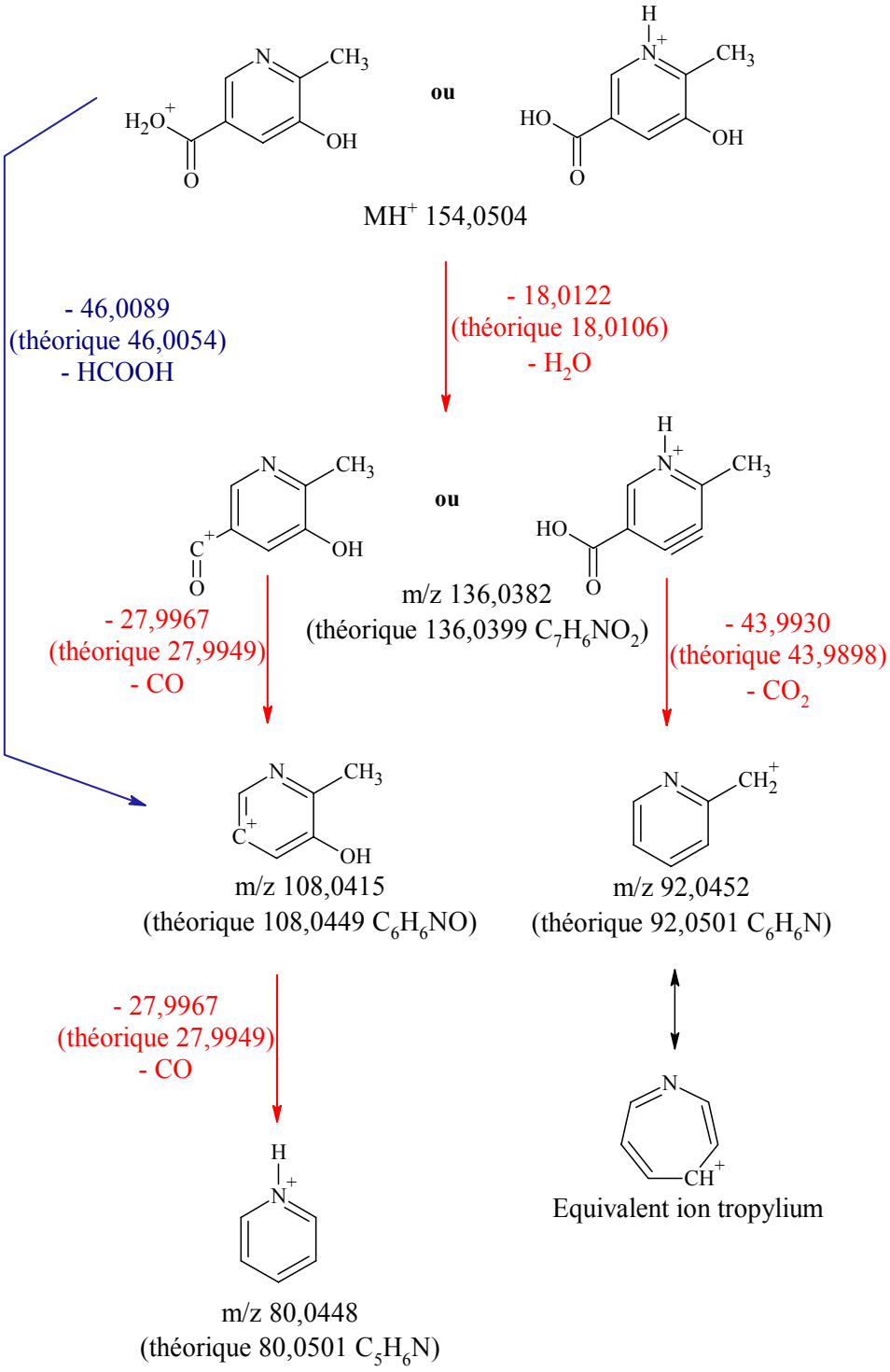


Figure 59 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique à l'aide de l'analyse en MS-Q-TOF.

Les composés hétérocycliques C et D sont de poids moléculaire plus élevé, de structure plus complexe. Nous avons identifié qu'ils possèdent chacun deux atomes d'azote.

D'après les fragments obtenus en MS/MS, le composé hétérocyclique C pourrait posséder une fonction carboxylique correspondant à une perte successive de H_2O et puis de CO ou bien une perte de HCOOH conduisant à l'ion fils m/z 205. Une perte de 42 unités de masse qui conduit à l'ion fils m/z 209 pourrait provenir d'une perte d'acétate C_2H_2O. Avec la formule brute, nous pouvons calculer le degré d'insaturation de la molécule. En effet, pour une formule brute $C_xH_yN_tO_z$, le degré d'insaturation *i* a pour formule :

$$i = \frac{2x + 2 - y + t}{2}$$

Pour notre fluorophore de formule brute $C_{12}H_{14}N_2O_4$, le degré d'insaturation *i* est égal à 7. Or, si cette molécule possède une fonction acétate (CH_3CO), une fonction acide carboxylique et un cycle aromatique comptant pour 4 insaturations (3 doubles liaisons + un cycle), il ne reste qu'une double liaison à localiser sur la structure. A partir de ces informations, nous proposons le schéma de fragmentation d'une pyrimidine appelée 2-carboxyméthyl-4-acétyl-5-[(1*E*)-but-1-èn-1-yl]-6-hydoxypyrimidine (figure 60).

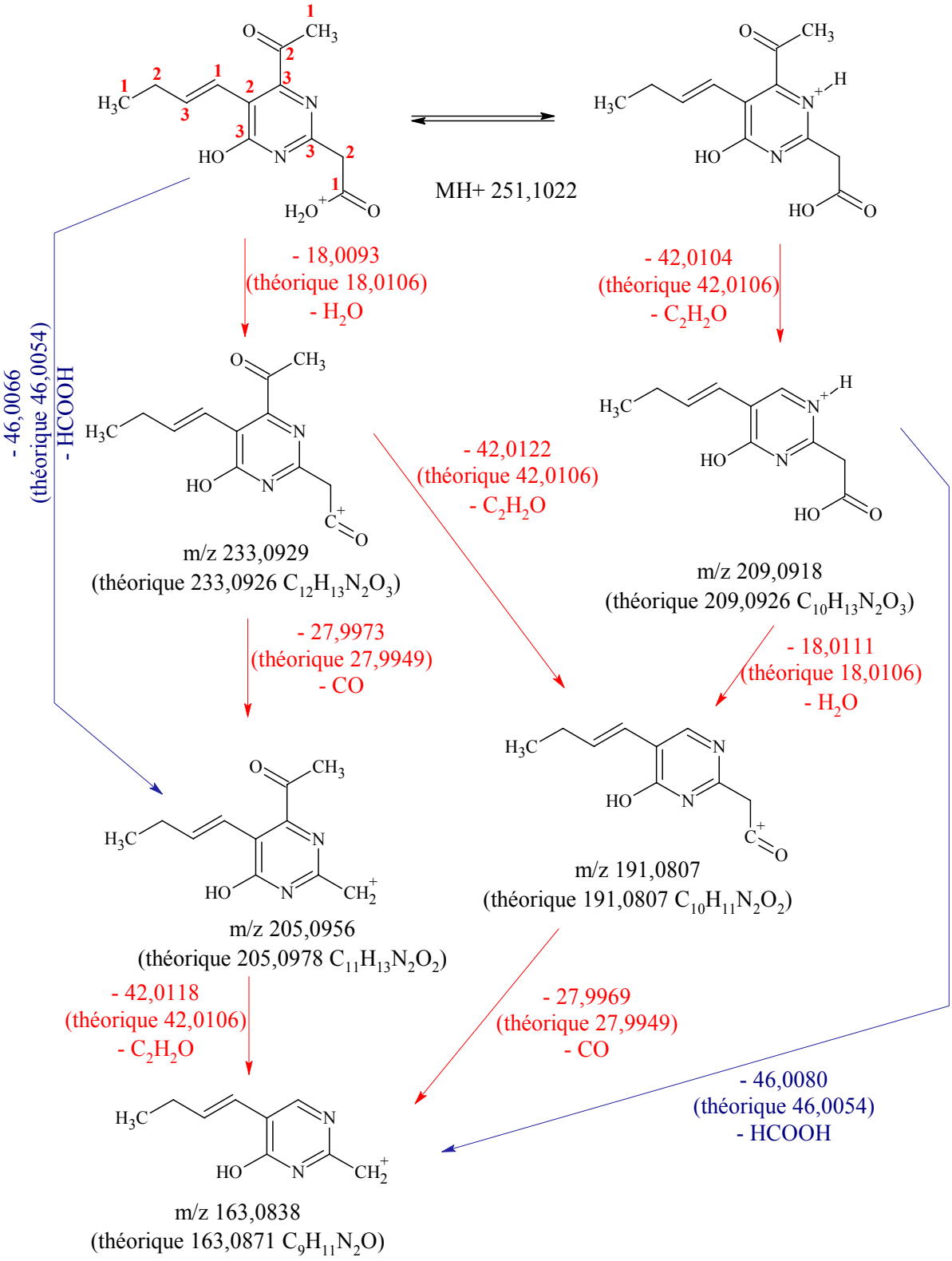


Figure 60 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS du composé hétérocyclique C à l'aide de l'analyse en MS-Q-TOF.

Le composé hétérocyclique D présente au sein de sa structure un atome d'oxygène supplémentaire par rapport au composé A qui pourrait correspondre à une fonction hydroxyle. Si cette molécule était semblable au composé A, nous pourrions suggérer l'ajout d'un groupement alcool sur la chaîne butènyl. Cependant, les fragments MS/MS obtenus pour le composé hétérocyclique D ne confortent pas cette hypothèse. En effet, nous n'observons que deux ions fils de rapport m/z 249 et 221 que l'on peut attribuer à des pertes respectives d'H_2O et d'HCOOH. Le faible niveau de fragmentation obtenu avec cet hétérocycle laisse supposer qu'il serait constitué de cycles plus stables que la pyrimidine que nous venons de décrire. Une analyse en MS^3 sur l'ion fils de m/z 221, est nécessaire pour obtenir d'autres fragments qui, hélas, sont difficilement interprétables en l'état de nos connaissances.

3. Extraction de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique au dichlorométhane

La plupart des produits de Maillard de structure aromatique identifiés à ce jour sont des composés volatils. Leur identification a été facilitée par le développement rapide des techniques de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Plusieurs techniques d'extractions ont été utilisées aux cours des dernières décennies. La plupart reposent sur les propriétés physico-chimiques de ces composés volatils.

Dans notre recherche de nouveaux composés de Maillard issus de la glutamine, nous nous sommes orientés vers la découverte de molécules plutôt hydrophiles qui sont, en raison des difficultés analytiques, moins étudiées. Pour s'assurer que la principale molécule que nous avons découverte n'est pas l'un des nombreux composés volatils déjà décrit dans la littérature, nous avons procédé à une extraction liquide-liquide. L'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, que l'on nommera HDNA dans ce paragraphe, a été purifié en milieu aqueux. Afin de mesurer son hydrophobicité, nous allons comparer sa solubilité entre un solvant aqueux (H_2O) et un solvant organique non miscible à l'eau. Lorsque l'HDNA est solubilisée dans un mélange de deux solvants, un équilibre s'établit rapidement. Il est décrit par l'équation suivante :

$$\mathrm{HDNA}_{aq} \rightleftharpoons \mathrm{HDNA}_{org}$$

où *aq* représente le soluté HDNA dans la phase aqueuse et *org* le soluté HDNA dans la phase organique.

Le rapport des concentrations de HDNA dans les deux phases est constant et indépendant de la quantité totale de HDNA. Ainsi, à une température donnée, nous pouvons écrire :

$$K_d = \frac{[HDNA]_{org}}{[HDNA]_{aq}}$$

où K_d représente la constante d'équilibre qui décrit la distribution d'un soluté HDNA entre deux solvants non miscibles, appelée coefficient de partage.

Cependant, précisons que ce rapport ainsi écrit est une forme approximative de l'expression de la constante d'équilibre qui est alors considérée comme indépendante de la force ionique. Cette forme approximative est souvent utilisée comme telle dans des modèles simples, relativement dilués où la force ionique tend alors à être nulle.

Nous pouvons ensuite interpréter les valeurs de K_d comme suit :

- Plus K_d est faible et inférieur à 1, plus le composé est hydrophile
- Plus K_d est élevé et supérieur à 1, plus le composé est hydrophobe
- Si K_d est égale à 1, le composé se partage alors de manière égale dans les deux phases.

En science environnementale, en industrie chimique (insecticides, herbicides, …) ou encore en industrie pharmaceutique (pour obtenir des informations sur l'absorption et la perméabilité des principes actifs), ce coefficient de partage est couramment utilisé. Cependant, il est utilisé sous la forme du « log P » où P représente le coefficient de partage d'un soluté entre deux solvants qui sont l'octanol et l'eau. Cela se traduit par :

$$\log P = \log \left(\frac{[Soluté]_{octanol}}{[Soluté]_{eau}} \right)$$

Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. L'utilisation systématique de l'octanol et de l'eau comme solvants de partage permet de comparer cette mesure d'hydrophobicité entre les laboratoires.

Cependant, pour l'extraction de notre molécule, nous avons préféré le dichlorométhane à l'octanol. En effet, le dichlorométhane est un solvant organique couramment utilisé pour l'extraction des composés volatils tels que les pyrazines (Spingarn & Garvie, 1979) et nous souhaitons savoir si le fluorophore majoritaire de nos modèles simples aurait pu être extrait et identifié selon cette méthode.

Après séparation d'un échantillon dilué d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique dans un mélange constitué d'un volume de dichlorométhane et d'un volume d'eau UHQ à 25°C, nous avons dosé sa concentration en phase aqueuse par HPLC couplée à une détection par fluorescence. Cette analyse nous permet d'observer que l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique reste majoritairement en phase aqueuse (99,5%). Elle possède donc un coefficient de partage faible de l'ordre de 0,0055. En conclusion, nous pouvons affirmer que l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique est une molécule hydrophile qui n'a pu être identifiée après extraction au dichlorométhane ou autre technique d'extraction des composés volatils issus de la réaction de Maillard.

4. Etude de stabilité de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique

a. Protocole expérimental

Une solution aqueuse d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique pure a été placée dans des tubes SVL (Pyrex) et incubée à 22°C (en salle climatisée), à 70°C et 120°C (en étuve) pendant 0, 3, 7, 10, 15 jours. Cette molécule était en solution dans un tampon phosphate 200 mM à pH 7,4.

Chaque échantillon est analysé en double par LC-MS-MS. L'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique est analysée par MS/MS en fragmentant l'ion parent m/z 168 puis en sélectionnant le fragment majoritaire m/z 122. Cette technique de quantification est une pseudo analyse SIM (Selected Ion Monitoring) qui permet d'obtenir une bonne sensibilité du signal de masse.

b. Résultats et discussion

Le suivi du pourcentage de dégradation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction du temps après incubation à 22°C, 70°C et 120°C est représenté sur la figure 61.

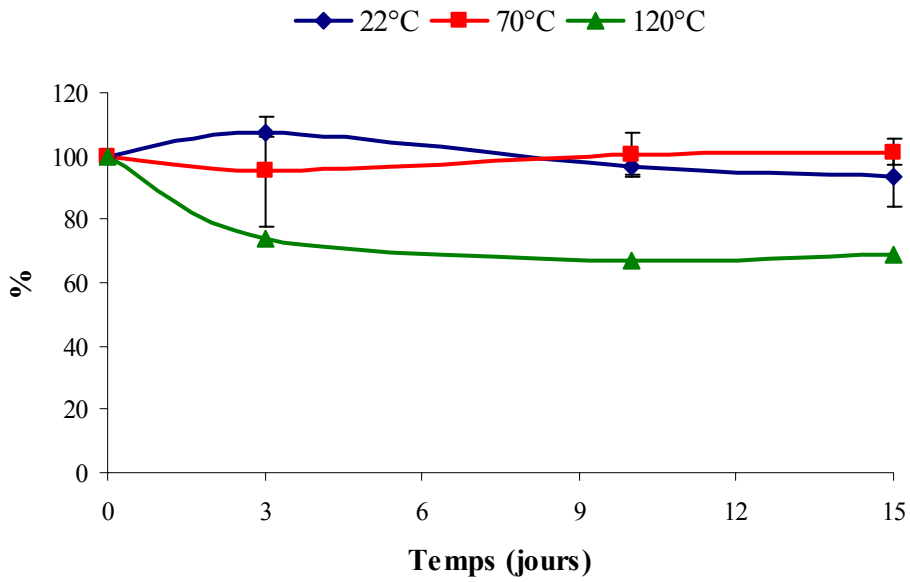


Figure 61 : Dégradation (en %) de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction du temps. Suivi de la dégradation à trois températures : 22, 70 et 120°C.

Nous observons qu'après 15 jours d'incubation à 22°C et à 70°C, la perte d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique est très faible. En revanche, à 120°C, la dégradation de cette pyridine est plus importante, nous observons jusqu'à 30% de perte après 10 jours d'incubation.

Nous pouvons conclure que cette molécule est stable à température ambiante et à 70°C sur une période de deux semaines. A une température plus forte (120°C), elle s'avère être moins stable sur cette même période. Si cette molécule est présente dans un aliment, nous pouvons estimer qu'elle ne se dégradera pas au cours d'une conservation classique. Par contre, il n'est pas garanti qu'un traitement thermique élevé (> à 120°C) ne puisse pas dégrader cette molécule dans une matrice alimentaire.

Enfin, il serait important de tester la stabilité thermique de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en présence de sucres réducteurs et de composés α-dicarbonylés. Même si la structure chimique de cette molécule laisse supposer que c'est un produit terminal de la réaction de Maillard, il reste à la démontrer.

5. Cinétiques de formation des quatre fluorophores en fonction du pH et de la température

a. Protocole expérimental

Trois mélanges composés d'ammoniac (50 mM) et de méthylglyoxal (100 mM) sont préparés dans un tampon phosphate 200 mM à trois pH différents : 5 ; 7,4 et 9. Ces trois mélanges sont incubés à 70°C de 4 h à 6 jours, à 120°C de 30 min à 24 h et à 180°C de 5 à 120 min.

Chaque échantillon est analysé en double par HPLC/MS/MS. Nos quatre fluorophores sont analysés en MS/MS après extraction de leur ion $[M+H]^+$ majoritaire et spécifique : m/z 154 pour l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique, m/z 168 pour l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, m/z 251 pour l'hétérocycle C et m/z 267 pour l'hétérocycle D. Ces ions sont ensuite fragmentés avec une énergie de collision de 70 eV.

Pour construire les cinétiques que nous présentons ci-dessous, nous avons mesuré l'aire des pics chromatographiques du fragment majoritaire pour chaque molécule : m/z 92 pour l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique, m/z 122 pour l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, m/z 191 pour l'hétérocycle C et m/z 221 pour l'hétérocycle D. Cette analyse pseudo-MS/MS-SIM était nécessaire pour obtenir une bonne spécificité (sélection d'un fragment spécifique issu d'un ion parent) et sensibilité (réduction du bruit de fond) de l'analyse MS/MS.

b. Résultats

♦ Acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique

Les cinétiques de formation de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique en fonction du pH selon les trois températures testées 70°C, 120°C et 180°C sont présentées sur la figure 62.

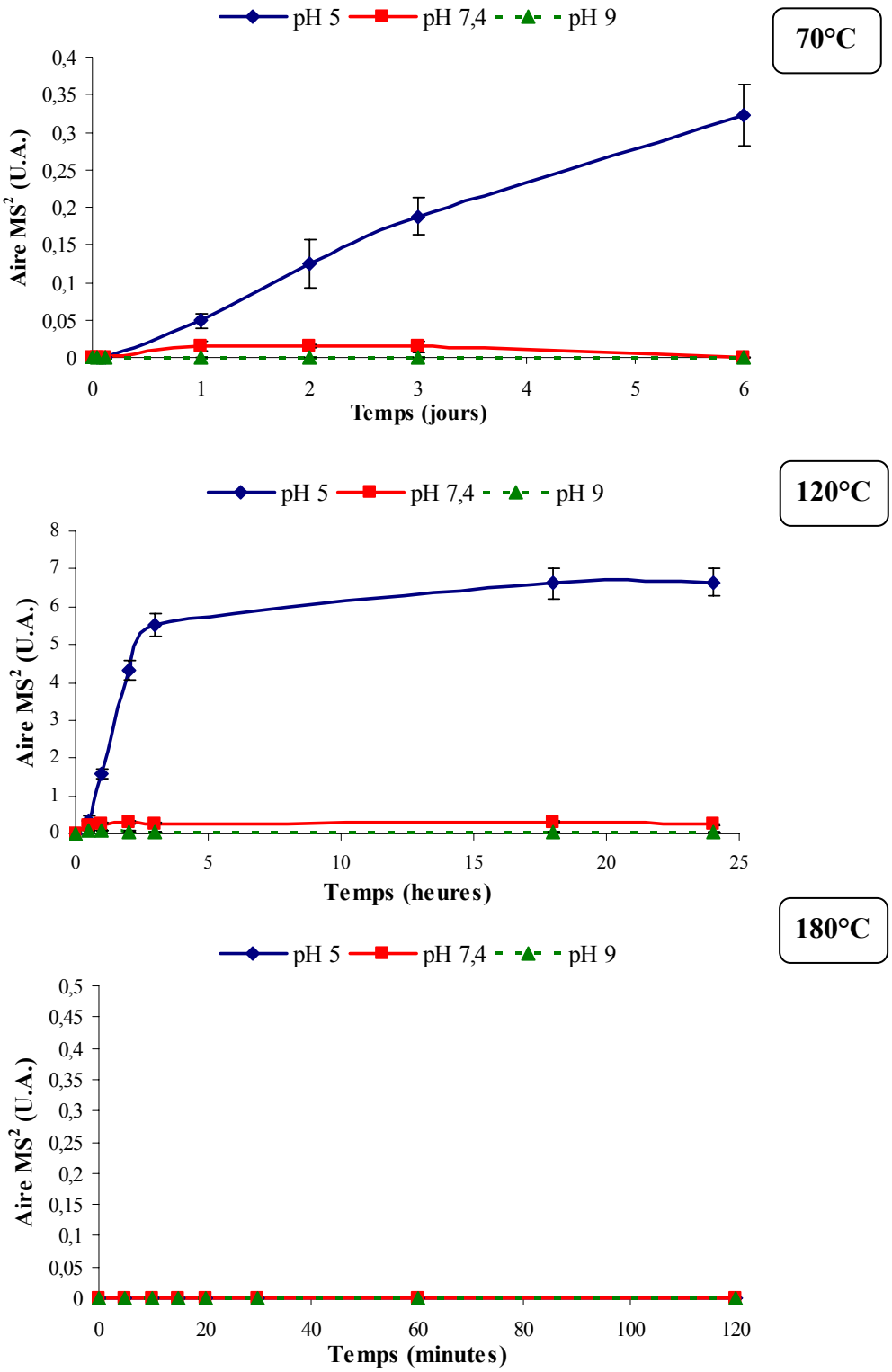


Figure 62 : Cinétiques de formation de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique en fonction du temps à partir d'un mélange ammoniac + méthylglyoxal incubé à 70°C, 120°C et 180°C (pH initial de 5, 7,4 et 9).

Les cinétiques de formation de l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique indiquent que cette molécule est synthétisée majoritairement à une température de 120°C. Dans ces conditions, la vitesse de formation qui semble constante entre 0 et 4 heures, est ensuite fortement réduite pour atteindre un plateau entre 4 et 24 h. Sur cette durée, nous n'observons aucune dégradation de la pyridine.

A plus forte température (180°C), aucune formation de l'acide 5-hydroxy-2(ou6)-méthylnicotinique n'est détectée.

Enfin, le pH optimum de synthèse de cette pyridine fluorescente est situé autour de 5. C'est en effet à ce pH que nous observons la meilleure vitesse de formation, aussi bien à 70°C qu'à 120°C.

♦ Acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique

Les cinétiques de formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique à trois températures (figure 63) montrent que quel que soit le pH employé, la synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique est favorisée à 120°C. A cette température, un pH neutre permet d'obtenir la meilleure vitesse de réaction. Cependant une incubation prolongée à pH 5 conduit à une synthèse supérieure de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique comparée l'incubation réalisée à pH 7,4. Cela s'explique par un début d'auto-dégradation ou de réactivité de cette pyridine à pH 7,4 entre 18 et 24 h. Cette observation est en accord avec l'instabilité thermique à 120°C que nous avons déjà démontrée dans un paragraphe consacré à l'étude de la stabilité de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (paragraphe 4.b ; p 165).

Après 6 jours d'incubation à 70°C, nous obtenons une production maximale de cette molécule à pH 7,4, suivi de pH 5 et pH 9. Enfin, c'est à 180°C que nous observons la plus faible synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique.

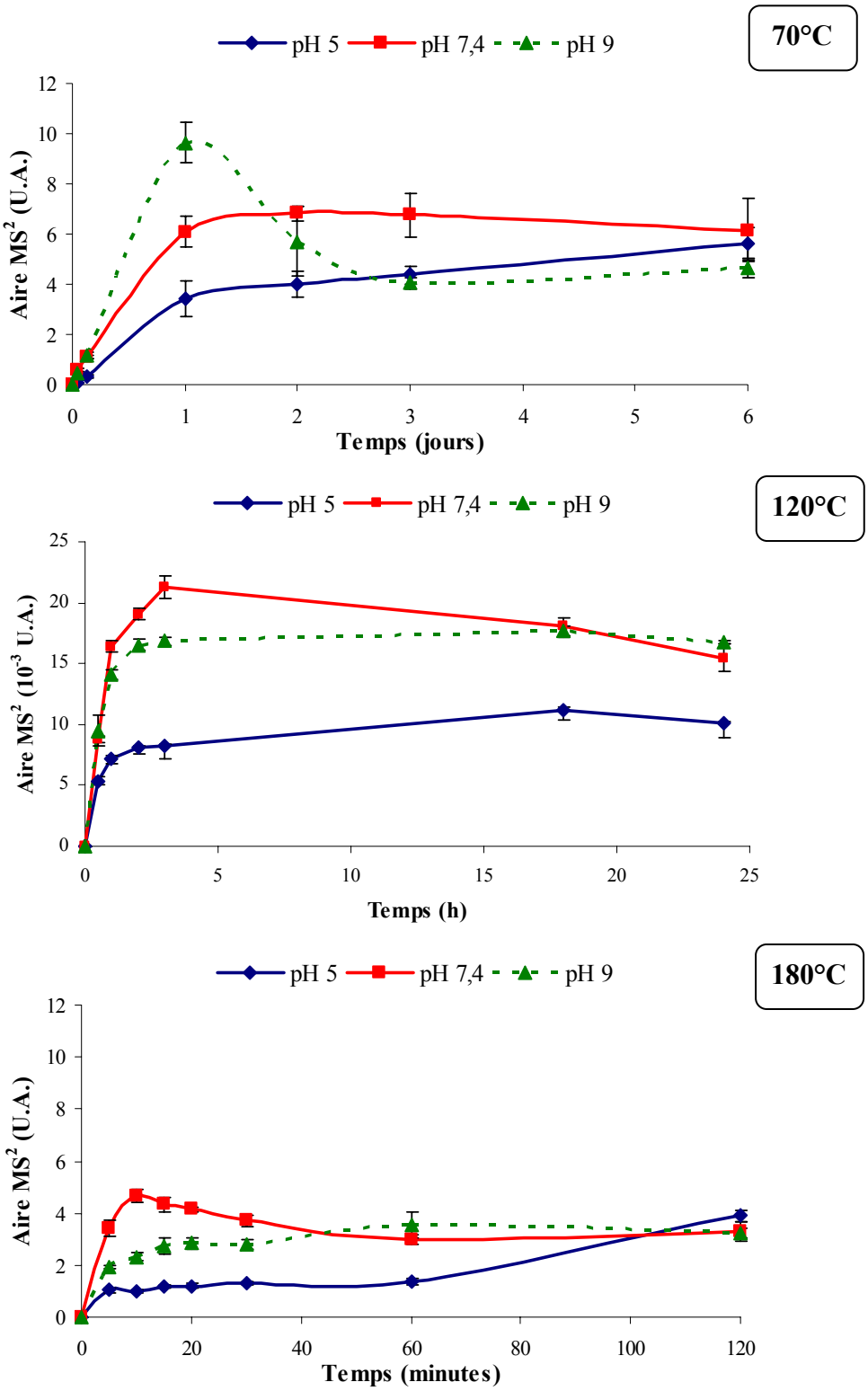


Figure 63 : Cinétiques de formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction du temps à partir d'un mélange ammoniac + méthylglyoxal incubé à 70°C, 120°C et 180°C (pH initial de 5, 7,4 et 9).

C’est aussi grâce à cette étude que nous avons pu optimiser les conditions de synthèse de l’acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique qui étaient importantes à maîtriser pour produire une quantité suffisante de pyridine pure pour l’analyse RMN.

♦Composé hétérocyclique C

Les cinétiques de formation du composé hétérocyclique C en fonction du pH selon les trois températures testées 70°C, 120°C et 180°C sont présentées sur la figure 64.

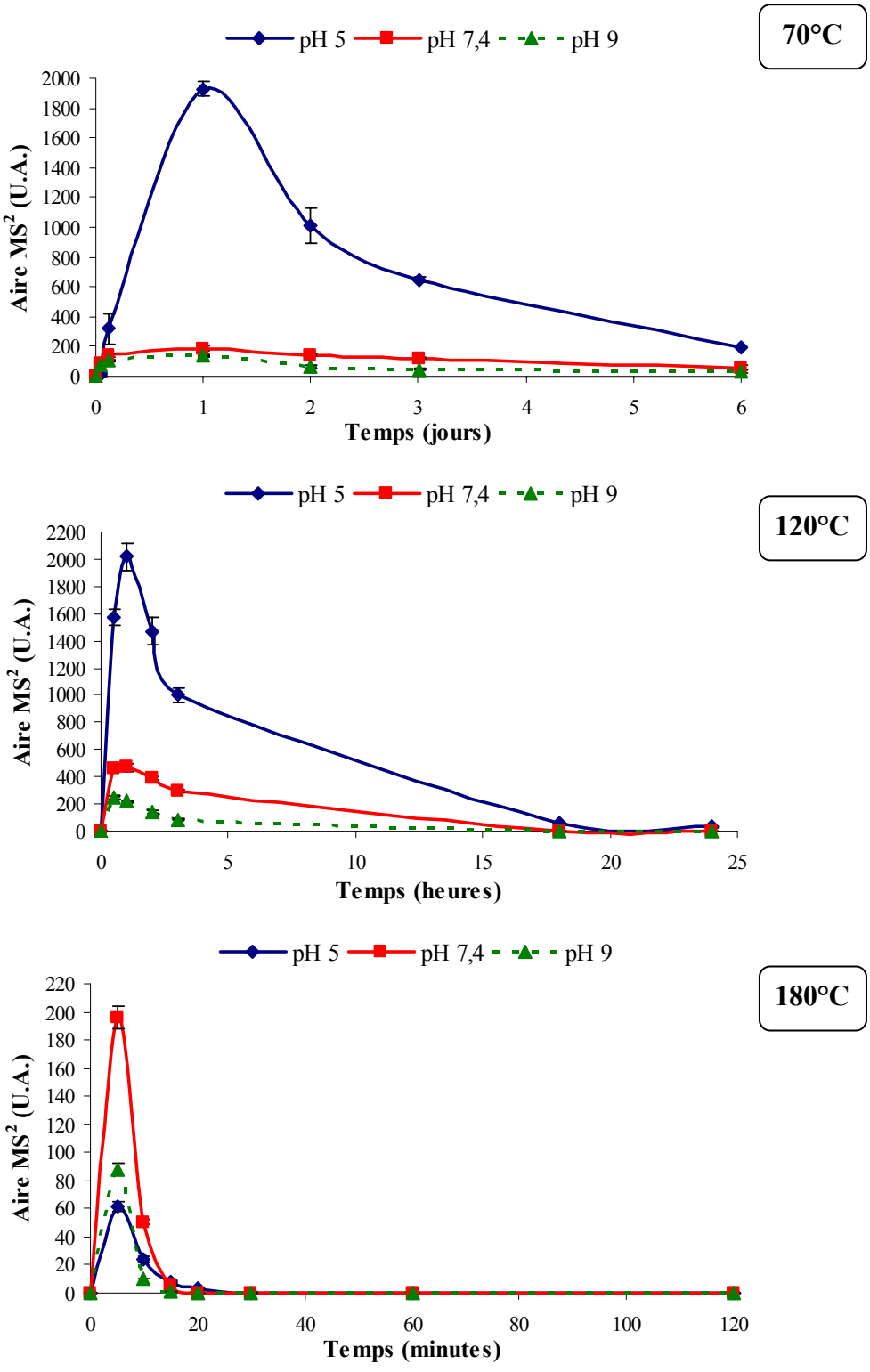


Figure 64 : Cinétiques de formation du composé hétérocyclique C en fonction du temps à partir d'un mélange ammoniac + méthylglyoxal incubé à 70°C, 120°C et 180°C (pH initial de 5, 7,4 et 9).

A 70°C et à 120°C, le composé hétérocyclique C est majoritairement formé à pH acide mais se dégrade assez rapidement au delà d'une journée d'incubation à 70°C et au delà d'une heure d'incubation à 120°C. A 180°C, un pH initial d'incubation plus neutre s'avère être une condition plus favorable à sa formation. Cependant, comme pour les deux autres pH de cette température, le composé hétérocyclique C se dégrade dès 5 min d'incubation.

Le profil de courbe en cloche observé pour chaque cinétique quelles que soient les conditions d'incubation indique que le composé hétérocyclique C est vraisemblablement un intermédiaire réactionnel de la réaction de Maillard entre l'ammoniac et le méthylglyoxal.

♦Composé hétérocyclique D

Les cinétiques de formation du composé hétérocyclique D montrent encore que cette molécule ne semble pas être un produit terminal de la réaction de Maillard (figure 65). En effet nous observons, qu'après une synthèse relativement rapide aux deux températures les plus élevées, ce fluorophore se dégrade rapidement. Cette dégradation est totale après seulement 30 min à 180°C.

A l'inverse, une température modérée de 70°C permet d'observer une synthèse importante de l'hétérocycle D, sans dégradation significative sur la durée de notre cinétique.

Enfin, il faut souligner que tout comme l'acide 5-hydroxy-2 (ou 6)-méthylnicotinique et le composé hétérocyclique C, le composé hétérocyclique D est synthétisé majoritairement à pH acide.

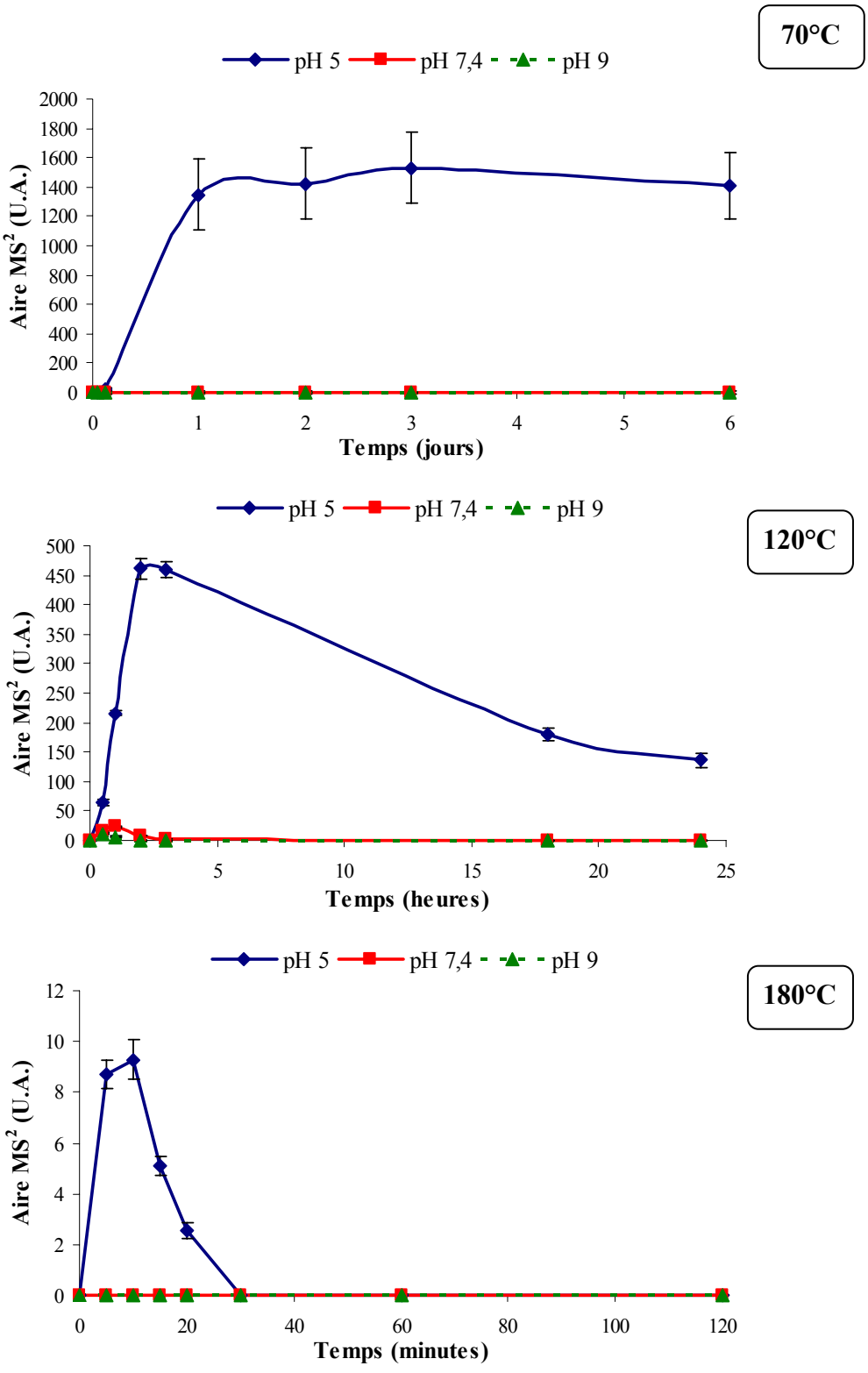


Figure 65 : Cinétiques de formation du composé hétérocyclique D en fonction du temps à partir d'un mélange ammoniac + méthylglyoxal incubé à 70°C, 120°C et 180°C (pH initial de 5, 7,4 et 9).

6. Influence de différents précurseurs d'ammoniac sur la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique

Nous avons montré précédemment que la glutamine est le principal précurseur des fluorophores formés par réaction de Maillard en présence de méthylglyoxal à 120°C (paragraphe I.2.b p 122). Nous avons également prouvé par une analyse comparative de chromatogrammes (paragraphe I.3.b ; p 126) que l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique est le fluorophore majoritaire (en intensité de fluorescence) de notre modèle simple. Il est donc important de rechercher plus en détail quels peuvent être les précurseurs de cette pyridine fluorescente.

a. Protocole expérimental

Différentes solutions à 100 mM de glutamine, d'ammoniac, d'urée, d'hydrogénocarbonate d'ammonium, d'asparagine et d'acide glutamique sont préparées à pH 7,4 puis mélangées à volume égal à une solution de méthylglyoxal (200 mM) au même pH. Les mélanges ainsi préparés sont immédiatement incubés à 120°C pendant 2 h.

Chaque échantillon est analysé en double par LC-MS-MS avec une fragmentation programmée sur l'ion de m/z égale à 168 correspondant à l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique.

Puisqu'il ne fait aucun doute que l'ammoniac est impliqué dans la formation de la pyridine fluorescente, nous avons décidé d'ajouter l'hydrogénocarbonate d'ammonium (agent levant utilisé dans la fabrication des biscuits par exemple) à la liste des molécules susceptibles de former les fluorophores que nous venons de découvrir. Précisons que les biscuits feront l'objet d'une étude approfondie dans le chapitre IV : II (p 247).

b. Résultats et discussion

Comme le montre la figure 66, le rendement de synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique est dépendant du précurseur d'ammoniac incubé en présence de méthylglyoxal. Parmi les molécules testées, seul l'acide glutamique ne produit pas d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en concentration significative. Cette pyridine fluorescente est par contre formée par les cinq autres molécules avec une synthèse dominante pour la glutamine. En effet, cet acide aminé conduit à une formation deux fois plus importante d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique que l'ammoniac ou l'hydrogénocarbonate d'ammonium. L'urée en produit une quantité intermédiaire suivie de l'asparagine.

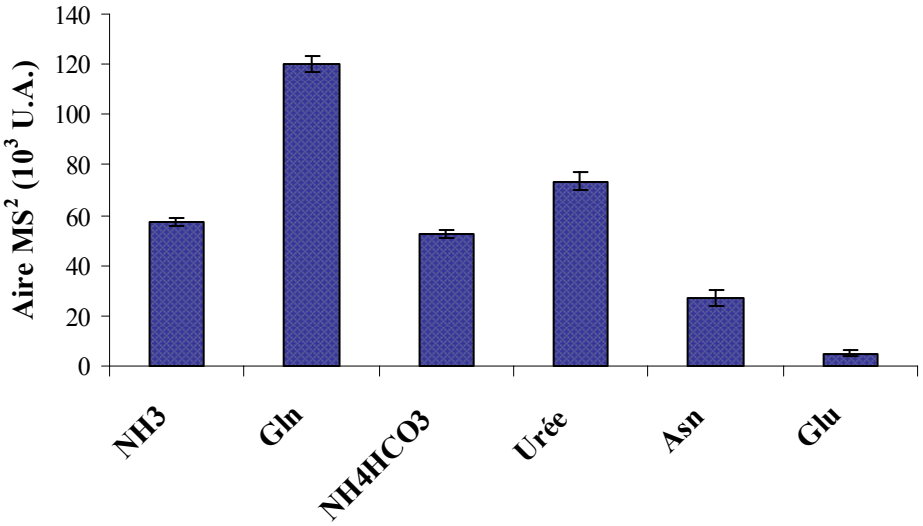


Figure 66 : Formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en fonction de la nature de l'amine (ammoniac, glutamine, hydrogénocarbonate d'ammonium, urée, asparagine et acide glutamique) incubée à pH 7,4 avec du méthylglyoxal 2 h à 120°C (analyse LC-MS-MS).

Cette étude fait ressortir les mêmes conclusions que celles que nous avons obtenues en analysant l'étude comparative des amines impliquées dans la formation de fluorescence. Nous retrouvons, dans cette étude, une formation accrue de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique à partir de la glutamine incubée en présence de méthylglyoxal. Nous confirmons que cet acide aminé produit environ deux fois plus de pyridine fluorescente que l'ammoniac incubé pourtant dans les mêmes conditions.

Avec ces derniers résultats, notre hypothèse d'une synthèse probable de fluorophores à partir de la fonction α-NH_2 de la glutamine semble toujours valide. L'expérience présentée dans le paragraphe suivant vise à vérifier cette hypothèse.

7. Mesure de la contribution de l'α-amine de la glutamine dans la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique

Afin de déterminer la contribution respective du groupement α-NH_2 et de l'ammoniac dérivé du groupement amine de la glutamine à la synthèse des fluorophores en présence de méthylglyoxal, une méthode comparative utilisant un isotope stable de la glutamine est mise en place.

a. Protocole expérimental

Pour cette détermination, nous avons préparé deux mélanges à base de glutamine et de méthylglyoxal. Dans le premier mélange, la glutamine ^{14}N classique est employée alors que dans le second mélange, nous utilisons de la glutamine marquée à l'azote ^{15}N sur l'α-amine (glutamine-*amine*-^{15}N). Ces deux mélanges, réalisés en triple exemplaire, sont incubés à 120°C pendant 2 h à pH 7,4. Après refroidissement dans la glace et filtration sur une membrane en nylon de porosité de 0,45 µm, les échantillons sont analysés par LC-MS.

b. Résultats et discussion

La figure 67 montre les analyses chromatographiques des mélanges glutamine/méthylglyoxal (A) et glutamine-*amine*-^{15}N/méthylglyoxal (B) avec l'extraction des ions de m/z égales à 168 et 169.

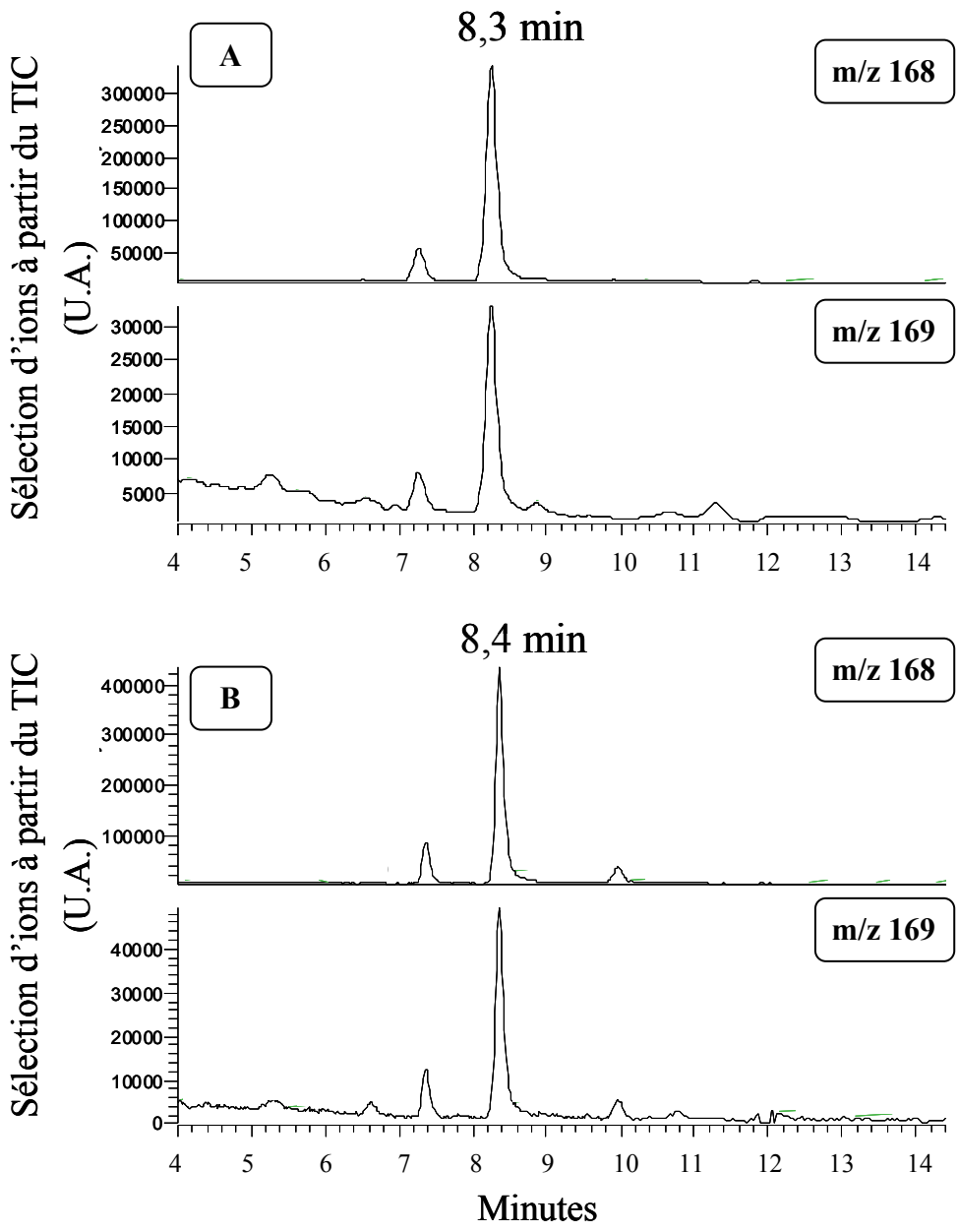


Figure 67 : Analyse LC-MS d'un mélange composé de glutamine et de méthylglyoxal (A) et d'un mélange composé de glutamine-*amine*-^{15}N et de méthylglyoxal (B). Pour chaque analyse, les chromatogrammes correspondant aux ions de rapports m/z 168 et 169 sont présentés.

En présence de glutamine ^{14}N, nous observons un faible pourcentage d'ions de m/z égale à 169. Comme nous l'avons décrit précédemment, ce pourcentage d'ion de masse $[M+1+H]^+$ correspond à l'abondance naturelle en ^{13}C de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. En présence de glutamine-*amine*-^{15}N, une augmentation de l'ion de m/z 169 serait la preuve d'une implication de l'α-amine dans la synthèse du fluorophore étudié. Rappelons que l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique ne possède qu'un atome d'azote dans sa structure et que, par conséquent, l'incorporation d'un isotope ^{15}N, entraînerait l'augmentation d'une seule unité de masse à la pyridine.

Après calcul des aires des pics obtenus en LC-MS, nous obtenons le graphe présenté sur la figure 68.

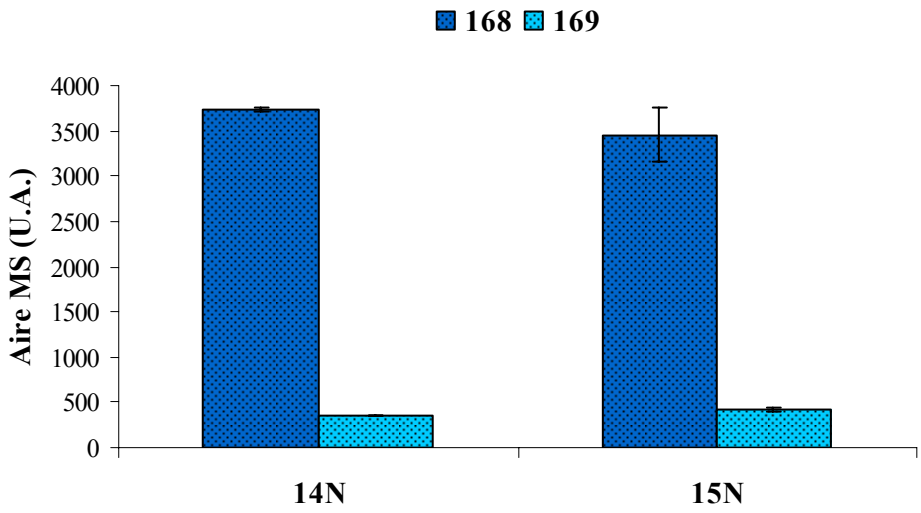


Figure 68 : Formation des ions m/z 168 et m/z 169 dans les mélanges glutamine/méthylglyoxal (14N) et glutamine-*amine*-^{15}N/méthylglyoxal (15N).

Pour calculer la contribution de l'α-amine de la glutamine dans la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, nous avons comparé le pourcentage d'ions de m/z 169 formés entre les deux mélanges testés. Nous avons utilisé la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'ions de m/z égale à 169 } [M+1+H]^{+} = \frac{\text{Aire du pic de m/z égale à 169}}{\text{Aire du pic de m/z égale à 168}} \times 100$$

Comme attendu, le pourcentage d'ions 169 dans le mélange glutamine ^{14}N et méthylglyoxal est de 9,4%. En présence de glutamine-amine-^{15}N, ce pourcentage augmente légèrement pour atteindre 11,4%. Cette différence de pourcentage montre une faible voire négligeable contribution de l'α-amine de la glutamine dans la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. En effet, cette contribution n'est estimée qu'à 2% de l'azote total.

Cette contribution négligeable de la fonction α-amine à la formation du principal fluorophore issu de la glutamine remet en cause notre hypothèse d'une participation possible de cette amine à la réaction de Maillard dans nos modèles. L'ensemble des études que nous avons réalisées à ce jour ne permet toujours pas d'expliquer pourquoi la glutamine produit plus de fluorescence que l'ammoniac en solution aqueuse. Une réaction sur la fonction amide étant impossible, nous ne savons pas comment l'ammoniac libéré par lactamisation serait plus réactif qu'une solution d'ammoniac préparée au même pH et incubée dans les mêmes conditions. La seule différence entre les milieux réactionnels est la présence de pyroglutamate formé au cours de la lactamisation de la glutamine. Par conséquent, nous avons testé l'effet de cette oxoproline sur la formation de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique.

8. Etude de l'influence du pyroglutamate sur la formation de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique

Le seul élément différent entre les incubations des mélanges ammoniac/méthylglyoxal et glutamine/méthylglyoxal est la présence d'acide pyroglutamique dans ce dernier mélange. Nous allons, dans ce paragraphe, étudier son effet sur la formation d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique dans différents mélanges.

a. Protocole expérimental

Pour évaluer cet effet, nous avons préparé, à pH 7,4, deux mélanges composés de glutamine ou d'ammoniac (50 mM) et de méthylglyoxal (100 mM) auxquels nous ajoutons ou non de l'acide pyroglutamique (50 mM). Un autre mélange réunissant de l'ammoniac (50 mM), de la glutamine (50 mM) et du méthylglyoxal (100 mM) est aussi préparé à pH 7,4. Ces différents mélanges, préparés en triple exemplaire, sont incubés 2 h à 120°C. Après refroidissement et filtration sur une membrane en nylon de porosité de 0,45 µm, chaque échantillon est analysé en double par LC-MS-MS avec une fragmentation de l'ion parent m/z 168 puis en sélectionnant le fragment majoritaire m/z 122.

b. Résultats et discussion

Les analyses des échantillons incubés d'ammoniac/méthylglyoxal et de glutamine/méthylglyoxal nous fournissent les mêmes résultats déjà obtenus auparavant à savoir une production d'acide hydroxy-diméthylnicotinique 2 fois plus importante en présence de glutamine comparée à l'ammoniac (figure 69). De plus, un ajout de PGA dans les mélanges à base d'ammoniac ou de glutamine, ne favorise pas la formation d'acide hydroxy-diméthylnicotinique. Enfin, l'ajout de glutamine au mélange composé d'ammoniac et de méthylglyoxal n'a pas non plus augmenté significativement la quantité d'acide hydroxy-diméthylnicotinique formé. Nous expliquons cette dernière observation par un épuisement rapide de la concentration en méthylglyoxal et une compétition entre la glutamine et l'ammoniac.

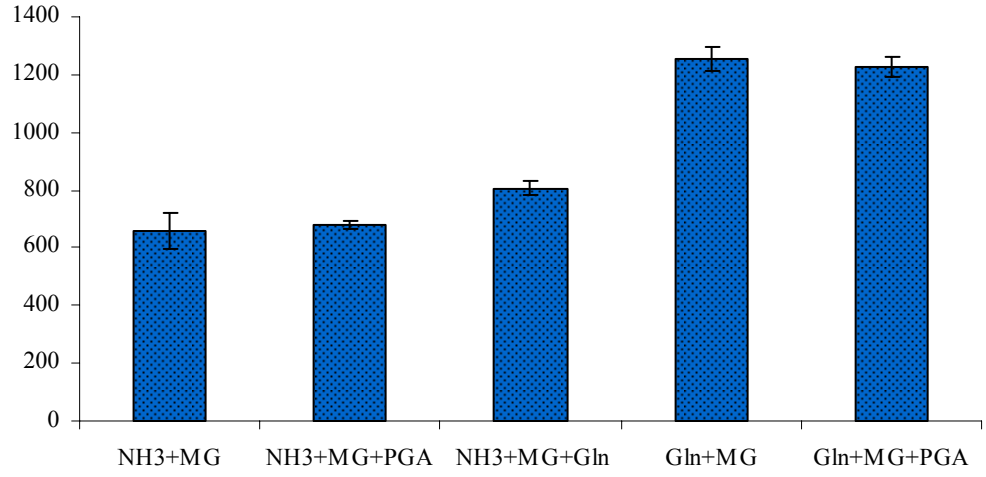


Figure 69 : Formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique dans des mélanges composés d'ammoniac ou de glutamine et de méthylglyoxal en présence ou non d'acide pyroglutamique et un mélange constitué d'ammoniac, de glutamine et de méthylglyoxal.

En conclusion, l'acide pyroglutamique, issu de la décomposition de la glutamine, n'a pas d'effet catalytique sur la formation de ce fluorophore. Nous ne sommes toujours pas en mesure d'expliquer la raison pour laquelle, en présence de méthylglyoxal, la glutamine conduit à une formation accrue de fluorophores par rapport à l'ammoniac incubé dans les mêmes conditions.

9. Etude de la réaction entre l'ammoniac et le méthylglyoxal en compétition avec le glucose

L'étude consiste à mettre en compétition le méthylglyoxal et le glucose dans la réaction de Maillard impliquant l'ammoniac. L'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique que nous venons de découvrir sera, dans cette expérience, le marqueur représentatif de l'ensemble des fluorophores formés à partir de l'ammoniac et du méthylglyoxal. Nous allons donc suivre sa cinétique de formation en fonction du temps d'incubation.

a. Protocole expérimental

L'ammoniac est mélangé soit au glucose (rapport molaire NH_3/Glucose : 50/100 mM), soit au méthylglyoxal préparé à deux concentrations (rapports molaires NH_3/MG : 50/50 mM et 50/100 mM), soit à un mélange de glucose et de méthylglyoxal (rapports molaires NH_3/Glucose/MG : 50/100/50 mM et 50/100/100 mM). Les échantillons ainsi préparés en triple exemplaire à pH 7,4 sont chauffés en bain d'huile à 120°C de 30 à 180 min. Chaque échantillon est analysé par LC-MS-MS avec une fragmentation de l'ion parent de m/z 168.

b. Résultats et discussion

En présence de glucose, nous n'observons aucune formation d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (figure 70). Par contre, comme nous l'avions déjà montré dans le paragraphe I.1.b (p 116), la formation du fluorophore augmente avec la concentration en méthylglyoxal.

L'ajout de glucose dans un mélange ammoniac+méthylglyoxal entraîne une baisse de la synthèse de la pyridine fluorescente, et ce, quelle que soit la concentration de méthylglyoxal. Nous mettons ainsi en évidence une réaction de compétition entre la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique issu de la réaction entre le méthylglyoxal et l'ammoniac et la formation d'autres produits de Maillard qui se formeraient entre le glucose et l'ammoniac.

Ces derniers produits de Maillard feront l'objet d'une recherche détaillée dans le chapitre III (p 187).

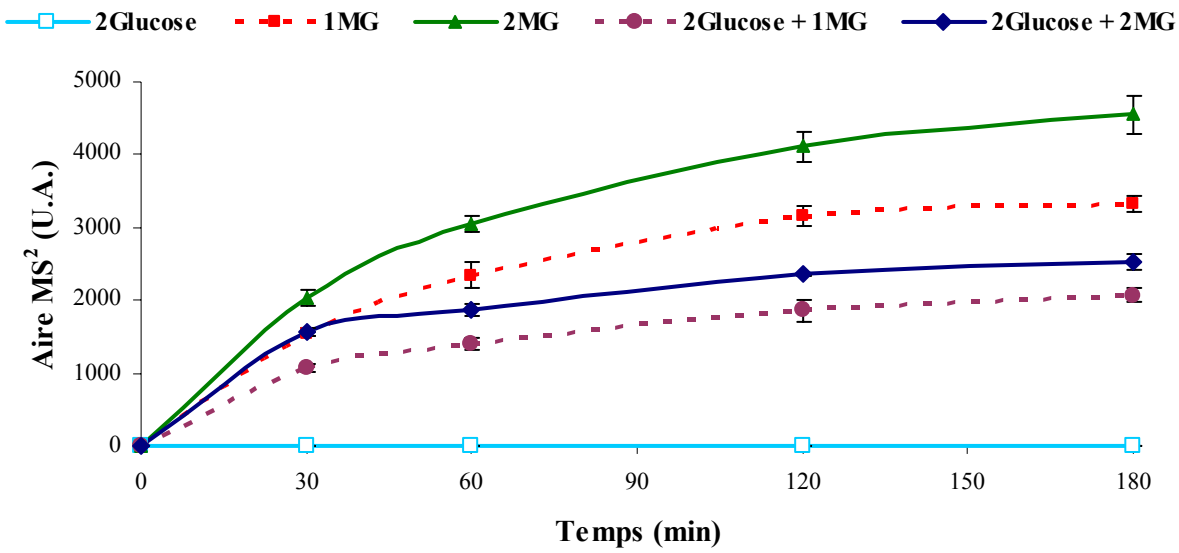


Figure 70 : Formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique à partir de mélanges d'ammoniac et de glucose, d'ammoniac + méthylglyoxal (1MG et 2MG) et d'ammoniac + glucose + méthylglyoxal (2Glucose + 1MG et 2Glucose + 2MG) (LC-MS-MS).

III. CONCLUSION

L'étude de la glutamine en milieu aqueux a montré que cet acide aminé était une source importante d'ammoniac comparé à d'autres molécules elles-mêmes reconnues comme potentiellement génératrices d'ammoniac. Parmi les amines ou amides que nous avons testés, la glutamine est aussi le principal précurseur de produits bruns et de fluorophores formés par réaction de Maillard en présence de méthylglyoxal. Nous attribuons cette forte réactivité à l'extrême instabilité de la glutamine en milieu aqueux, et nous pouvons conclure que, parmi d'autres donneurs potentiels d'ammoniac et d'autres porteurs d'azote, la glutamine participe vraisemblablement à la formation de pigments bruns et autres produits de Maillard dans des matrices alimentaires relativement riches en cet acide aminé.

La différence d'intensité de fluorescence et d'absorbance observée entre la glutamine et l'ammoniac aurait pu laisser supposer que des fluorophores propres à la glutamine sont

formés en présence de méthylglyoxal. Cependant une étude comparative plus détaillée a prouvé qu'il n'existait qu'une différence quantitative de fluorophores entre la glutamine et l'ammoniac. En effet, les mêmes molécules ont été identifiées avec ces deux sources d'azote. En d'autres termes, la forte intensité de fluorescence observée dans les modèles simples de glutamine n'est pas due à la formation de fluorophores qui lui sont spécifiques, mais plus probablement à la réaction entre l'ammoniac libéré et le méthylglyoxal.

Pour tenter d'expliquer cet excès de fluorescence globale en présence de glutamine, nous avions émis l'hypothèse selon laquelle l'azote nécessaire à la formation des fluorophores pouvait être issu non seulement de la fonction amide de la glutamine (par désamidation), mais aussi de la fonction α-amine (par désamination directe ou formation de produit d'Amadori puis désamination). Dans ce cas, la fonction α-amine de la glutamine ne serait pas engagée dans la formation de l'acide pyroglutamique. Un dosage du PGA confirme qu'une fraction non négligeable de glutamine incubée en présence de méthylglyoxal (17%) échappe à sa voie classique de dégradation alors que, dans les mêmes conditions sans méthylglyoxal, 100% de glutamine est désamidée. L'α-amine pourrait ainsi contribuer à la formation de fluorophores. Cependant ce résultat n'explique que partiellement la différence d'intensité de fluorescence observée entre la glutamine et l'ammoniac.

L'utilisation de glutamine marquée à l'azote ^{15}N sur son α-amine permet de rejeter définitivement l'hypothèse d'une participation de la fonction α-amine dans la formation des fluorophores issus de la glutamine. Cette observation n'est cependant valable que dans les conditions de pH, de température et d'activité d'eau testées dans notre étude. En effet, à plus forte température (180°C) et à plus faible niveau d'humidité (12 à 14%), les résultats de Hwang*, et coll.* (1995b) indiquent que la glutamine ne produit pas plus d'hétérocycles azotés que l'acide glutamique, révélant indirectement l'implication de la fonction α-amine.

Enfin, l'acide pyroglutamique, seul élément différent entre les milieux réactionnels glutamine/méthylglyoxal et ammoniac/méthylglyoxal, n'a aucune influence sur la formation des fluorophores. A ce jour, nous ne sommes donc pas en mesure d'expliquer pourquoi l'intensité de fluorescence est si importante lorsque la glutamine est incubée en présence de méthylglyoxal.

Dans cette étude nous avons également identifié quatre fluorophores issus de la réaction de Maillard entre la glutamine (ou ammoniac) et le méthylglyoxal. Cette étude s'est particulièrement orientée vers l'identification du principal fluorophore qui induit environ 75% de la fluorescence totale. Après différentes mesures de chimie analytique (LC-MS-MS ; MS-Q-TOF ; RMN ; …), ce composé est identifié comme étant l'acide 5-hydroxy-2,6-

diméthylnicotinique. Une recherche sur la base de données « SciFinder » n'a révélé qu'une seule référence bibliographique correspondant à cette molécule (Rimek, 1963). Cet article scientifique datant de 1963 ne porte que sur l'étude du réarrangement des N-oxides des pyridines alkylées. Par conséquent, c'est la première fois, à notre connaissance, que cette pyridine est identifiée comme étant un produit de Maillard issu de la réaction entre l'ammoniac et le méthylglyoxal, et dont la synthèse est favorisée en présence de glutamine. Quelques pyridines substituées ont déjà été identifiées dans des modèles de la réaction de Maillard, cependant les fonctions de substitution sont pour la plupart des chaînes alkyles linéaires de 1 à 4 carbones (Hwang*, et coll.*, 1995b). Ces composés sont des composés volatils qui ont été généralement isolés et identifiés par GC-MS.

L'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, dont le mécanisme de formation reste à confirmer, fera l'objet dans le chapitre IV d'une recherche dans une matrice alimentaire particulièrement riche en glutamine, la tomate, et aussi dans des biscuits contenant de l'hydrogénocarbonate d'ammonium.

Par ailleurs, les trois autres fluorophores détectés dans nos modèles simples n'ont pas été complètement identifiés. Cependant, nous pouvons proposer des structures à l'aide des analyses réalisées en MS-Q-TOF. C'est ainsi que nous avons identifié un composé qui serait l'acide 5-hydroxy-2(ou 6)-méthylnicotinique et une pyrimidine qui serait la 2-carboxyméthyl-4-acétyl-5-[(1*E*)-but-1-èn-1-yl]-6-hydoxypyrimidine. Le dernier composé fluorescent, de formule brute $C_{12}H_{14}N_2O_5$ reste non identifié.

Enfin, nous avons prouvé qu'il existait une compétition entre la formation des composés issus du méthylglyoxal et la formation de ceux issus du glucose. Il nous paraît donc important de rechercher à présent des produits de Maillard engendrés par la réaction entre la glutamine et les sucres réducteurs.

CHAPITRE III : ETUDE DE LA REACTION ENTRE LA GLUTAMINE ET LES SUCRES REDUCTEURS

Les glucides représentent une part importante des ingrédients des matrices alimentaires. Ils sont soit présents dans les produits bruts, soit ajoutés aux aliments au cours de leur procédé de fabrication. De structure plus ou moins complexe et de réactivité variable, ils sont impliqués dans de nombreuses réactions de Maillard au cours du traitement thermique des aliments.

Dans le chapitre précédent nous venons de décrire la formation de quelques produits de Maillard qui se forment entre le méthylglyoxal et la glutamine. Cependant, nous avons aussi montré qu'il existait une compétition entre les produits formés en présence de composés dicarbonylés et ceux formés avec du glucose. Il nous apparaît donc important d'étudier les produits de Maillard générés par la réaction entre la glutamine et les sucres réducteurs.

Nous étudierons plus particulièrement le glucose qui est un monosaccharide très répandu dans les matrices alimentaires. La fonction aldéhyde portée par le carbone 1 de cet ose lui confère un pouvoir réducteur élevé, impliqué dans la réaction de Maillard.

Nous chercherons à identifier la structure chimique des produits de Maillard formés entre la glutamine et le glucose, nous étudierons leur cinétique de formation et tenterons de comprendre leur mécanisme de formation. Enfin, nous comparerons la réactivité de plusieurs générateurs d'azote et observerons l'action d'autres mono- et disaccharides sur la formation de PRM.

I. ANALYSE LC-UV-MS D'UN MELANGE GLUTAMINE/GLUCOSE

Tout comme pour l'étude de la réaction entre le méthylglyoxal et la glutamine, nous avons utilisé un modèle simple en milieu aqueux pour générer des PRM entre la glutamine et le glucose. Une analyse chromatographique avec détection en fluorescence du mélange glutamine/glucose incubé à 120°C ne révèle aucun fluorophore. En l'absence de PRM fluorescents, nous avons recherché des chromophores issus du même mélange glutamine/glucose. L'analyse chromatographique, avec une détection UV à 270 nm, d'un

mélange composé de glutamine et de glucose aux concentrations respectives de 50 et 100 mM, et incubé à 120°C pendant 2 h conduit au résultat présenté dans la figure 71.

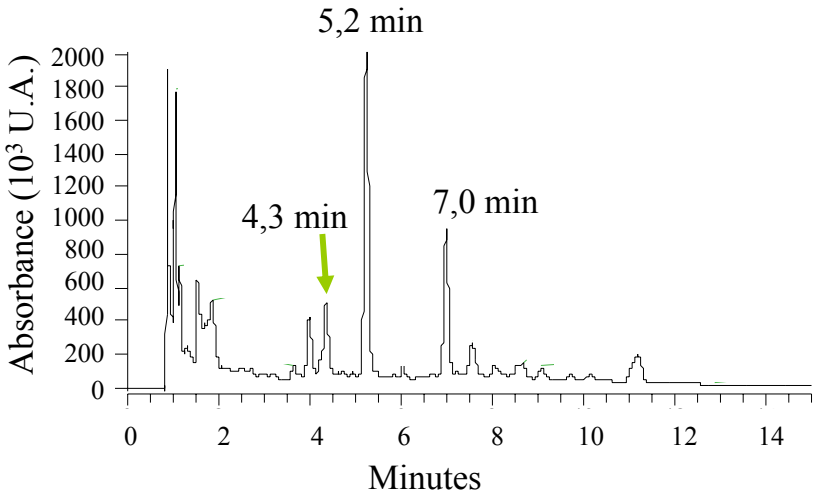


Figure 71 : Analyse chromatographique d'un mélange glutamine et glucose (détection UV à 270 nm).

Sur ce chromatogramme, un pic d'aire importante est élué à 7 min. Grâce à sa masse moléculaire et à son temps de rétention, nous avons identifié ce pic comme étant celui de l'HMF. Comme nous l'avons détaillé dans la PARTIE I chapitre I : II (p 26), l'HMF a deux origines chimiques. Il peut être formé par simple dégradation du glucose ou être issu de la réaction de Maillard après dégradation du produit d'Amadori.

Le pic chromatographique le plus intense est observé avec un temps de rétention de 5,2 min. C'est aussi un produit issu de l'auto-dégradation du glucose car nous le retrouvons dans un témoin composé de glucose chauffé à 120°C.

En revanche, nous distinguons un pic à 4,3 min qui n'est pas retrouvé en absence de glutamine. La recherche des principaux ions élués à ce temps de rétention révèle plusieurs m/z dont 185 et 215. La sélection de ces deux masses permet d'extraire en LC-MS le chromatogramme présenté dans la figure 72.

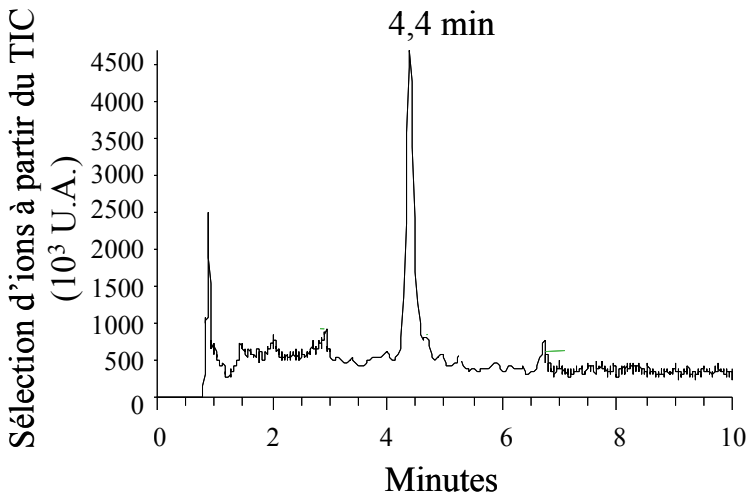


Figure 72 : Chromatogramme obtenu en LC-MS d'un mélange composé de glutamine et de glucose incubé 2 h à 120°C. Les ions 185 et 215 ont été extraits du TIC.

Le pic détecté par absorbance à 270 nm est évidement retrouvé en MS en sélectionnant les ions de masses 185 et 215. Ce sont ces ions qui feront l'objet d'une recherche structurale importante dans les paragraphes suivants. Nous étudierons les caractéristiques spectrales de ces ions et réaliserons une analyse par MS-Q-TOF afin d'obtenir une identification structurale complète.

II. CARACTERISTIQUES SPECTRALES

Le pic chromatographique de temps de rétention 4,4 est caractérisé par un spectre de masse complexe présenté dans la figure 73.

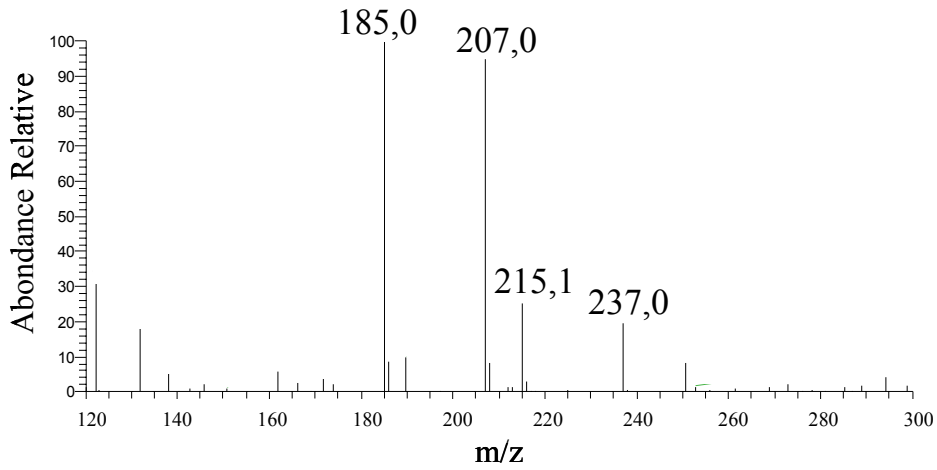


Figure 73 : Spectre de masse de deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines : m/z 185 et 215.

D'après le spectre de masse obtenu, quatre ions sont élués au temps de rétention de 4,4 min : m/z 185 ; 207 ; 215 et 237. Une différence de 22 unités de masse est observée entre les ions 185 et 207, mais aussi entre les ions 215 et 237. Cette différence est caractéristique des adduits sodium $[M+Na]^+$ qui se forment au cours de l'ionisation par électrospray . Les éluants utilisés dans notre analyse LC-MS ne contiennent pas de sels de sodium, cependant il est vraisemblable que la verrerie soit à l'origine de la contamination de nos échantillons par les ions sodium.

Dès lors, nous détectons deux molécules de masse 184 et 214 qui sont formés par réaction de Maillard entre la glutamine et le glucose. Dans nos conditions chromatographiques, ces deux molécules sont co-éluées et ne peuvent être discriminées que par leur masse. En effet, en UV ces deux molécules ne forment qu'un seul pic chromatographique. Nous pouvons supposer qu'ayant la même affinité pour la phase stationnaire de la colonne C18, leurs structures chimiques soient proches. Dans cette thèse

nous n'avons pas tenté de les séparer par chromatographie, mais une amélioration de la résolution chromatographique est possible. Il faudrait expérimenter différentes phases stationnaires et mobiles, et aussi tester une température d'élution plus faible.

Afin de simplifier la compréhension de ce chapitre, les deux molécules de m/z 185 et 215 seront nommées respectivement poly-hydroxyalkyl-pyrazines A et B.

D'après la règle de l'azote énoncée dans le chapitre II : II.2.e (p 147), nous pouvons aussi évaluer pour ces deux molécules leur nombre d'atomes d'azote présents au sein de leur structure. Les ions $[M+H]^+$ étant impairs (m/z = 185 et 215), leurs masses M doivent être paires. Dans ce cas, le nombre d'atomes d'azote est probablement pair, égal à 2 ou 4. Ce nombre d'atomes d'azote sera vérifié après analyse LC-MS d'ammoniac marqué à l'azote ^{15}N incubé en présence de glucose (paragraphe III.1 ; p 193).

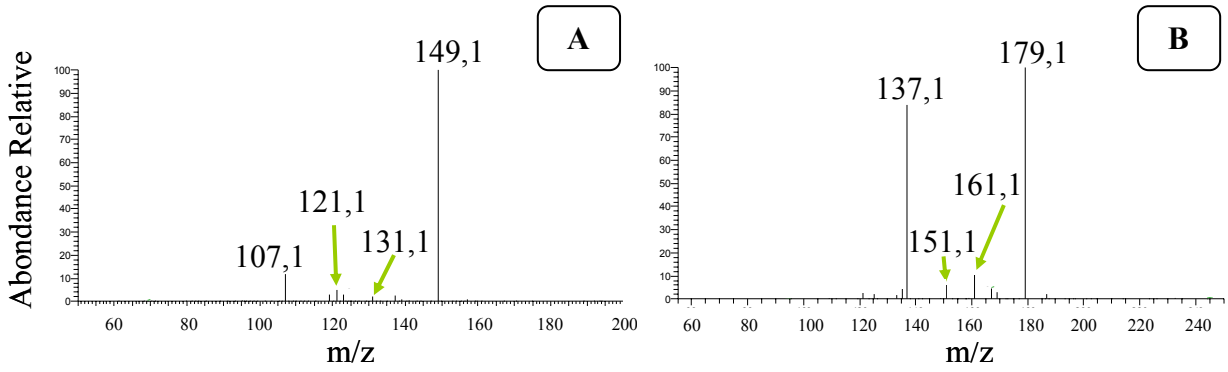


Figure 74 : Spectres MS^2 des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines : m/z 185 (A) et m/z 215 (B).

La fragmentation MS/MS des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines (figure 74 A & B) indique les mêmes ions fils avec une différence de 30 unités de masse. Les pertes de neutre sont donc identiques. Rappelons que ces analyses MS/MS sont réalisées avec activation de bande large qui entraîne la fragmentation de l'ion parent $[M+H]^+$ ainsi que celle de l'ion $[M+H-H_2O]^+$ qui est, par conséquent, non détecté sur les spectres MS/MS. Nous observons donc deux pertes successives de H_2O formant les ions fils m/z 149 et 179 pour chacune des poly-hydroxyalkyl-pyrazines. Puis, une perte de C_2H_2O est obtenue pour donner les ions fragments de m/z 107 et 137. Les ions fils m/z 131 et 161 proviennent de pertes successives de trois molécules de H_2O alors que les ions m/z 121 et 151 sont formés par des pertes de

deux molécules de H_2O associées à une perte de CO. Cette fragmentation sera confirmée par une analyse en MS-Q-TOF avec laquelle nous identifierons les fragments de façon précise.

Malgré l'absence de séparation chromatographique des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines identifiées, nous avons mesuré le spectre d'absorbance correspondant à leur mélange (figure 75).

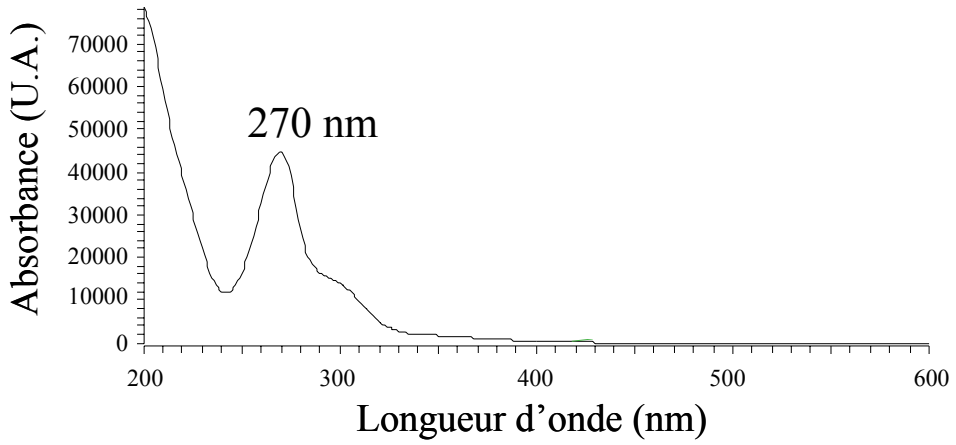


Figure 75 : Spectre d'absorbance des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

Nous observons pour ce mélange de deux pyrazines un maximum d'absorption à 270 nm. Cette longueur d'onde est caractéristique de chromophores de type $(C=C)_3$ et C=O (Hamon*, et coll.*, 1979). Cependant il serait hasardeux de proposer une structure sur la base d'une spectroscopie électronique aussi simple.

III. CARACTERISATION DE LA FORMULE BRUTE

1. Détermination du nombre d'atomes d'azote

Pour connaître le nombre exact d'atomes d'azote que présentent les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines, nous avons réalisé une incubation d'ammoniac marqué à l'azote ^{15}N ($^{15}NH_4Cl$) et de glucose. Nous avons au préalable trouvé que les pyrazines recherchées se formaient aussi bien en présence de glutamine que d'ammoniac.

Après une analyse du mélange $^{15}NH_4Cl$+glucose par LC-MS, nous obtenons le spectre de masse présenté dans la figure 76.

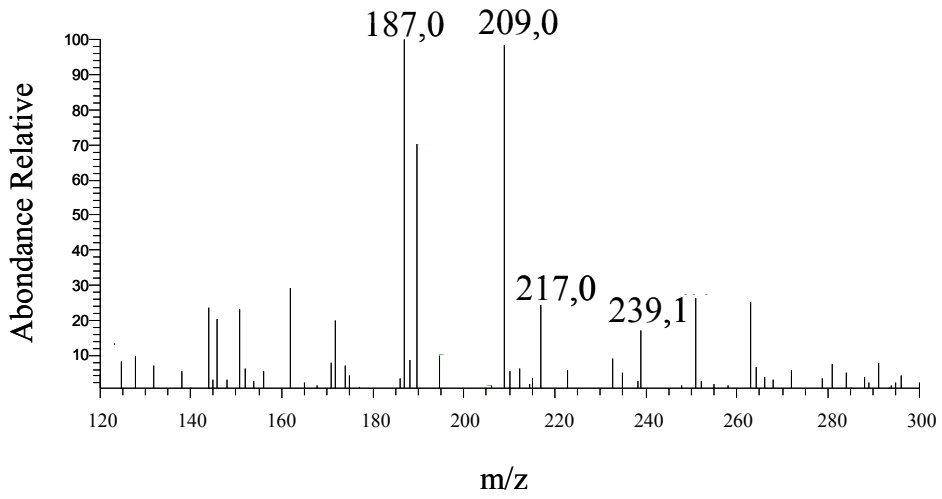


Figure 76 : Spectre de masse des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines obtenu après analyse en LC-MS d'un mélange $^{15}NH_4Cl$ + glucose.

Comparé au spectre de masse de l'échantillon préparé avec de l'ammoniac ^{14}N (figure 73, p 190), nous observons une augmentation de deux unités de masse pour les deux molécules ainsi que pour leurs adduits respectifs. Cela signifie que chacun des deux composés possède deux atomes d'azote au sein de leur structure. Ce résultat est en accord avec l'estimation que nous avons faite à partir de la règle de l'azote dans le paragraphe précédent.

2. Détermination du nombre d'atomes de carbone

Contrairement à notre première étude des PRM formés à partir du méthylglyoxal pour laquelle nous n'avions pas d'isotope du composé dicarbonylé, nous pouvons utiliser dans cette deuxième étude un isotope stable du glucose pour connaître le nombre d'atomes de carbone présents au sein des deux pyrazines. En effet, nous disposons de glucose marqué au ^{13}C sur ses six carbones, et après incubation d'ammoniac en présence de cet isotope du glucose, une analyse par LC-MS a conduit au spectre de masse illustré sur la figure 77.

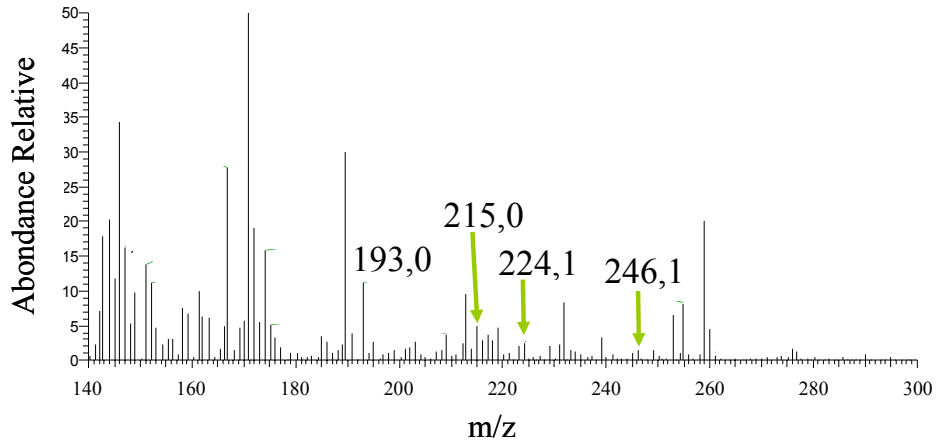


Figure 77 : Spectre de masse des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines obtenu après analyse en LC-MS d'un mélange composé d'ammoniac et de glucose-^{13}C.

Ce spectre montre une différence de 8 unités de masse pour l'ion m/z 185 (m/z = 193 avec le glucose-^{13}C) et de 9 unités de masse pour l'ion m/z 215 (m/z = 224 avec le glucose-^{13}C). Notons que les valeurs m/z des adduits des ions m/z 185 et 215 sont aussi augmentées respectivement de 8 et 9 unités de masse (m/z = 215 et 246).

A l'aide des résultats obtenus avec l'$^{15}NH_3$ et le glucose-^{13}C, nous pouvons d'ores et déjà identifier la formule brute de chacun des composés :

- Pour l'ion de m/z 185, nous avons déterminé 8 atomes de carbone et 2 atomes d'azote. Avec cette information, une seule possibilité de formule brute semble être adaptée : $C_8H_{12}N_2O_3$.
- Pour l'ion de m/z 215, nous avons déterminé le même nombre d'atomes d'azote et 9 atomes de carbone. De ce résultat découle la formule brute suivante : $C_9H_{14}N_2O_4$.

3. Analyse des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines par MS-Q-TOF

Pour confirmer les formules brutes déterminées ci-dessus, nous avons réalisé une analyse en spectrométrie de masse à haute résolution (MS-Q-TOF) des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines (figure 78) après les avoir isolées d'un mélange ammoniac/glucose chauffé à 180°C sans pour autant avoir pu les séparer l'une de l'autre.

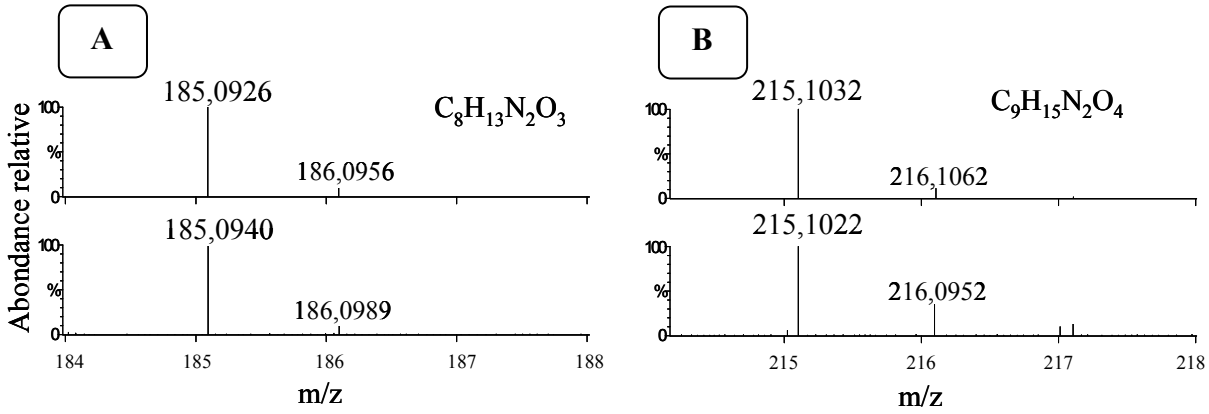


Figure 78 : Spectres de masse réalisés sur le spectromètre Q-TOF de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine (A) et la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine (B). Pour chaque composé, se trouvent le spectre de masse théorique d'une formule brute donnée (en haut) et le spectre de masse expérimental du composé analysé (en bas).

Pour chaque molécule, nous avons donc identifié une formule brute qui est acceptable puisque la différence entre la masse de la formule brute théorique et la masse expérimentale est toujours inférieure à 2 mDa (tableau 12). Ces analyses sur le spectromètre Q-TOF confirment les résultats de formules brutes que nous avons trouvés à l'aide de simples analyses isotopiques en LC-MS.

Composé	Masse QTOF MH^+	Formule brute MH^+
2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine	185,0940	$C_8H_{13}N_2O_3$
2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine	215,1022	$C_9H_{15}N_2O_4$

Tableau 12 : Résultats d'analyses en spectrométrie de masse à haute résolution de nos deux molécules.

4. Identification structurale des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines

En l'absence d'analyse RMN qui aurait déterminé sans ambiguïté la structure des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines, nous allons proposer deux formules développées en s'appuyant sur des données de la littérature.

Les alkylpyrazines qui sont des composés volatils responsables de flaveurs, ont été largement étudiées. Leur intérêt pour l'industrie alimentaire et leur analyse relativement simple par spectrométrie en phase gazeuse sont certainement à l'origine de cette étude exhaustive. A l'inverse, les poly-hydroxyalkyl-pyrazines n'ont pas fait l'objet d'études aussi approfondies. C'est pourtant dès 1898 que Lobry de Bruyn découvrit la première poly-hydroxyalkyl-pyrazine appelée fructosazine (Figure 79). Cet auteur a obtenu la synthèse de cette pyrazine à partir du 2-amino-2-deoxy-D-glucose aussi appelé glucosamine (Lobry de Bruyn, 1898) mais aussi en incubant du D-fructose en présence d'ammoniac (Lobry de Bruyn, 1899). En 1973, la recherche des poly-hydroxyalkyl-pyrazines s'est orientée vers l'identification des composés insolubles dans une phase alcoolique issus de la réaction entre le glucose et l'ammoniac en milieu légèrement acide (Tsuchida*, et coll.*, 1973). Il a notamment été découvert deux pyrazines formées en proportions quasi équivalentes : la

déoxyfructosazine et son 6-isomère (figure 79). La déoxyfructosazine avait été isolée précédemment à partir d'une solution de glucosamine chauffée dans l'acide acétique (Kuhn, *et coll.*, 1961).

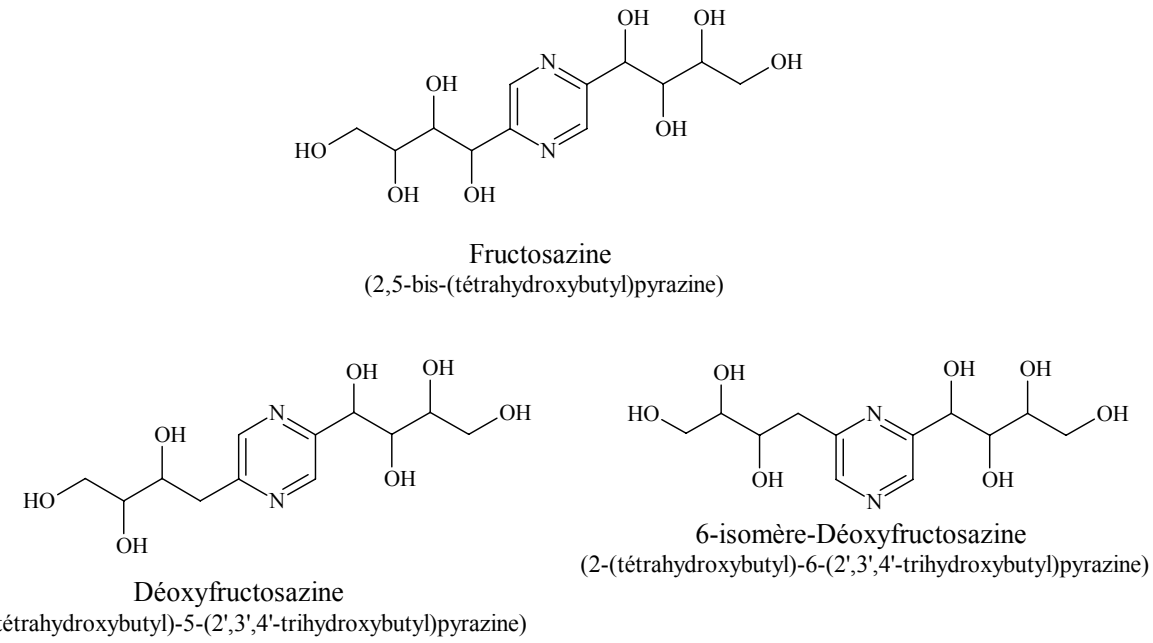


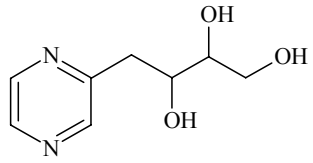
Figure 79 : Trois exemples de poly-hydroxyalkyl-pyrazines décrites dans la littérature.

Les quelques études réalisées sur les poly-hydroxyalkyl-pyrazines indiquent qu'elles absorbent préférentiellement à 275 nm et qu'elles ne possèdent pas de propriété de fluorescence. Ces informations spectrales sont en adéquation avec celles que nous observons sur les deux molécules que nous avons détectées dans notre modèle expérimental.

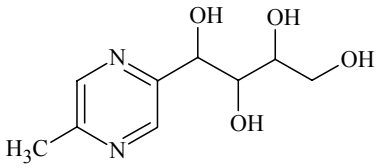
Enfin, parmi les pyrazines hydrosolubles décrites, nous remarquons deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines de masses moléculaires identiques à celles que nous avons identifiées par LC-MS (184 et 214). Ces deux molécules sont décrites comme étant respectivement la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine et la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine (figure 80). Il existe une forte probabilité que ces molécules correspondent aux deux molécules dont nous recherchons la structure.

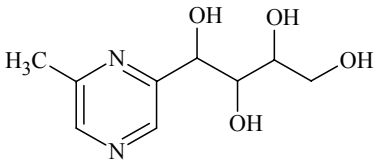
Ceci est d'autant plus probable que la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine a été obtenue en 1952 par réaction de l'ammoniac sur le glucose (Hough, *et coll.*, 1952) et que

la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine a été détectée dans de la sauce de soja qui est une matrice alimentaire relativement riche en poly-hydroxyalkyl-pyrazines (Tsuchida*, et coll.*, 1990 ; Magaletta & Ho, 1996 ; Magaletta*, et coll.*, 1996).



2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine





2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine

Figure 80 : Deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines probablement identifiées dans nos mélanges glutamine/glucose.

En se fondant sur les structures chimiques illustrées par la figure 80, nous allons vérifier que les fragments de nos deux molécules, obtenus par spectrométrie de masse à haute résolution, correspondent effectivement à ce type de poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

Nous proposons donc deux schémas de fragmentation sur les figure 81 et figure 82. Dans le schéma de la figure 82, sans élément d'information analytique précis, nous avons positionné arbitrairement le groupement méthyle en position 6 sur le cycle pyrazine.

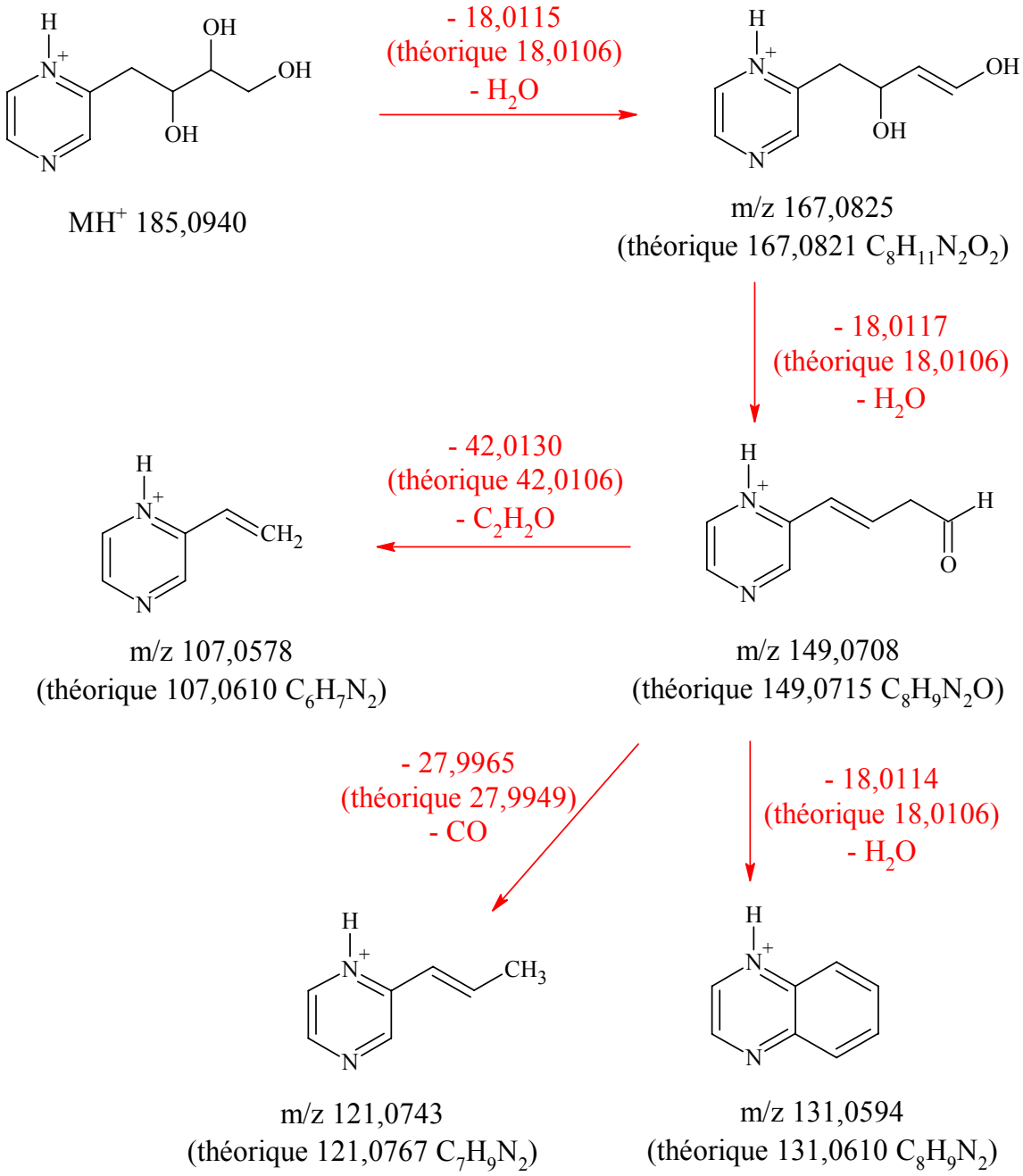


Figure 81 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS de la 2-(2,3,4-trihydroxybutyl)pyrazine.

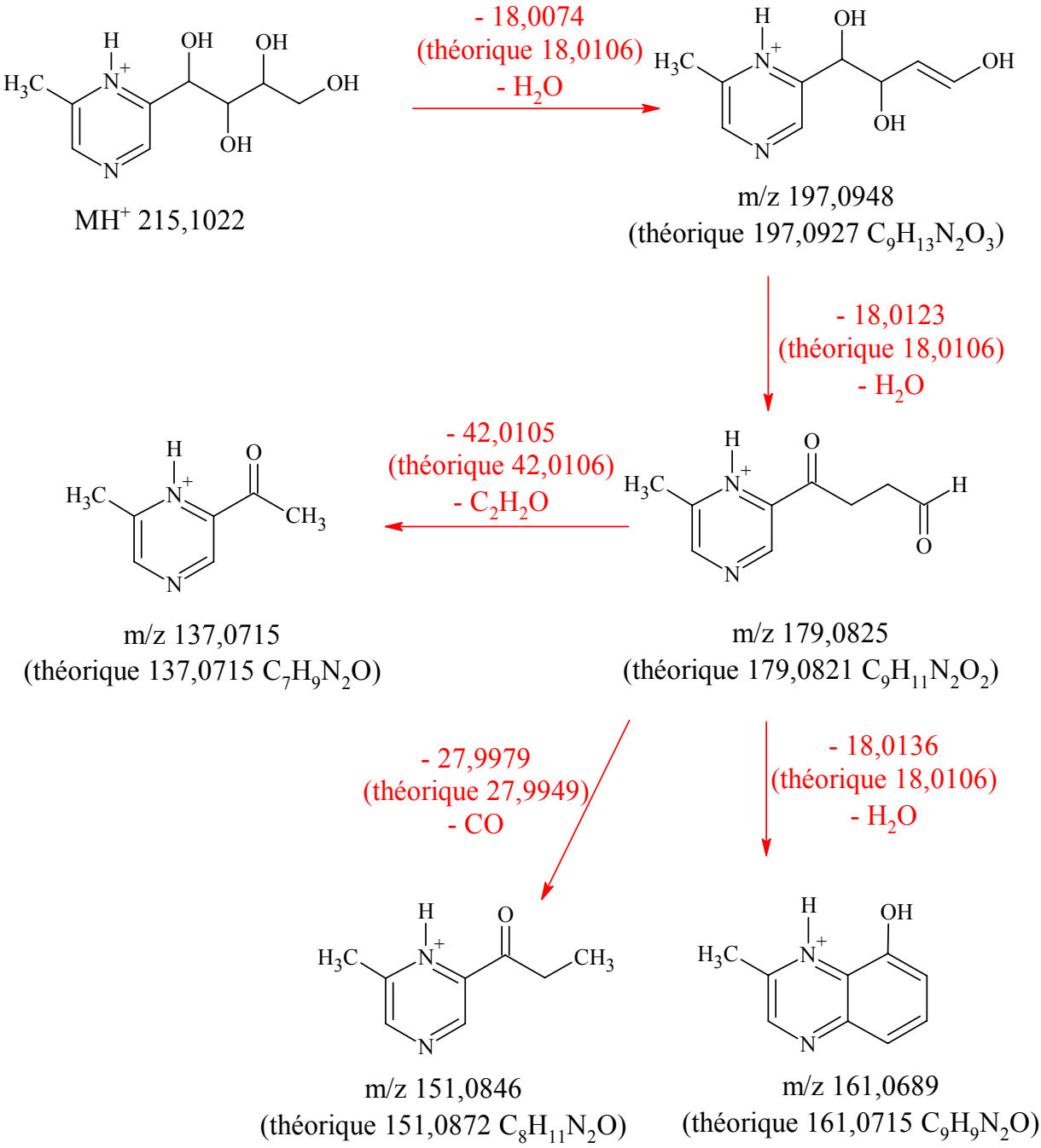


Figure 82 : Proposition d'un schéma de fragmentation MS/MS de la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine.

Les fragments que nous observons après analyse MS/MS sur un spectromètre Q-TOF sont cohérents avec ceux que nous pourrions obtenir pour les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines proposées. Pour ces deux pyrazines, nous proposons le même type de fragmentation. Une perte successive de deux molécules d'eau conduit respectivement à l'ion fils m/z 149 et 179 pour la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine et la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine. A partir de ces ions, nous observons trois pertes possibles : une perte de CO, une perte de C_2H_2O, ou une perte d'une troisième molécule d'eau. Précisons que par LC-MS-MS, il est impossible de distinguer les deux isomères de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine : la 2-méthyl-5-tétrahydroxybutylpyrazine et la 2-méthyl-6-tétrahydroxybutylpyrazine.

En conclusion, cette analyse est un élément supplémentaire qui permet d'affirmer que les deux molécules identifiées dans notre modèle simple de réaction de Maillard entre la glutamine (ou NH_3) et le glucose sont la trihydroxybutyl-pyrazine et la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine.

IV. EXTRACTION DES DEUX POLY-HYDROXYALKYL-PYRAZINES AU DICHLOROMETHANE

Une caractéristique importante des poly-hydroxyalkyl-pyrazines est leur forte hydrophilicité qui les distingue de la plupart des pyrazines qui sont généralement des composés volatils.

Comme pour l'acide hydroxy-diméthylnicotinique (chapitre II : II.3 p 162), nous avons réalisé une extraction au dichlorométhane des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines contenues dans un mélange d'ammoniac et de glucose. Après une analyse par LC-MS-MS de ces deux molécules, les résultats montrent que les deux pyrazines de notre mélange réactionnel restent majoritairement en phase aqueuse à hauteur de 96% et 99% pour la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine et la 2-méthyl-5(ou6)-tétrahydroxybutylpyrazine, respectivement. Nous confirmons par cette analyse que les deux pyrazines détectées sont des molécules polaires. La présence de substituants fonctionnels de type polyol sur les cycles pyrazine peut être considéré comme responsables du caractère hydrophile des poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

V. ETUDE DU MECANISME DE FORMATION DES DEUX POLY-HYDROXYALKYL-PYRAZINES

Des hypothèses portant sur la formation des poly-hydroxyalkyl-pyrazines ont été proposées. Initialement, Jezo & Luzak (1963) avaient suggéré que les alkylpyrazines se formaient par condensation de deux molécules de glucosamine (produit de Heyns entre le fructose et l'ammoniac) et que, selon le même schéma réactionnel, la 6-isomère-déoxyfructosazine se formait entre une molécule de glucosamine et une molécule de fructosamine (produit d'Amadori entre le glucose et l'ammoniac).

Cependant, dix ans plus tard, Tsuchida*, et coll.* (1973) ont rejeté cette hypothèse en arguant que, dans les conditions légèrement acides de synthèse des déoxyfructosazines, la glucosamine n'était détectée qu'à l'état de traces (Heyns & Koch, 1952) et par conséquent ne pouvait expliquer la formation de poly-hydroxyalkyl-pyrazines. L'équipe de Tsuchida proposa alors un mécanisme de formation de ces deux pyrazines par condensation de la fructosamine avec le déoxyglucosone (dicarbonyle issu du glucose) et l'ammoniac.

Pour la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine et de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine, différents mécanismes sont proposés. En se basant sur l'observation simple de la structure chimique, Hough*, et coll.* (1952) proposent que la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine serait formée par condensation de deux molécules d'ammoniac avec une molécule de méthylglyoxal et une molécule de glucose. Le même type d'hypothèse est avancé par Tsuchida, *et coll.* (1990) qui suggèrent que le glyoxal et autres composés α-dicarbonylés de plus longue chaîne carbonée (ex : le 3-déoxyglucosone) pourraient servir de précurseur pour la synthèse de la trihydroxybutyl-pyrazine.

Nous avons résumé, dans la figure 83, les deux hypothèses de mécanisme de formation de ces deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines. Notons que l'isomérie de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine dépend de la position d'attaque nucléophile de l'ammoniac sur le méthylglyoxal et de l'hexose engagé dans la réaction. En effet cette pyrazine peut être formée aussi bien en présence de glucose, avec la formation de fructosamine, qu'en présence de fructose avec, cette fois-ci, la formation de glucosamine.

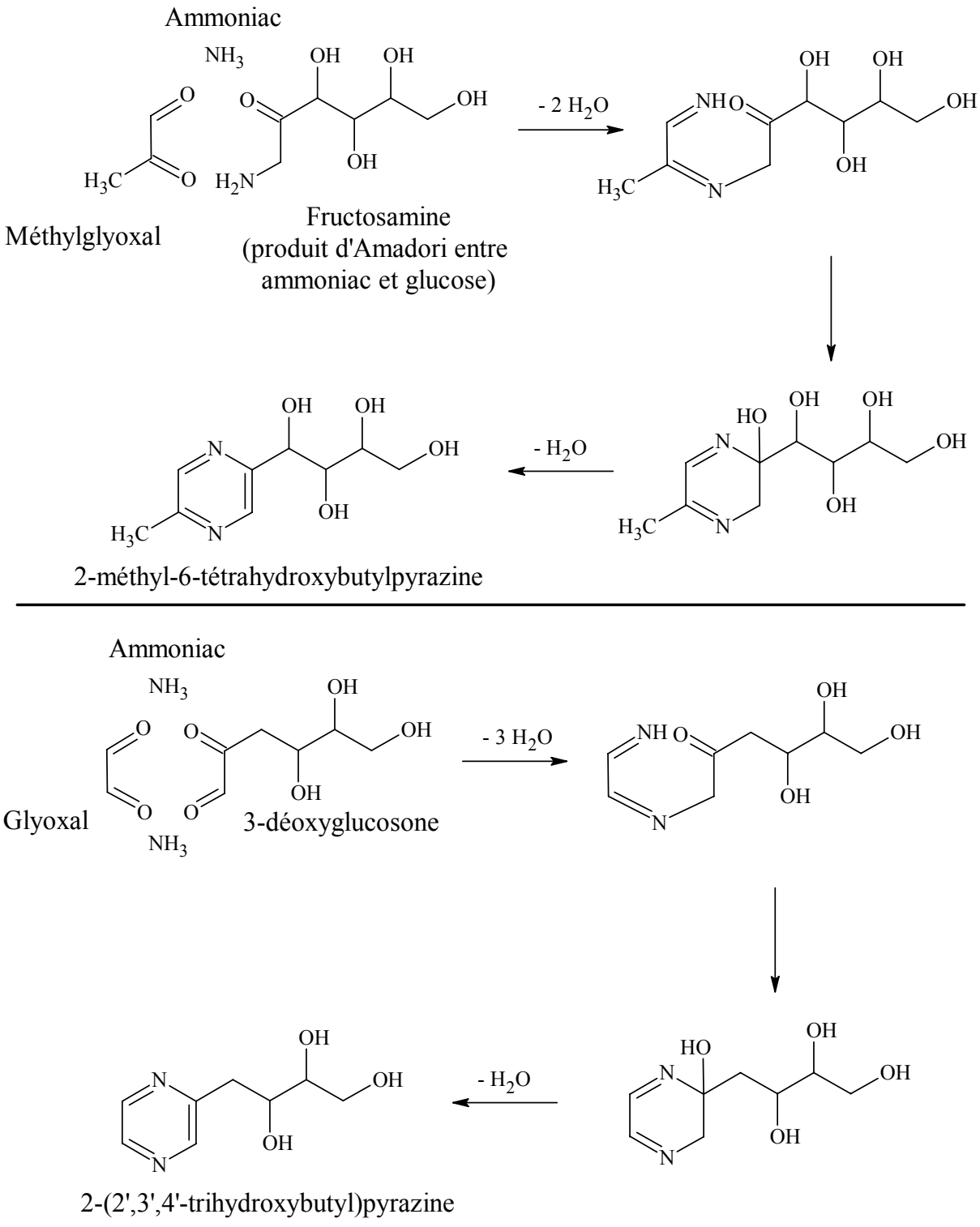


Figure 83 : Hypothèses de formation de la 2-méthyl-6-tétrahydroxybutylpyrazine (Hough, *et coll.*, 1952) et de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine.

1. Etude de l'effet pseudo-catalytique du glyoxal et du méthylglyoxal dans la formation des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

A notre connaissance, les hypothèses de mécanisme de formation de la 2-méthyl-6-tétrahydroxybutylpyrazine et de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine n'ont jamais été vérifiées. Nous allons donc tenter de les valider en mesurant leur cinétique de synthèse avec ou sans ajout de glyoxal ou de méthylglyoxal dans notre modèle simple composé d'ammoniac et de glucose. Nous rechercherons alors si ces ajouts accélèrent ou non la vitesse de formation des deux pyrazines.

a. Protocole expérimental

Différents mélanges sont réalisés : ammoniac + glucose (50/100 mM) ; ammoniac + glucose + glyoxal à deux concentrations (50/100/50 ou 100 mM) et ammoniac + glucose + méthylglyoxal à deux concentrations (50/100/50 ou 100 mM). Les échantillons ainsi préparés à pH 7,4 sont chauffés en bain d'huile à 120°C de 30 à 180 min.

Chaque échantillon est analysé par LC-MS-MS avec une fragmentation des ions parents de m/z égales à 185 et 215.

b. Résultats et discussion

La figure 84 représente la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine en fonction du temps d'incubation dans un mélange composé d'ammoniac et de glucose additionné soit de glyoxal (A), soit de méthylglyoxal (B).

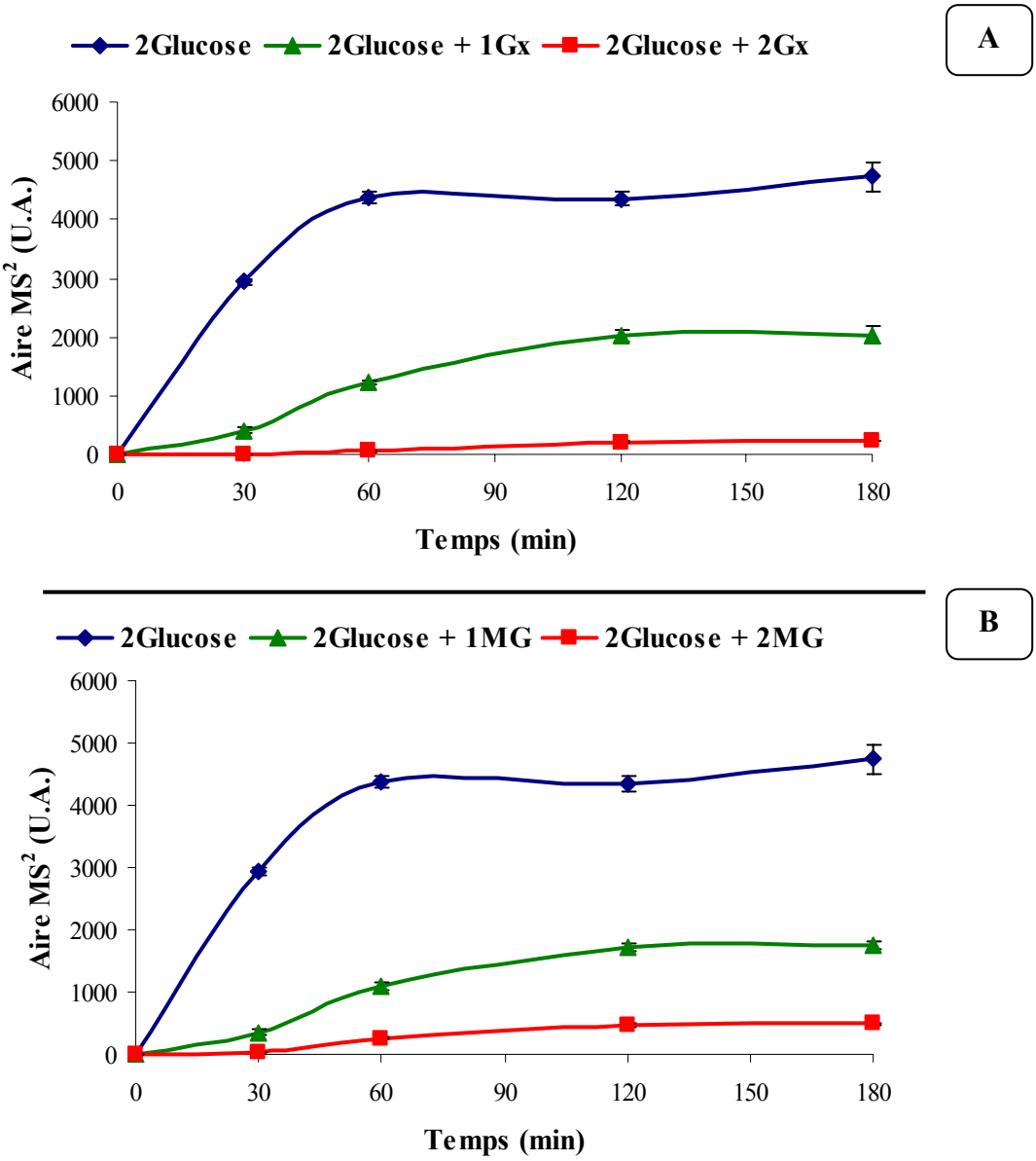


Figure 84 : Formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine en fonction du temps à partir d'un mélange incubé à 120°C composé d'ammoniac et de glucose ; A - additionné de glyoxal à deux concentrations (1 Gx et 2 Gx) ; B - additionné de méthylglyoxal à deux concentrations (1 MG et 2 MG).

La comparaison des cinétiques de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine, indique que l'ajout de glyoxal (figure 84 A) ou de méthylglyoxal (figure 84 B) a un effet inhibiteur dans nos conditions d'incubation. Le ralentissement de la vitesse de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine n'est pas proportionnel à la concentration de glyoxal et de

méthylglyoxal. Et une inhibition quasi-totale est observée lorsque le glyoxal est présent à une concentration de 100 mM.

Dans les mêmes conditions que précédemment, nous avons suivi la formation de la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine avec ou sans composés α-dicarbonylés (figure 85).

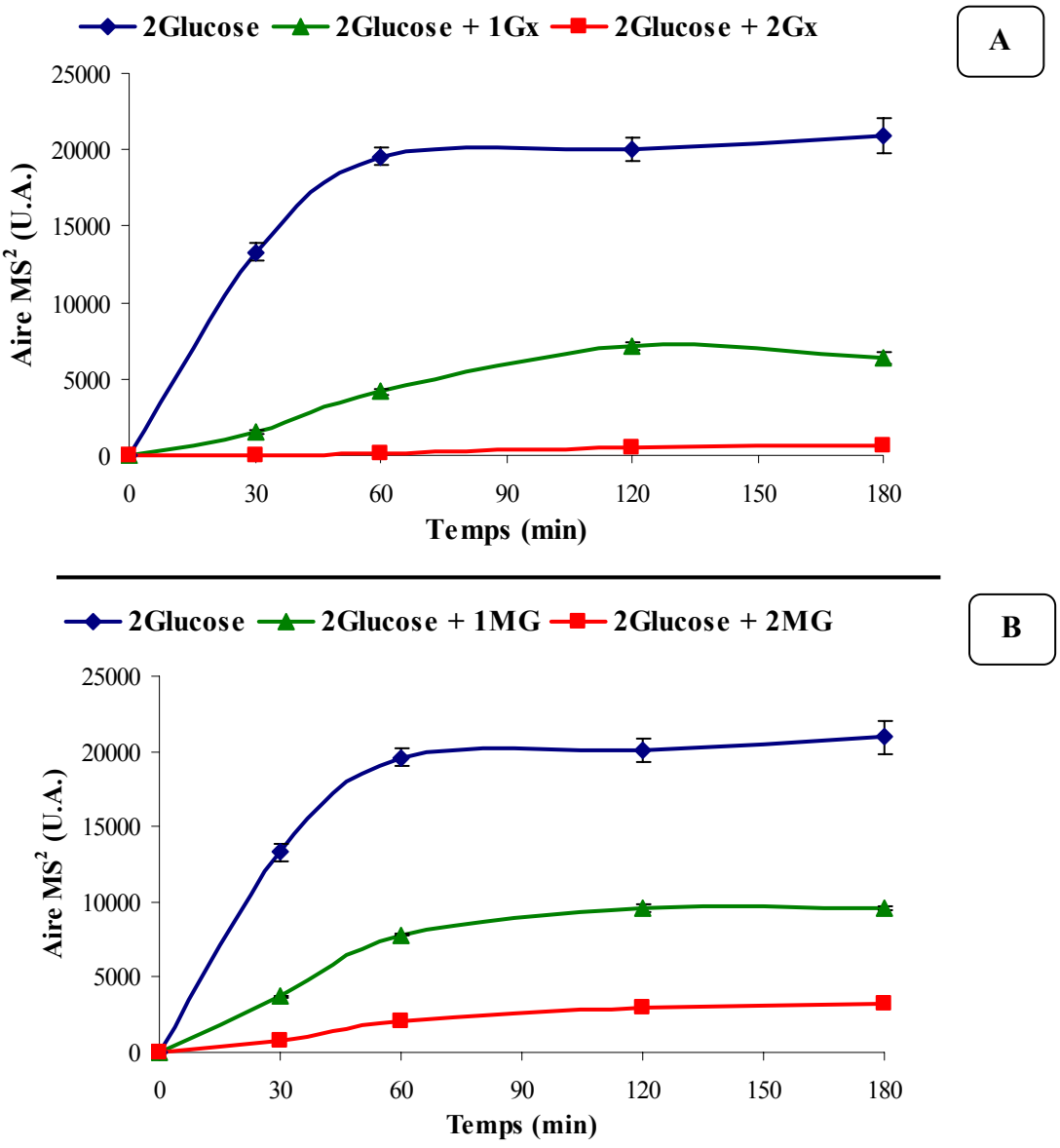


Figure 85 : Formation de la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine en fonction du temps à partir d'un mélange incubé à 120°C composé d'ammoniac et de glucose ; A - additionné de glyoxal à deux concentrations (1 Gx et 2 Gx) ; B – additionné de méthylglyoxal à deux concentrations (1 MG et 2MG).

Une fois de plus, nous observons une inhibition de la synthèse de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine en présence de composés α-dicarbonylés avec un effet inhibiteur encore très important du glyoxal présent à 100 mM dans le milieu réactionnel.

Nos résultats sont surprenants et en apparente contradiction avec les hypothèses qui étaient formulées par Tsuchida, *et coll.* (1990). En effet nous espérions observer un effet pseudo-catalytique des composés α-dicarbonylés de 2 et 3 carbones sur la formation des poly-hydroxyalkyl-pyrazines. Précisons que nous ne parlons pas de véritable effet catalytique puisque, dans notre étude, les catalyseurs (le glyoxal et le méthylglyoxal) sont supposés participer à la formation des produits étudiés.

Cette technique de pseudo-catalyse n'est pas à remettre en cause puisqu'elle a été utilisée précédemment avec succès pour la découverte du mécanisme de formation d'autres produits de Maillard en présence de composés α-dicarbonylés (Tessier*, et coll.*, 1999). A ce stade de notre investigation sur les mécanismes de formation, nous pouvons simplement affirmer qu'il existe une compétition entre la synthèse des poly-hydroxyalkyl-pyrazines en présence d'hexoses et celle d'autres produits de Maillard tels que l'acide hydroxy-diméthylnicotinique en présence de composés α-dicarbonylés de courtes chaînes carbonées. Cette compétition entre deux voies de réaction de Maillard pourrait, dans l'observation de nos cinétiques, masquer l'implication des composés α-dicarbonylés dans la formation des poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

Nous devons donc poursuivre cette étude par une analyse isotopique qui permettra de définir l'origine des carbones des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

2. Estimation de la contribution des deux composés α-dicarbonylés dans la formation des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines

Pour cela, nous avons réalisé une seconde expérience. A l'aide de glucose marqué au carbone ^{13}C sur les six atomes de carbone, nous avons recherché dans des mélanges ammoniac/glucose-^{13}C/glyoxal ou méthylglyoxal la présence des différents isotopes des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

a. Protocole expérimental

Nous réalisons les mêmes types de mélanges que précédemment (p 204) en remplaçant le glucose-^{12}C par du glucose-^{13}C. Les échantillons ainsi préparés à pH 7,4 sont chauffés en bain d'huile à 120°C pendant 2 h.

Par LC-MS, nous avons recherché les ions caractéristiques des deux pyrazines, avec pour m/z : 193 (185+8) et 224 (215+9). Ces deux masses correspondent aux deux pyrazines étudiées qui n'ont intégré dans leur structure que des carbones issus du glucose-^{13}C.

Si, comme nous le suspectons, les composés α-dicarbonylés participent à la formation des pyrazines, nous devrions détecter par LC-MS des ions de m/z égales à 191 (185+8-**2**) et 221 (215+9-**3**).

b. Résultats et discussion

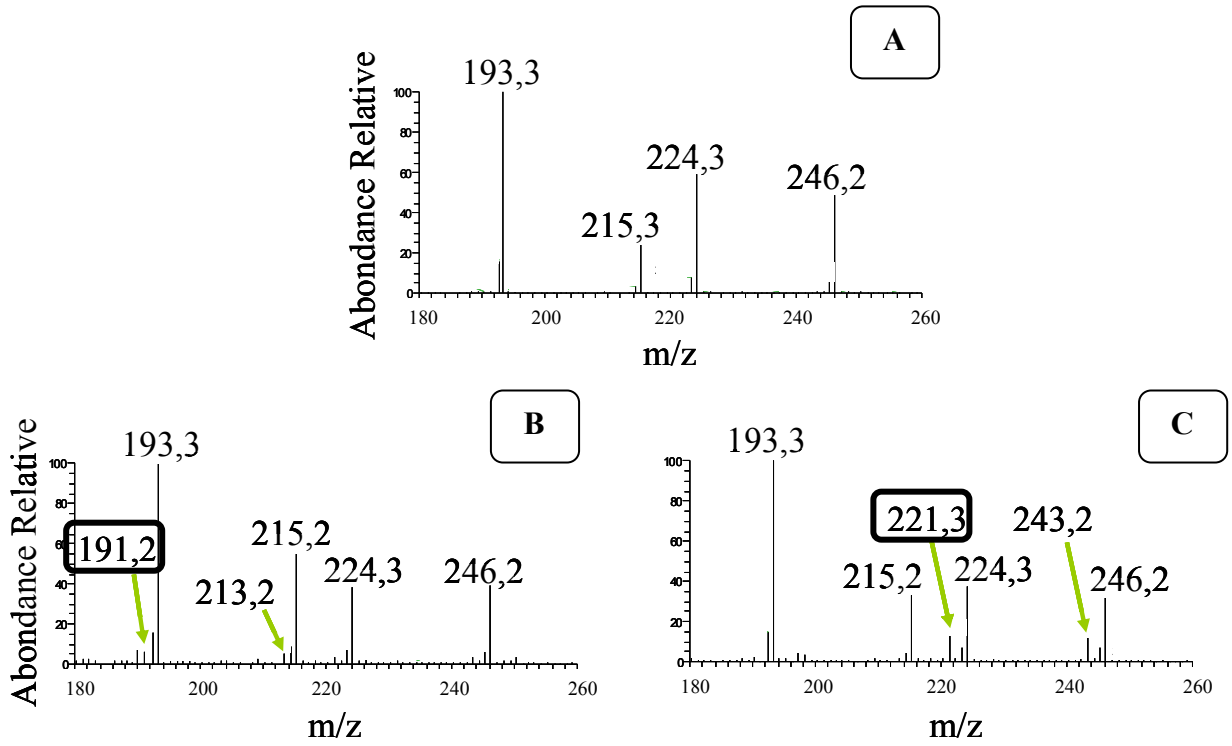


Figure 86 : Spectres de masse des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines formées lors de l'incubation d'un mélange composé d'ammoniac et de glucose-^{13}C (A) en présence de glyoxal (B) ou de méthylglyoxal (C).

Comme attendu, nous retrouvons, dans l'échantillon composé d'ammoniac et de glucose-^{13}C, les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines aux valeurs de m/z 193 et 224 (figure 86 A) qui indiquent respectivement la présence de 8 et 9 atomes de carbone dans leur structure.

De plus, l'analyse des échantillons contenant des ajouts de composés α-dicarbonylés, permet de révéler deux nouveaux ions de m/z 191 et 221 au même temps de rétention que les ions 193 et 224. Ces deux ions, absents de l'échantillon ammoniac/glucose-^{13}C, caractérisent donc les deux pyrazines qui ont été formées avec six atomes de carbone provenant du glucose, plus deux atomes de carbones provenant du glyoxal pour la trihydroxybutyl-pyrazine (m/z 191), ou plus trois atomes de carbones provenant du méthylglyoxal pour la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine (m/z 221).

Le tableau 13 rapporte les aires et écart-type des pics après sélection à partir du TIC des ions m/z 191 et 193 pour la trihydroxybutyl-pyrazine (en présence d'une ou deux moles de glyoxal) et des ions m/z 221 et 224 pour la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine (en présence d'une ou deux moles de méthylglyoxal). Pour le rapport deux moles de glyoxal pour deux moles de glucose, nous ne pouvons intégrer le pic chromatographique m/z 191 car la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine est tellement faible que nous ne distinguons plus l'ion m/z 191 (forte compétition entre le composé dicarbonylé et le glucose déjà observée précédemment, chapitre III : V 1). Nous observons donc une faible proportion d'ions 191 issus du glyoxal dans le cas de la trihydroxybutyl-pyrazine comparée à celle qui est obtenue directement avec le glucose (aire de 80 U.A. contre 1500 U.A.). En revanche, pour la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine, nous observons une proportion plus importante d'ions 221 évaluée à 32% dans le cas d'une mole de méthylglyoxal pour deux moles de glucose et 68% dans le cas de deux mol de méthylglyoxal.

	Glyoxal				**Méthylglyoxal**			
	m/z 191		*m/z 193*		*m/z 221*		*m/z 224*	
	Moyenne aire de pic (10^3 U.A.)	Ecart-type	Moyenne aire de pic (10^3 U.A.)	Ecart-type	Moyenne aire de pic (10^3 U.A.)	Ecart-type	Moyenne aire de pic (10^3 U.A.)	Ecart-type
1 mol	80	7	1502	126	284	10	896	10
2 mol					153	5	225	7

Tableau 13 : Moyennes et écart-type des aires de pics chromatographiques après sélection à partir du TIC des ions m/z 191 et 193 pour la trihydroxybutyl-pyrazine et des

ions m/z 221 et 224 pour la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine dans les mélanges composés d'une mole d'ammoniac pour deux moles de glucose-^{13}C additionnés de glyoxal (1 ou 2 moles) ou de méthylglyoxal (1 ou 2 moles) incubés 2 h à 120°C.

En conclusion, les mécanismes de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine et de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine que nous avons présentés sur la figure 83 sont vérifiés par cette dernière étude. Les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines peuvent donc se former en présence d'hexose et de composés α-dicarbonylés.

VI. CINETIQUES DE FORMATION DE LA TRIHYDROXYBUTYL-PYRAZINE ET DE LA METHYL-TETRAHYDROXYBUTYL-PYRAZINE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

1. Protocole expérimental

Un mélange ammoniac (50 mM) + glucose (100 mM) est préparé en milieu tampon phosphate 200 mM. Dans cette étude, nous n'avons testé qu'un pH légèrement acide (pH 5). Ce pH est représentatif du pH de nombreux aliments dont la tomate et ses produits dérivés que nous analyserons dans le dernier chapitre de cette thèse.

Le mélange réactionnel est incubé à 70°C et à 120°C dans une étuve, respectivement, de 4 h à 6 jours et de 30 min à 24 h, et à 180°C dans un bain d'huile de 5 à 120 min.

Chaque échantillon est analysé en double par HPLC/MS/MS. L'analyse en spectrométrie de masse consiste à fragmenter les ions m/z 185 et 215. Les résultats seront exprimés en aire du pic MS^2 en ayant pris soin de sélectionner l'ion fragment majoritaire pour chaque pyrazine : m/z 149 pour l'ion parent 185 et m/z 179 pour l'ion parent 215.

2. Résultats et discussion

Les résultats sont représentés dans la figure 87 dans laquelle nous retrouvons la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine et de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine

(identifiées par leur valeur m/z 185 et 215) en fonction du temps, au cours de l'incubation d'un mélange ammoniac/glucose à 70, 120 et 180°C.

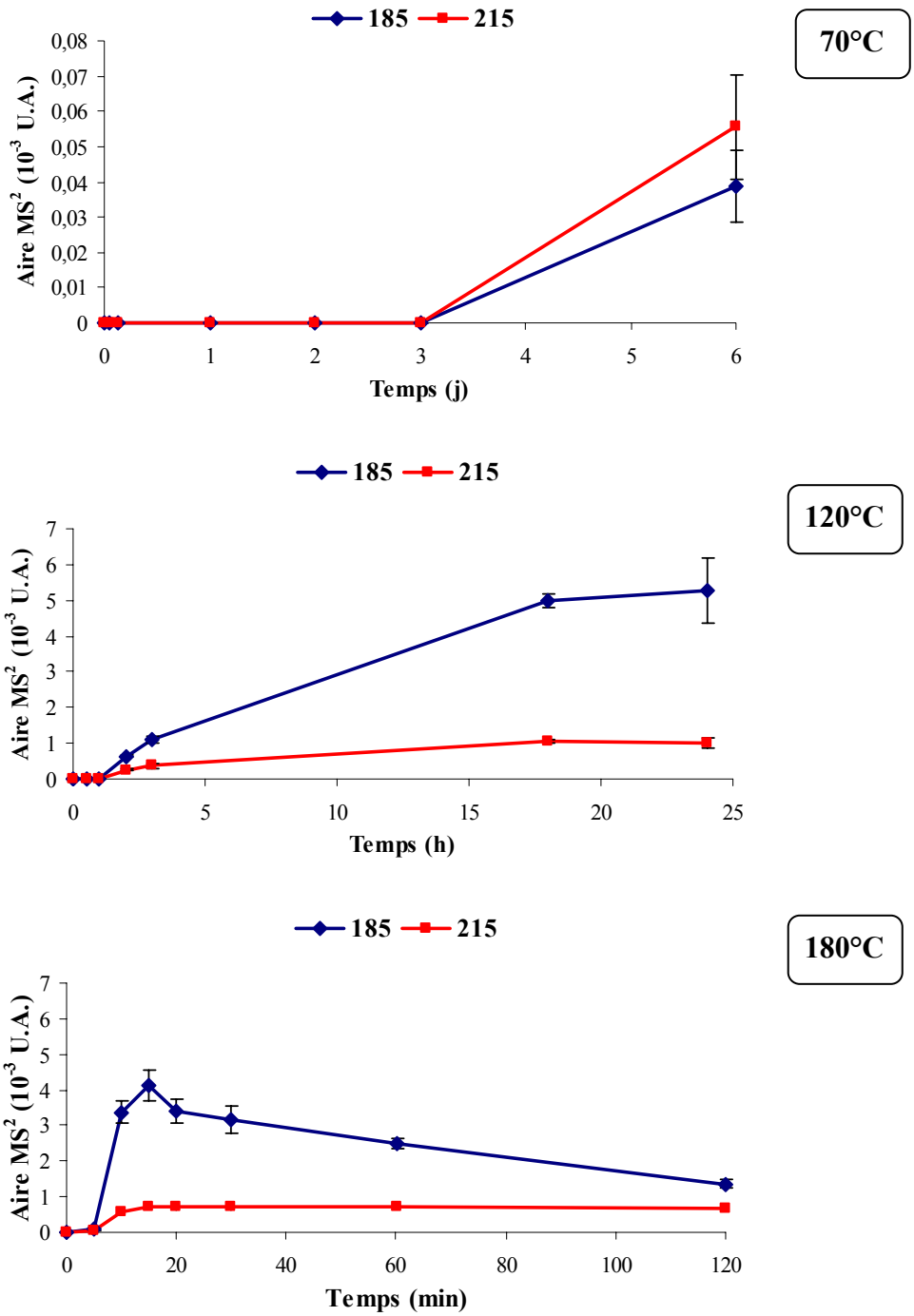


Figure 87 : Cinétiques de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine (185) et de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine (215) en fonction du temps et de la température (70°C, 120°C et 180°C) à pH 5. ***Attention : les échelles en abscisses ne sont pas identiques.***

Nous observons qu'une température de 70°C n'est pas favorable à la formation des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines puisqu'il faut au moins 6 jours d'incubation pour détecter une très faible concentration de pyrazine. A 120°C, la formation est assez lente avec un profil identique pour les deux molécules testées. Au delà de 18 h la vitesse de réaction devient négligeable et un plateau est observé jusqu'à 24 h. Une température plus élevée (180°C) ne semble pas augmenter significativement la vitesse de formation de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine. Par contre, à cette même température, la vitesse de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine est augmentée, mais est rapidement mise en compétition avec un mécanisme de dégradation qui apparaît sur la cinétique à partir de 15 min de chauffage.

VII. MESURE DE LA CONTRIBUTION DE L'α-AMINE DE LA GLUTAMINE DANS LA FORMATION DE LA 2-(2',3',4'-TRIHYDROXYBUTYL)PYRAZINE

Nous avons estimé que la contribution de l'α-amine dans la formation d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique formé à partir de glutamine et de méthylglyoxal était négligeable (chapitre II : II.7.b ; p 177). A présent, en présence de glucose, nous avons aussi souhaité mesurer sa contribution dans la formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine Cette analyse a été réalisée selon le principe d'analyse isotopique exposé précédemment (chapitre II : II.7 ; p 177).

1. Protocole expérimental

Nous avons incubé en triple exemplaire à 180°C pendant 15 min et à pH 5 deux mélanges composés de glutamine et de glucose. Le premier mélange est préparé avec la glutamine ^{14}N alors que le second contient de la glutamine marquée à l'azote ^{15}N sur l'α-amine (glutamine-*amine*-^{15}N). Après incubation, refroidissement et filtration, chaque échantillon est analysé par LC-MS.

2. Résultats et discussion

Après calcul des aires des pics chromatographiques correspondant aux ions m/z 185, 186 et 187 obtenus en LC-MS (figure 88), nous avons mesuré la contribution de l'α-amine de la glutamine dans la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine. Nous avons utilisé le même principe que celui utilisé pour l'étude de la contribution de l'α-amine de la glutamine dans la formation de la pyridine formée majoritairement à partir du méthylglyoxal (p 177). Nous avons donc comparé le pourcentage d'ions m/z 186 et 187 formés entre les deux mélanges analysés. Précisons dès à présent qu'aucun ion n'est détecté avec une masse de 187, ce qui signifie que la trihydroxybutyl-pyrazine n'est jamais formée avec deux azotes provenant exclusivement de l'α-amine de la glutamine.

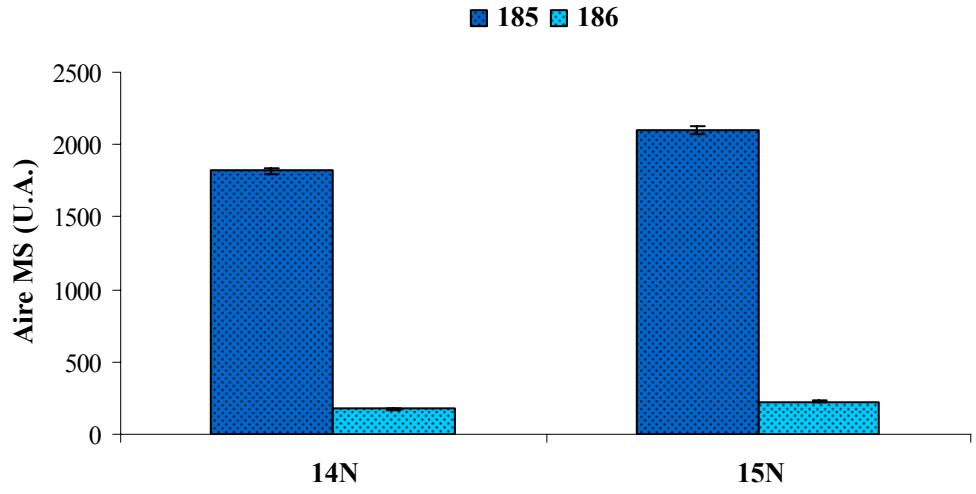


Figure 88 : Formation des ions m/z 185 et m/z 186 dans les mélanges glutamine/glucose (14N) et glutamine-*amine*-^{15}N/glucose (15N).

Par contre, l'ion de m/z égale à 186 est détecté par LC-MS. Le pourcentage d'ions m/z 186 dans le mélange glutamine-^{14}N et glucose est de 9,6%. En présence de glutamine-*amine*-^{15}N, ce pourcentage est calculé à 10,9%. Cette différence de pourcentage, qui représente la contribution de l'α-amine dans la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine, est alors estimée à

seulement 1,3%. Nous pouvons donc conclure que, dans nos conditions, l'α-amine de la glutamine ne participe pas à la formation de cette pyrazine.

VIII. INFLUENCE DE LA NATURE DU PRECURSEUR D'AMMONIAC SUR LA FORMATION DE LA 2-(2',3',4'-TRIHYDROXYBUTYL)PYRAZINE

Nous avons prouvé précédemment que la glutamine est le principal précurseur de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique formé par réaction de Maillard en présence de méthylglyoxal à 120°C (chapitre II : II.6.b ; p 176). Cette fois-ci, nous allons rechercher à partir de modèles simples quels peuvent être les précurseurs de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine.

1. Protocole expérimental

La formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine est étudiée sur cinq mélanges composés d'un précurseur d'ammoniac (glutamine, ammoniac, asparagine, urée et acide glutamique) à 50 mM et de glucose à 100 mM à pH 5. Ces cinq mélanges sont incubés pendant 2 heures à 120°C. Après refroidissement dans la glace, chaque échantillon est analysé par LC-MS-MS avec une fragmentation de l'ion $[M+H]^+$ de m/z égale à 185.

2. Résultats et discussion

Les résultats de la comparaison entre les cinq précurseurs d'ammoniac incubés en présence de glucose sont présentés dans la figure 89.

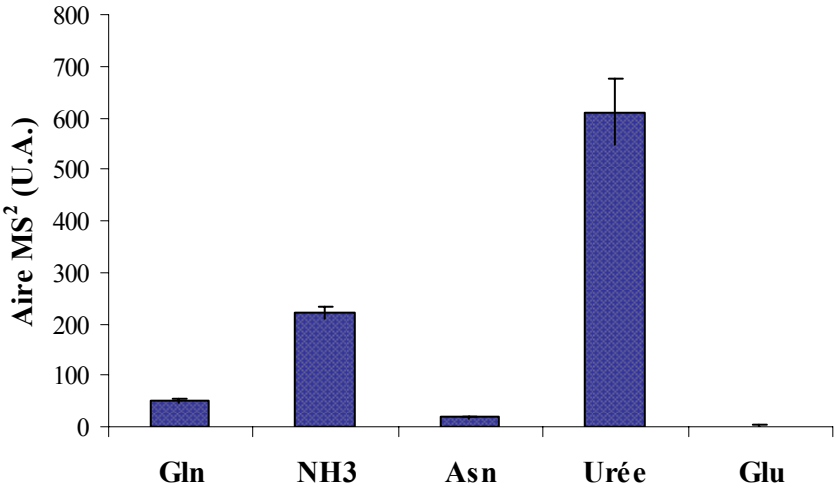


Figure 89 : Formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine à partir de la glutamine, l'ammoniac, l'asparagine, l'urée et l'acide glutamique en présence de glucose à un pH initial égal à 5 incubés pendant 2 h à 120°C (analyse LC-MS-MS).

Dans ces conditions d'incubation, l'urée conduit à la formation la plus importante de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine parmi les cinq molécules testées. Ensuite, nous trouvons l'ammoniac suivi de la glutamine, de l'asparagine et de l'acide glutamique. Nous remarquons une très nette différence entre l'urée et l'ammoniac, ce dernier ne formant qu'un tiers de la quantité de pyrazine obtenue avec l'urée. Contrairement à l'analyse comparative de formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique à partir des différentes amines, la glutamine n'est plus, dans le cas présent, le meilleur précurseur de la formation des produits de Maillard.

Cependant, une différence importante est à noter entre les deux études comparatives. Celle que nous avons réalisée pour suivre la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique a été mise au point à partir de modèles simples incubés dans une solution

tamponnée à pH neutre (pH optimum pour la synthèse de cette pyridine). Grâce à ce système tampon, nous avons pu maintenir le pH initial pendant la durée d'incubation. A l'inverse, les modèles simples de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine, qui était initialement ajustés à pH 5 (pH de la tomate qui est la matrice alimentaire que nous avons choisie d'étudier dans le dernier chapitre de cette thèse) ont subi une évolution de pH dépendante de la molécule étudiée. En fin d'incubation, le pH mesuré est de 6,1 pour l'urée ; 5,2 pour l'ammoniac, 5,0 pour l'acide glutamique et 4,7 pour la glutamine et l'asparagine. Ces écarts de pH peuvent s'expliquer en partie par une différence d'ammoniac formé entre les molécules testées, au cours du chauffage à 120°C en milieu acide. En effet, nous avons prouvé dans le chapitre I : I.2 (p 106) que la glutamine, à pH 5, libérait 100% (mol/mol) de pyroglutamate et vraisemblablement 100% d'ammoniac après une heure d'incubation à 120°C, malgré un léger retard de dégradation à pH acide comparé aux conditions neutre et basique. En revanche, après avoir incubé l'urée dans les mêmes conditions de pH acide, nous observons que cette molécule génère 137% d'ammoniac en une heure comparé à seulement 3% à pH basique.

Cette différence de formation d'ammoniac à pH acide entre l'urée et la glutamine explique en partie la différence de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine entre les deux molécules. Par contre, nous ne savons pas en quelle mesure les écarts de pH observés en fin de réaction entre les différents échantillons ont pu influencer la cinétique de formation de la trihydroxybutyl-pyrazine dans nos modèles simples. Pour compléter cette étude, il serait souhaitable d'étudier l'effet du pH sur la formation de cette poly-hydroxyalkyl-pyrazine ou bien de diminuer les concentrations des substrats pour mieux contrôler le pH. Mais cette dernière solution risque de rendre la détection de ce produit de Maillard difficile et peu précise.

IX. INFLUENCE DE DIFFERENTS SUCRES REDUCTEURS

1. Protocole expérimental

Une solution d'ammoniac (100 mM) est mélangée à volume égal à différentes solutions de sucres : glucose (200 mM), fructose (200 mM), saccharose (200 mM), maltose (200 mM) et un mélange glucose/fructose (100 mM pour chaque sucre) dans un tampon phosphate 200 mM pH 5. Chaque mélange est chauffé dans un bain d'huile à la température de 180°C pendant 15 min.

Chaque échantillon est analysé en double par HPLC/MS/MS. L'analyse en spectrométrie de masse consiste à fragmenter les ions m/z 185 et 215. Les résultats seront exprimés en aire du pic MS^2 en ayant pris soin de sélectionner l'ion fragment majoritaire pour chaque ion : m/z 149 pour l'ion parent 185 et m/z 179 pour l'ion parent 215.

2. Résultats et discussion

Parmi les sucres testés, nous constatons que le maltose est le plus faible précurseur de la formation de 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine (A) et de 2-méthyl-5(ou6)-tétrahydroxybutylpyrazine (B) (figure 90). Par contre, les incubations de modèles simples préparés avec du fructose, du saccharose ou un mélange de fructose et de glucose produisent environ la même quantité des deux pyrazines dans nos conditions de chauffage ($p > 0,05$). Le glucose, quant à lui, conduit à une formation moins importante des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines comparé au fructose ($p < 0,05$), soit une baisse de synthèse de l'ordre 20% pour la trihydroxybutyl-pyrazine et de 27% pour la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine.

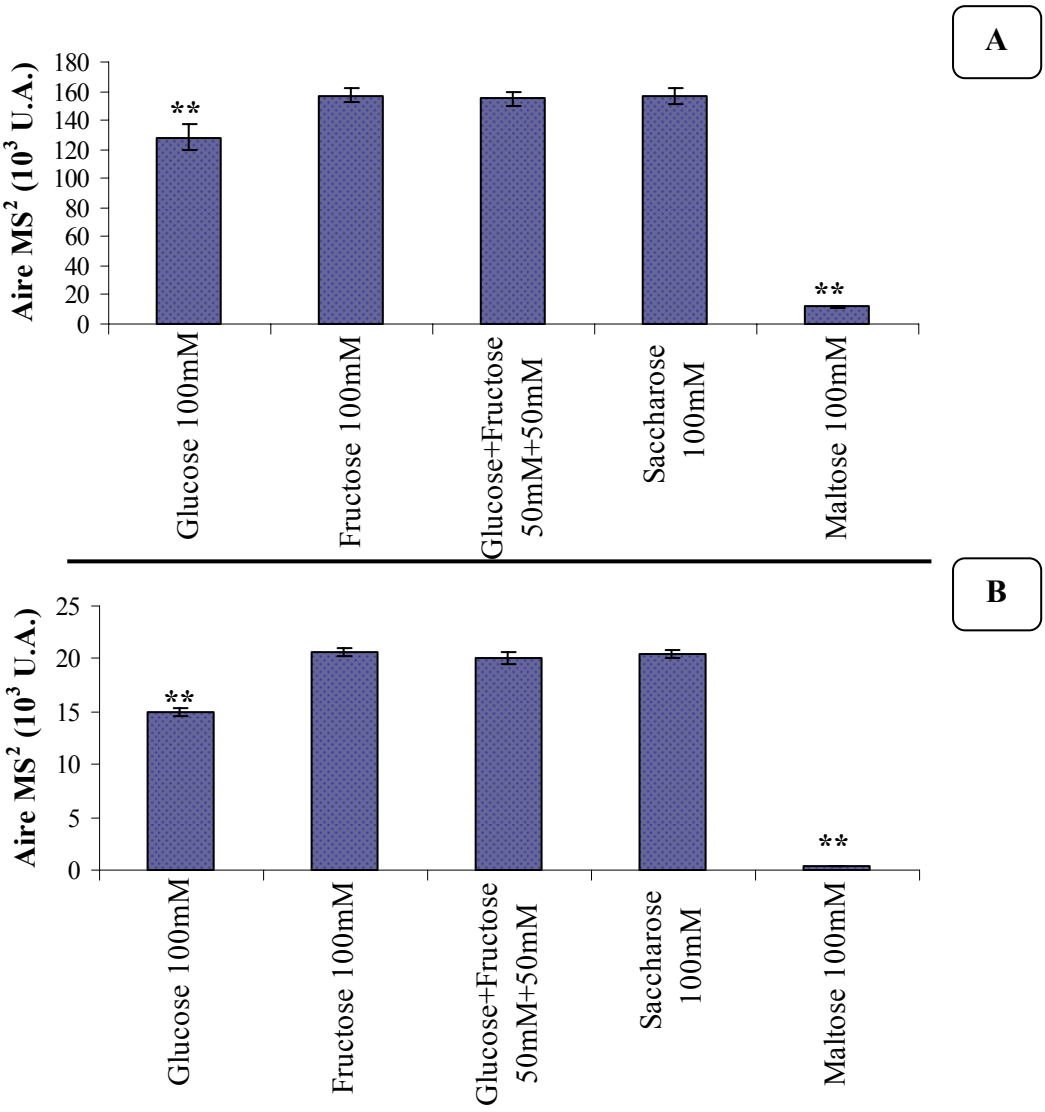


Figure 90 : Influence de la nature du sucre sur la formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine (A) et de la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine (B) dans un mélange ammoniac/sucre à pH 5 chauffé pendant 15 min à 180°C. Significativité entre fructose et autres sucres calculée à l'aide du test de Mann-Whitney (, $p < 0,05$).**

Le maltose est un disaccharide composé de deux unités de glucose. Dans nos conditions d'incubation, la faible production de pyrazines en présence de ce disaccharide est probablement justifiée par sa décomposition limitée en glucose (étape intermédiaire nécessaire pour la formation des pyrazines). A l'inverse, le saccharose, qui est aussi un disaccharide, s'hydrolyse rapidement en glucose et fructose (Ait-Ameur*, et coll.*, 2007). Cette première réaction ne semble pas ralentir la synthèse des poly-hydroxyalkyl-pyrazines à 180°C

puisque la même quantité est obtenue lorsqu'un mélange équimolaire de glucose et de fructose est utilisé.

Enfin, tout comme cela a pu être montré dans d'autres études sur la synthèse des produits de Maillard (Ashoor & Zent, 1984 ; Biedermann*, et coll.*, 2002), le fructose s'avère être plus réactif que le glucose pour la formation des poly-hydroxyalkyl-pyrazines. Cette dernière observation laisse supposer que la glucosamine (ou 2-amino-2-deoxy-D-glucose) issue d'une réaction de Maillard en présence de fructose serait un meilleur précurseur des pyrazines que la fructosamine issue du glucose. Cependant, d'après notre mécanisme de formation, il semble que le glucose puisse réagir directement sans isomérisation préalable en fructose.

X. CONCLUSION

L'analyse chromatographique d'un mélange de glutamine et de glucose incubé à 120°C ne révèle aucun produit de Maillard possédant des propriétés de fluorescence. Par contre, nous avons détecté deux chromophores qui absorbent dans l'UV avec un maximum à 270 nm, et qui possèdent une m/z égale à 185 et 215. Des incubations de $^{15}NH_4Cl$ en présence de glucose, et de glucose-^{13}C en présence d'ammoniac, ont permis d'identifier deux formules brutes pour ces deux produits de Maillard : $C_8H_{12}N_2O_3$ et $C_9H_{14}N_2O_4$. Une analyse en spectrométrie de masse à haute résolution a par ailleurs confirmé ces propositions.

A l'aide des données de fragmentation obtenues par MS/MS à haute résolution et d'éléments de la littérature, nous proposons deux formules développées : la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine (m/z 185) et la 2-méthyl-5 (ou 6)-tétrahydroxybutylpyrazine (m/z 215). Sans échantillon standard, il est impossible d'affirmer avec certitude que les deux chromophores identifiés dans nos modèles simples de réaction de Maillard sont les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines citées ci-dessus. Cependant, d'autres arguments nous permettent d'affirmer que nos deux molécules issues d'un modèle simple glutamine/glucose sont des pyrazines substituées avec des chaînes de polyalcool. En effet, une des particularités de ce type de pyrazines est leur caractère hydrophile qui les distingue de la plupart des alkylpyrazines largement décrites comme étant des molécules volatiles. Une extraction

liquide-liquide dans un mélange dichlorométhane-eau nous a permis de confirmer le caractère fortement polaire des produits de Maillard que nous avons identifiés dans cette étude.

Pour tenter de comprendre le mécanisme de formation de ces deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines, nous nous sommes appuyés sur des hypothèses de la littérature. En effet, se fondant sur la simple observation de la structure chimique, Hough*, et coll.* (1952) suggèrent que la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine serait formée par condensation de deux molécules d'ammoniac avec une molécule de méthylglyoxal et une molécule de glucose. Selon le même principe, Tsuchida*, et coll.* (1990) évoquent, près de quarante années plus tard, la participation du glyoxal et d'autres composés α-dicarbonylés de plus longue chaîne carbonée, comme le 3-déoxyglucosone, dans la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine.

Au lieu d'observer un effet pseudo-catalytique du glyoxal ou du méthylglyoxal sur la formation respective de la trihydroxybutyl-pyrazine et de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine, nous obtenons une inhibition de la réaction qui s'accentue avec la concentration du composé dicarbonylé ajouté. Par cette étude, nous mettons en évidence une compétition entre la formation des poly-hydroxyalkyl-pyrazines à partir d'hexoses et celles d'autres produits de Maillard, tels que l'acide hydroxy-diméthylnicotinique, à partir de plus petites molécules α-dicarbonylées. En revanche, après les tests mettant en jeu du glucose marqué au ^{13}C à la place du glucose classique, l'apparition de deux ions m/z 191 et 221, ne possédant chacun que six atomes de carbone provenant du glucose, confirme la participation du glyoxal et du méthylglyoxal dans la formation respective de la trihydroxybutyl-pyrazine et de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine. Par cette analyse nous validons les hypothèses qui ont été émises il y a une cinquantaine d'années.

Par ailleurs, nous avons évalué la contribution de l'α-amine de la glutamine dans la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine afin de compléter l'étude de sa formation. Les résultats de notre étude montrent que, dans nos conditions, la participation de l'α-amine est négligeable. Hwang*, et coll.* (1993) évoquaient déjà une participation prépondérante de l'ammoniac libéré par désamidation. Cependant, l'analyse d'alkylpyrazines formées en milieu aqueux à 180°C dans une solution basique non tamponnée indiquait une participation de l'α-amine de la glutamine de l'ordre de 30%. La disparité des conditions d'incubation ainsi que la différence des pyrazines analysées expliquent certainement pourquoi nous ne retrouvons pas les mêmes pourcentages. Nous pouvons alors supposer que, dans nos conditions, le mécanisme de formation des poly-hydroxyalkyl-pyrazines fait intervenir exclusivement

l'ammoniac libéré par lactamisation de la glutamine. Cette hypothèse semble raisonnable si on pense que pour former une pyrazine à partir d'un groupement α-aminé, il faut obtenir la formation d'un produit d'Amadori suivie d'une dégradation de Strecker. La formation d'une pyrazine à partir de l'ammoniac semble plus simple et donc favorisée.

Après avoir recherché l'origine des atomes d'azote impliqués dans la formation des pyrazines, nous avons examiné quels étaient les sucres réducteurs les plus réactifs vis-à-vis de la formation des poly-hydroxyalkyl-pyrazines. Précisons qu'il a déjà été prouvé que l'ensemble des carbones des cycles pyrazine sont apportés uniquement par les sucres réducteurs ou composés α-dicarbonylés impliqués dans la réaction de Maillard, et que les acides aminés ne sont qu'une source d'azote (Koehler*, et coll.*, 1969). Notre étude comparative sur les mono- ou disaccharides, révèle que le fructose est plus réactif que le glucose. Cela permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle la glucosamine serait un précurseur important des poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

Comparé à d'autres acides aminés, la glutamine a été décrite comme étant le meilleur précurseur de la formation de méthyl-pyrazine dans des modèles expérimentaux (Koehler*, et coll.*, 1969). Nous avons également montré dans cette thèse qu'elle était le meilleur précurseur de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. Néanmoins, ce n'est pas le cas pour tous les hétérocycles azotés. En effet, Koehler*, et coll.* (1969) ont montré que chaque alkylpyrazine était formée préférentiellement par un acide aminé spécifique. Cela laisse supposer que la nature de l'acide aminé aurait un impact sur la formation des substituants alkyle des cycles pyrazine. Au cours de l'étude sur la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine nous avons comparé la réactivité de différentes amines ou amides, et avons observé que la glutamine n'était pas le meilleur précurseur de la formation de cette poly-hydroxyalkyl-pyrazine. Parmi les molécules testées, et dans nos conditions d'incubation à pH acide, l'urée s'avère être la plus favorable pour former la trihydroxybutyl-pyrazine. Une étude réalisée par Chen*, et coll.* (2000) avait déjà montré que l'urée pouvait avoir une influence importante sur la composition des produits de Maillard volatils dans des modèles simples. Ainsi, il est possible de conclure que cette molécule retrouvée dans différentes matrices alimentaires est capable d'influencer le profil des pyrazines formées.

Enfin, certaines poly-hydroxyalkyl-pyrazines ont été détectées dans quelques matrices alimentaires comme le caramel commercial (Tsuchida*, et coll.*, 1986 ; Patey*, et coll.*, 1987), la sauce de soja et les cacahuètes grillées (Tsuchida*, et coll.*, 1990 ; Magaletta & Ho, 1996 ;

Magaletta*, et coll.*, 1996). Le chapitre suivant sera donc consacré à la recherche des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines et de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique que nous avons identifiés dans cette thèse, dans une sélection de matrices alimentaires riches en glutamine ou en ammoniac.

CHAPITRE IV : RECHERCHE DE L'ACIDE 5-HYDROXY-2,6-DIMETHYLNICOTINIQUE ET DES POLY-HYDROXYALKYL-PYRAZINES DANS DEUX MATRICES ALIMENTAIRES

Les études sur des modèles simples nous ont permis d'identifier quatre nouvelles molécules formées par réaction entre la glutamine (ou l'ammoniac) et le méthylglyoxal. La plus abondante d'entre elles, l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, n'a pas été décrite comme étant un produit de Maillard et, par conséquent, n'a jamais été recherchée dans les matrices alimentaires. Il est important de voir si cette molécule découverte dans des modèles simples est effectivement présente dans des denrées alimentaires riches en glutamine ou en ammoniac.

Les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines étudiées dans le chapitre précédent ont été détectées dans quelques matrices alimentaires comme la sauce de soja (Tsuchida*, et coll.*, 1990) et le caramel commercial riche en ammoniac (Tsuchida*, et coll.*, 1986). Nous avons également entrepris de les rechercher dans des matrices alimentaires riches en glutamine ou en ammoniac.

I. LA TOMATE ET SES PRODUITS DERIVES

Nous avons choisi de rechercher ces pyridines et pyrazines hydrosolubles dans la tomate. En effet, comme nous l'avons évoqué dans la PARTIE I chapitre III : II (p 59), la tomate est un fruit riche en glutamine libre. De plus, elle est aujourd'hui le premier fruit utilisé en France dans l'alimentation avec une consommation moyenne de 15 kg/an/personne (30 à 40 kg/an/personne pour les Etats-Unis). Celle-ci est d'autant plus accrue par la présence sur le marché de produits dérivés de la tomate de plus en plus nombreux tels que la sauce de tomate simple ou aromatisée, le concentré de tomate mais aussi tous les plats cuisinés incorporant la tomate. Dans ces différents produits, la tomate subit toutes sortes de traitements

thermiques. Nous allons donc rechercher si le chauffage de la tomate entraîne l'apparition de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique et les poly-hydroxyalkyl-pyrazines. Pour cette étude nous avons sélectionné une variété de tomate « grappe » d'origine Française. Les produits de Maillard étudiés seront également recherchés dans des produits dérivés de la tomate : une sauce tomate Buitoni chauffée ou non, un ketchup de marque Top Budget et une sauce brune de marque Heinz, dont la composition, indiquée sur les emballages, est reprise dans le tableau 14.

Nom	Marque	Composition
Sauce de tomates fraîches	Buitoni	Purée de tomates fraîches (97%), Oignon, Sel, Sucre, Huile d'olive vierge extra (0,2%), Arômes naturels
Tomato Ketchup Nature	Top Budget	Purée de tomates mi-réduite 68%, Sirop de glucose-fructose de blé, vinaigre d'alcool, amidon modifié (maïs-pomme de terre), sel, sauce worchester (vinaigre de malt, mélasse, eau, oignons, sel, tamarin, épices, ail, huile de citron (gluten))
Sauce Brune (*Brown Sauce*)	Heinz	Sirop de Glucose-Fructose, Vinaigre d'alcool, Eau, Pommes, Mélasse, Tomates, Jus concentré de datte, Farine de maïs modifiée, Farine de blé, Sel, Acide acétique, Farine de seigle, Assaisonnement, Epices

Tableau 14 : Composition de la sauce de tomates fraîches (Buitoni), un ketchup (Top Budget) et une sauce brune (Heinz).

1. Dosage de la glutamine libre dans notre échantillon de tomate fraîche

Avant de rechercher la présence de produits de Maillard issus de la glutamine dans la tomate chauffée, nous avons quantifié cet acide aminé dans la variété de tomate que nous avons sélectionnée. Pour ce faire, nous avons adapté le protocole d'extraction de (Valle*, et coll.*, 1998). La glutamine libre est extraite par 2 mL d'un mélange méthanol/chloroforme (1/1, v/v) pour 1 g de broyat de tomate homogène. Après centrifugation à 5000 g pendant 5 min, la phase méthanolique (phase supérieure) est analysée par HPLC couplée à une détection par fluorescence après une dérivation de la glutamine à l'OPA (voir la PARTIE II chapitre II : I ; p 92).

Le chromatogramme obtenu par analyse d'un extrait de tomate fraîche broyée est présenté dans la figure 29 (p 95). A l'aide d'une gamme étalon réalisée dans le méthanol, nous avons pu mesurer la teneur en glutamine libre dans notre échantillon de tomate. Nous observons 0,35 mg de glutamine par gramme de tomate fraîche. Cette valeur est très inférieure à la teneur de 2,7 mg/g énoncée par Pratta, *et coll.* (2004) qui ont pourtant utilisé le même type de protocole d'extraction. Cependant, la différence observée s'explique probablement par une différence de variété de tomate, dont une différence de pourcentage de matière sèche, entre les deux études.

Nous n'avons pas effectué de dosage de la glutamine dans les autres matrices « tomate » de cette étude. En effet il a déjà été montré que cet acide aminé ne résistait pas aux traitements thermiques mêmes modérés, et que, par conséquent, les produits alimentaires transformés en étaient dépourvus.

2. Protocole de traitement thermique des matrices « tomate » et d'extraction de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique

Trois grammes de tomate fraîche broyée ou de sauce tomate Buitoni sont placés dans un tube SVL en Pyrex. Préparés en triple exemplaire, les échantillons sont incubés en bain d'huile à 120°C ou à 180°C. Après incubation, les échantillons sont refroidis rapidement dans la glace.

Pour extraire les produits de Maillard hydrophiles, un millilitre d'eau est ajouté à 1 g de matière à analyser. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex à température ambiante puis centrifugé à 10 000 g pendant 15 min à 20°C. Le surnageant obtenu est filtré sur une membrane de porosité de 0,45 µm et 10 µL sont analysés par LC-MS-MS. Pour la sauce brune, une centrifugation d'une durée de 30 min est nécessaire pour séparer la phase aqueuse limpide des autres éléments en suspension.

Pour notre recherche, nous allons donc réaliser une analyse chromatographique des extraits de tomate en mode MS/MS. Nous isolerons les ions de rapport m/z 168 pour l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique, m/z 185 et 215 pour chaque poly-hydroxyalkyl-pyrazine puis nous les fragmenterons. Sur les chromatogrammes obtenus, nous regarderons les spectres MS^2 associés aux pics détectés. Ils constituent en effet une empreinte caractéristique de chaque molécule.

3. Recherche de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique

En comparaison avec le spectre MS^2 obtenu avec un standard pur d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique (voir figure 48 B), nous verrons si cette pyridine se forme dans la tomate. Il est important de préciser qu'entre chaque série d'analyses, le temps de rétention de ce standard a varié entre 6 et 8 min. Nous attribuons cette différence à un possible vieillissement de la colonne HPLC.

a. Tomate fraîche

Dans un premier temps, nous souhaitons vérifier que l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique n'est pas présent dans une tomate fraîche. L'analyse LC-MS-MS d'un extrait de tomate crue fraîche est donc présentée dans la figure 91 A avec le spectre MS/MS associé au pic chromatographique observé (figure 91 B).

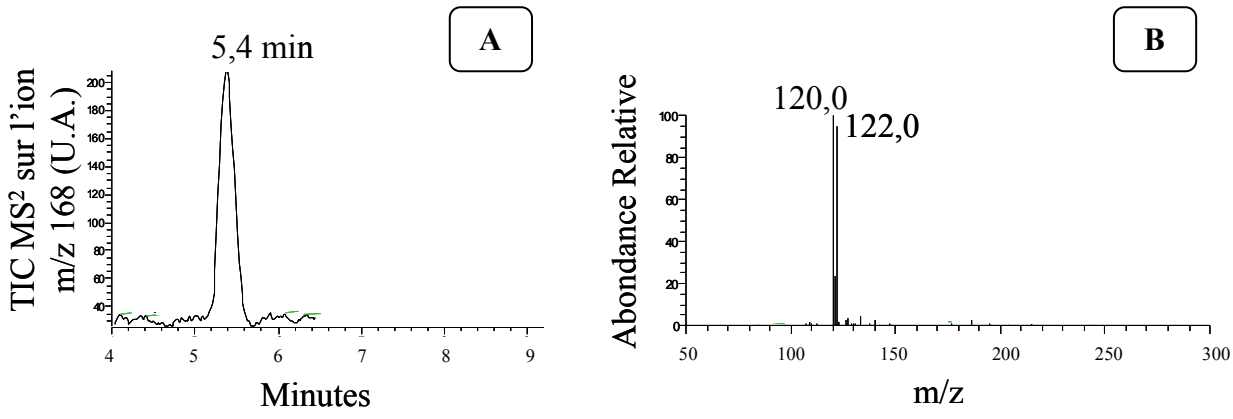


Figure 91 : A - Analyse chromatographique (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de tomate crue fraîche. B - Spectre MS^2 correspondant au pic chromatographique à 5,4 minutes.

Après analyse MS/MS sur l'ion m/z 168, nous observons un pic chromatographique avec un temps de rétention de 5,4 min (figure 91 A). Cependant, ce pic est associé à un spectre MS/MS (figure 91 B) qui ne correspond pas à la signature spectrale de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. Cette observation nous servira de contrôle pour les extraits de tomate auxquels nous aurons fait subir différents traitements thermiques.

Après vérification de l'absence d'acide hydroxy-diméthylnicotinique dans une tomate crue, nous allons rechercher cette pyridine dans la tomate fraîche chauffée pendant 2 h à 120°C et 10 min à 180°C. Les résultats des analyses chromatographiques réalisées en LC-MS-MS sont présentés sur la figure 92 A & C, pour les températures respectives de 120°C et 180°C.

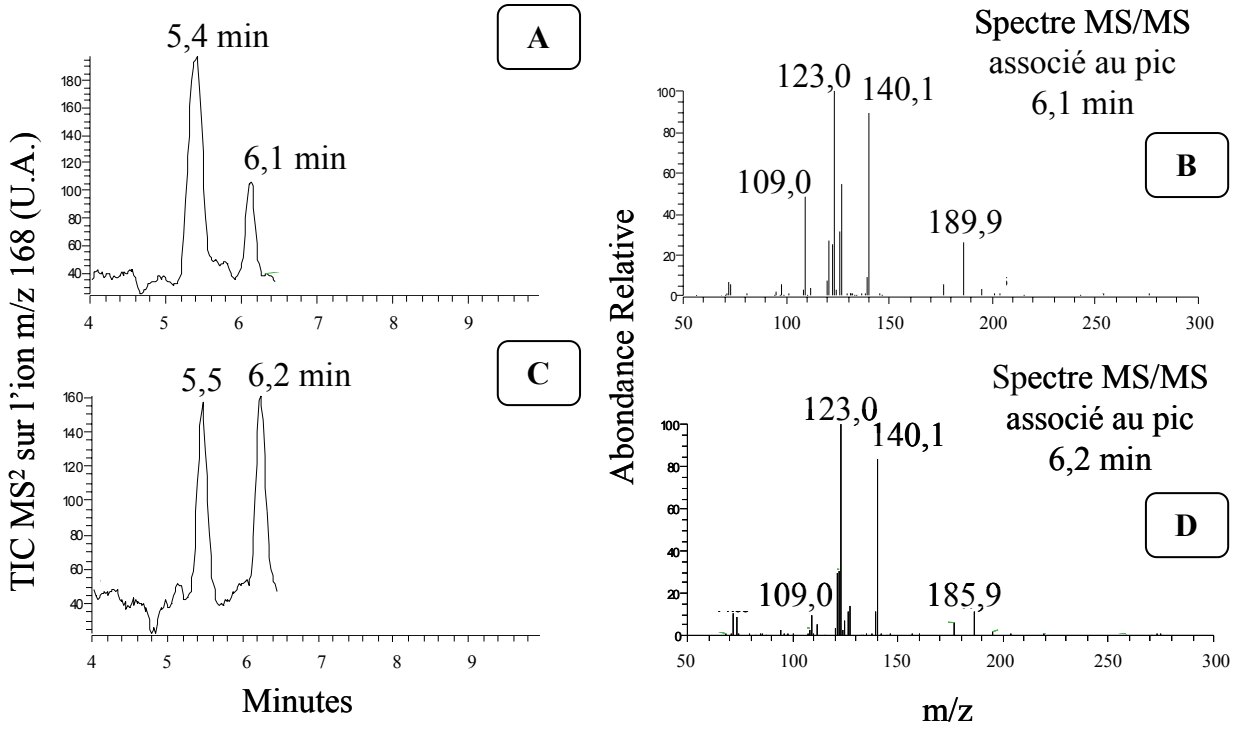


Figure 92 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 2 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 6,1 min (B) et 10 min à 180°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 6,2 min (D).

Après un chauffage à 120°C, nous voyons apparaître un pic chromatographique à un temps de rétention de 6,1 min (figure 92 A). La formation de la molécule qui est éluée à ce temps de rétention semble dépendante de la température de traitement puisque nous observons une augmentation de son abondance relative à 180°C (figure 92 C). Enfin, ce temps de rétention correspond parfaitement à celui d'un standard d'acide hydroxy-diméthylnicotinique (voir figure 42 B). Malgré ces observations, le spectre MS/MS associé à ce pic (figure 92 B & D) ne correspond pas à celui de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique ce qui infirme la présence de cette molécule dans la tomate chauffée selon nos conditions. Notons que nous observons à nouveau le pic à 5,4 min, identifié dans la tomate crue.

b. Sauce tomate de marque Buitoni

Cette sauce tomate du commerce a nécessairement subi un traitement thermique. Nous verrons donc si ce traitement a entraîné la formation de la pyridine recherchée (figure 93).

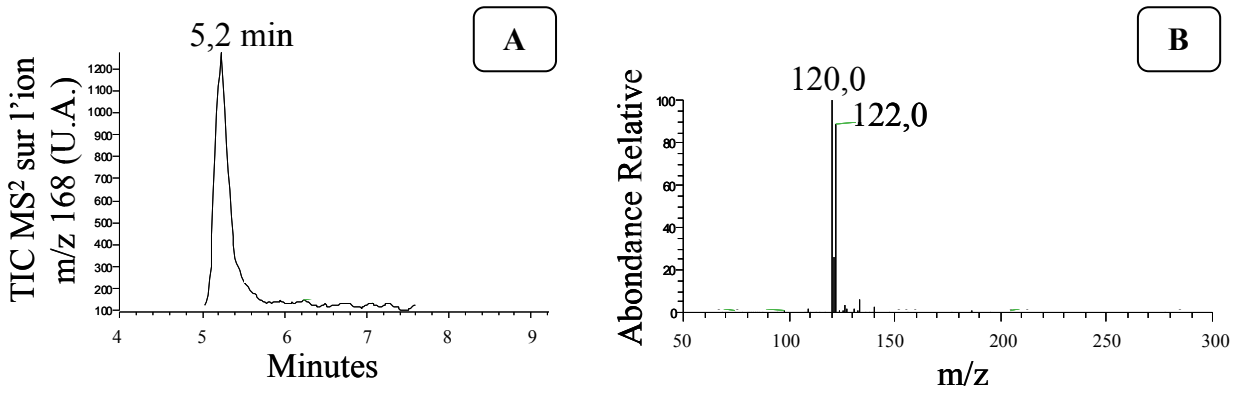


Figure 93 : A - Analyse chromatographique (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de sauce Buitoni. B - Spectre MS^2 correspondant au pic chromatographique à 5,2 minutes.

Le spectre MS/MS associé au pic chromatographique détecté à 5,2 min n'est pas l'empreinte de celui de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique. Par contre, elle correspond à la signature spectrale de la molécule détectée au même temps de rétention dans la tomate fraîche, crue ou chauffée.

La sauce tomate du commerce est généralement réchauffée par les consommateurs. Il est donc intéressant de rechercher la présence de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique dans cette sauce tomate après traitement thermique à 120°C pendant 1 h (figure 94).

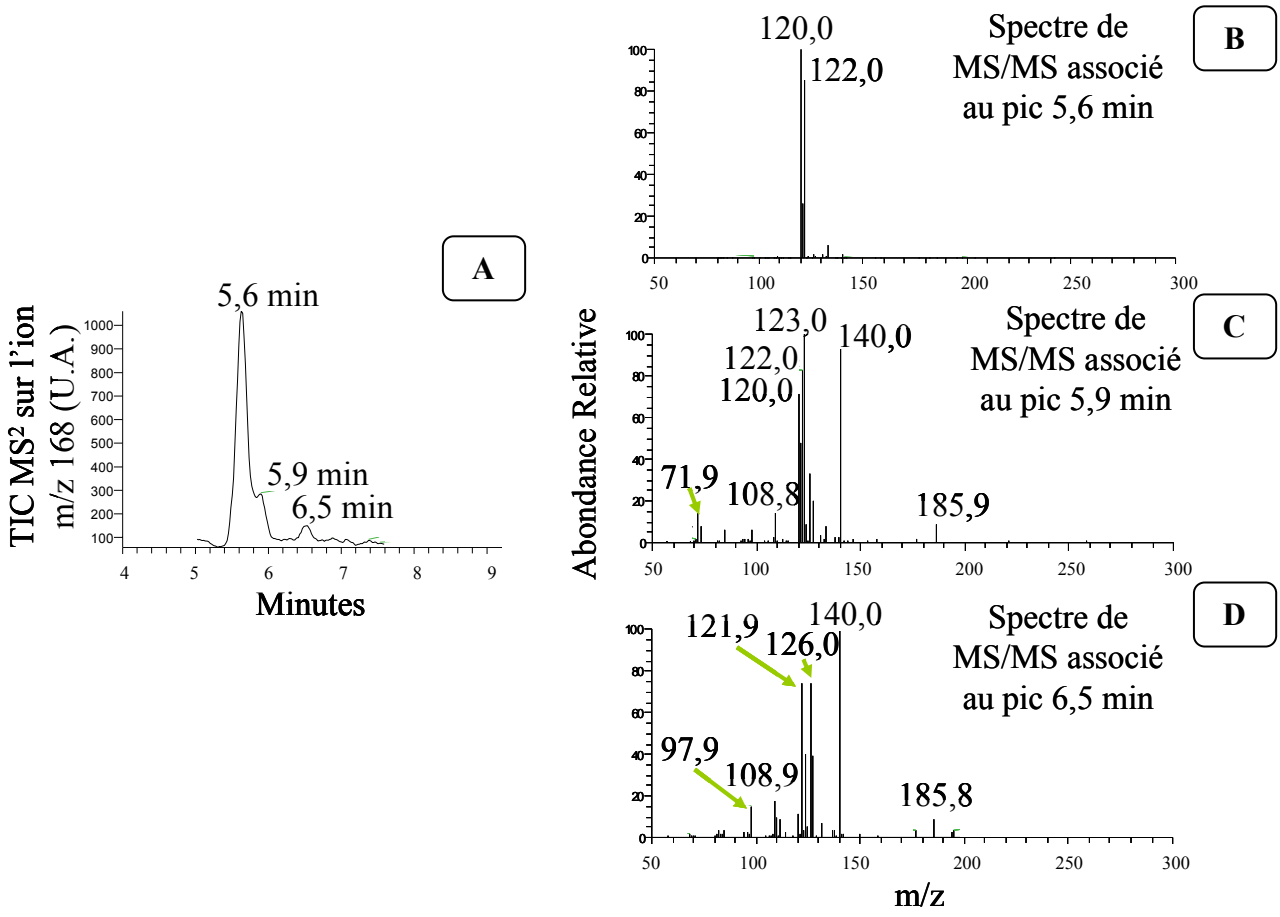


Figure 94 : Analyse chromatographique (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de sauce tomate Buitoni chauffée 1 h à 120°C (A). Spectres MS^2 associés aux pics chromatographiques à 5,6 min (B), à 5,9 min (C) et à 6,5 min (D).

Nous observons à nouveau le pic à 5,6 min donnant les fragments caractéristiques de 120 et 122 (m/z). Par ailleurs, nous remarquons la formation de deux autres pics à 5,9 et 6,5 min. Celui à 6,5 min fait apparaître des fragments identiques à ceux que nous observons à partir de la tomate fraîche chauffée (3 fragments majoritaires de m/z = 108, 123 et 140). Cependant ces fragments ne correspondent pas à ceux de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique. Nous pouvons donc conclure que, selon nos conditions de chauffage, d'extraction et d'analyse, cette pyridine n'est pas détectée dans la sauce tomate chauffée, qu'elle soit fraîche ou du commerce.

c. Sauce brune et ketchup

Nous avons enfin recherché cette molécule dans des sauces à base de tomate mais de composition plus complexe : une sauce brune de marque Heinz et une sauce ketchup de marque Top Budget.

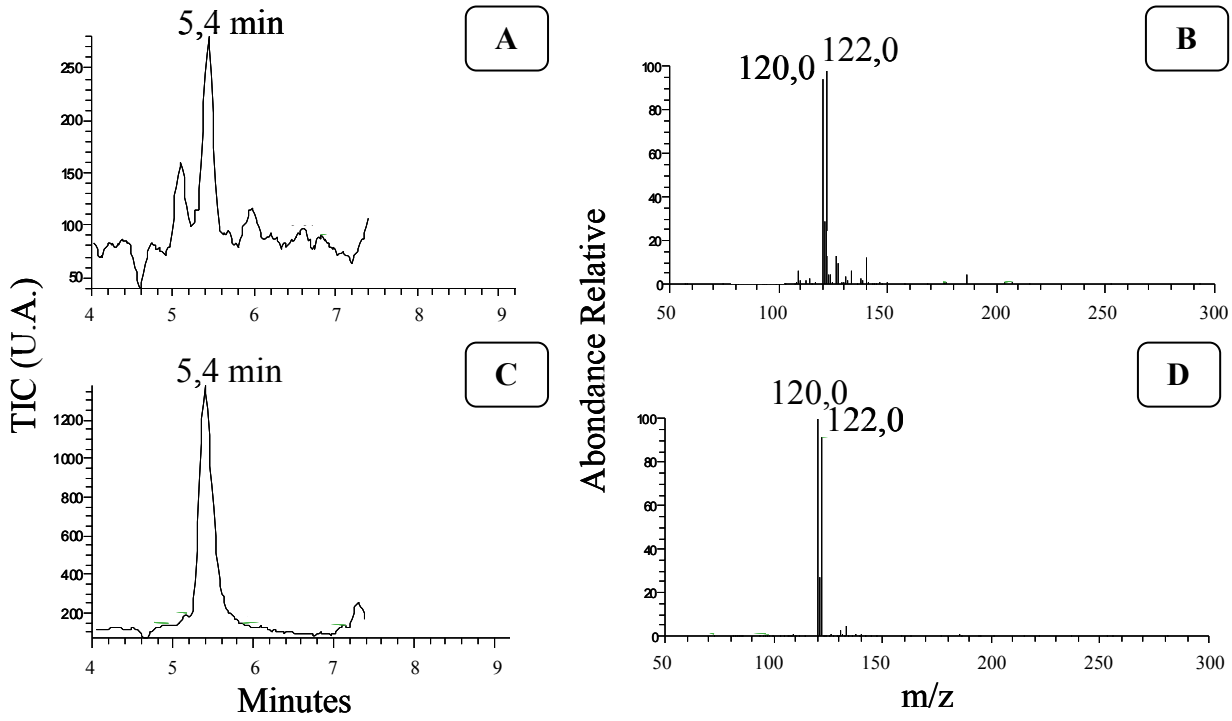


Figure 95 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 168) d'un extrait de sauce brune Heinz (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 5,4 min (B) et d'un extrait de ketchup (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 5,4 min (D).

Nous suspectons que ces sauces sucrées à base de tomate soient potentiellement riches en produits de Maillard puisqu'elles contiennent une forte teneur en sucres réducteurs (principal substrat de la réaction de Maillard) et subissent un traitement thermique. Néanmoins, les résultats de la figure 95 ne révèlent pas la présence d'acide hydroxy-diméthylnicotinique. En recherchant les ions de m/z 168, nous ne retrouvons que la molécule, non identifiée, éluée à 5,4 min.

Dans ces mêmes matrices alimentaires, nous tenterons d'identifier les autres produits de Maillard qui nous intéressent dans cette thèse, les poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

d. Ajouts de glutamine/ammoniac/méthylglyoxal dans la tomate fraîche

La non-détection d'acide hydroxy-diméthylnicotinique dans la tomate et quelques produits dérivés nous conduit à réaliser des ajouts de glutamine (ou d'ammoniac) ou de méthylglyoxal dans la tomate fraîche. Cette expérience nous permettra de savoir **1 -** si cette pyridine peut se former dans une matrice alimentaire telle que la tomate lorsque les deux substrats sont présents (ajout de glutamine ou d'ammoniac et de méthylglyoxal), **2 -** si un ajout de méthylglyoxal permet de former l'acide hydroxy-diméthylnicotinique avec la glutamine initialement présente dans la tomate (ou l'ammoniac issu de la dégradation de cette dernière et d'autres acides aminés), et à l'inverse **3 -** si la glutamine est le facteur limitant pour cette réaction dans une matrice « tomate ».

A partir de 3 g de tomate fraîche broyée, nous avons préparé les échantillons suivants en triple exemplaire dans des tubes SVL de 10 mL (Pyrex) :

- Tomate seule
- Tomate + Gln
- Tomate + NH_3
- Tomate + MG
- Tomate + Gln + MG
- Tomate + NH_3 + MG

Ces échantillons sont ensuite chauffés à 120°C pendant 1 heure. L'extraction est identique à celle décrite dans le paragraphe 2 (p 225).

Dans la variété 'Caimanta', Pratta, *et coll.* (2004) trouvent une concentration en glutamine égale à 2,7 mg/g de tomate fraîche. Pour augmenter nos chances de former notre molécule, nous avons effectué des ajouts en glutamine 10 fois supérieurs à la quantité que l'on peut rencontrer dans la tomate. Pour les incubations, nous ajoutons à 3 g de tomate fraîche 20 mg de glutamine /g. Afin d'ajouter la même quantité molaire d'ammoniac et deux fois plus de moles de méthylglyoxal, nous convertissons les ajouts en nombre de mol.

La figure 96 montre les analyses chromatographiques d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C additionnée de glutamine et de méthylglyoxal (A) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique détecté au temps de rétention de 6,8 min (B) et additionnée d'ammoniac et de méthylglyoxal (C) avec le spectre MS^2 associé à la molécule éluée aussi à 6,8 min (D).

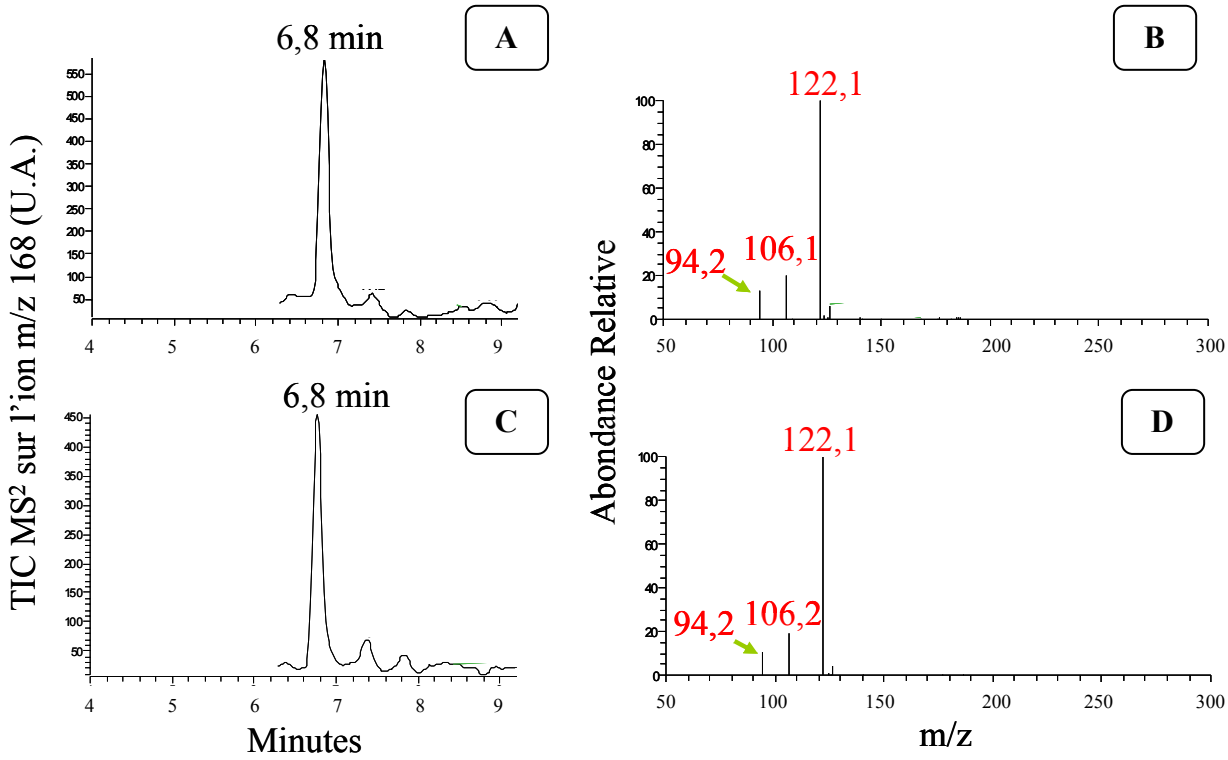


Figure 96 : Analyse chromatographique d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C en présence de glutamine et de méthylglyoxal (A) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique avec un t_r de 6,8 min (B) et en présence d'ammoniac et de méthylglyoxal (C) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique avec un t_r de 6,8 min (D).

Nous observons un ion de masse 167 élué à 6,8 min aussi bien avec l'ajout de Gln+MG que de NH_3+MG (figure 96 A & C). Cet ion est associé aux spectres MS^2 présentés sur la figure 96 B pour l'ajout de glutamine et sur la figure 96 D pour l'ajout d'ammoniac. Ces deux spectres correspondent à celui d'un standard d'acide hydroxy-diméthylnicotinique (figure 48, p 140) avec les mêmes fragments dans les mêmes proportions (m/z 122 ; 106 et 94 indiqués en rouge sur les spectres).

Nous pouvons donc conclure que les conditions physico-chimiques (pH, activité d'eau, force ionique…) d'une matrice alimentaire telle que la tomate permetteent la formation de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique. Une question se pose à présent : les précurseurs de la formation de cette pyridine (glutamine et méthylglyoxal) sont-ils présents en concentration suffisante dans la tomate soumise à un traitement thermique ?

Pour y répondre, nous allons analyser les résultats chromatographiques obtenus avec les échantillons de tomate fraîche incubée soit avec de la glutamine (ou ammoniac) soit avec du méthylglyoxal.

La figure 97 A présente le chromatogramme obtenu à partir de l'analyse par LC-MS-MS d'un extrait de tomate fraîche incubée avec de la glutamine avec le spectre MS^2 correspondant à l'ion de m/z 168 au temps de rétention de 6,9 min (figure 97 B). La figure 97 C montre le même type d'analyse réalisée à partir d'un extrait de tomate fraîche incubée avec de l'ammoniac avec le spectre MS^2 de l'ion de m/z 168 au temps de rétention de 6,7 min (figure 97 D). Précisons que l'ion de m/z 168 le plus abondant, qui est détecté avec un temps de rétention entre 8 et 9 min, ne correspond pas à la pyridine recherchée.

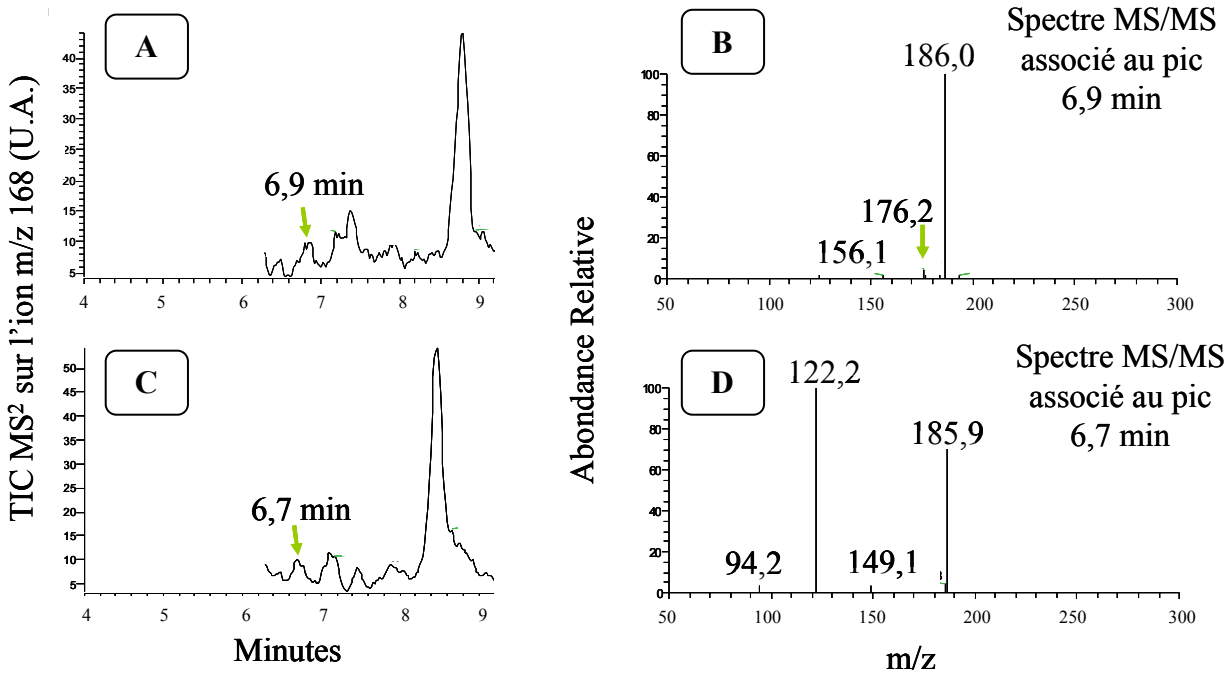


Figure 97 : Analyse chromatographique d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C en présence de glutamine (A) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique à 6,9 min (B) et en présence d'ammoniac (C) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique à 6,7 min (D).

L'ajout de glutamine ou d'ammoniac dans un broyat de tomate fraîche n'entraîne pas la formation d'acide hydroxy-diméthylnicotinique. En supposant que des composés α-dicarbonylés se forment au cours du traitement thermique de la tomate broyée, nous pouvons conclure que la production de méthylglyoxal est trop faible pour former une quantité détectable de pyridine, ou qu'il réagit préférentiellement avec d'autres amines du milieu réactionnel.

Si nous considérons maintenant que le facteur limitant de la synthèse d'acide hydroxy-diméthylnicotinique est la faible concentration de méthylglyoxal dans la tomate chauffée, nous allons analyser les résultats d'ajout de méthylglyoxal.

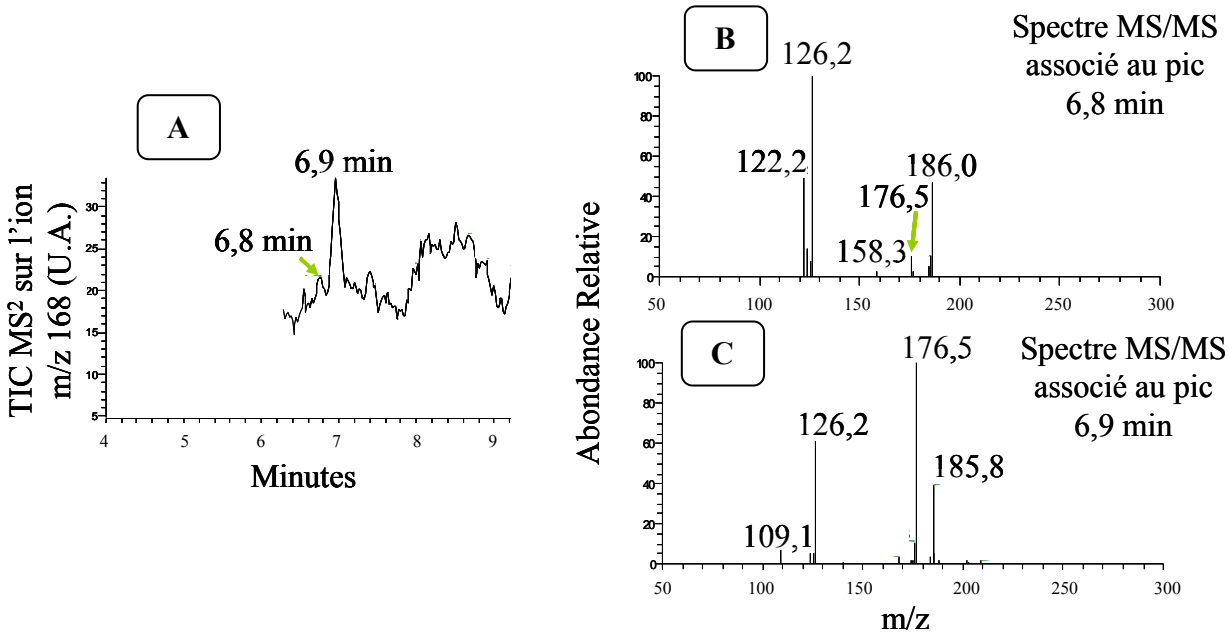


Figure 98 : Analyse chromatographique d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C en présence de méthylglyoxal (A) avec le spectre MS^2 associé aux pics chromatographiques à 6,8 min (B) et à 6,9 min (C).

L'ajout de méthylglyoxal dans une tomate broyée ne permet pas la synthèse d'acide hydroxy-diméthylnicotinique (figure 98). Cela signifie que la concentration de glutamine dans ce fruit (0,3 mg/g) n'est pas suffisante pour détecter le produit de Maillard recherché.

Ces différents ajouts indiquent que, dans cette variété de tomate, l'acide hydroxy-diméthylnicotinique ne se forme pas. La faible concentration de ses deux précurseurs principaux, mais aussi la probable compétition entre le méthylglyoxal et le glucose semblent constituer autant de raisons qui désavantagent la formation de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique. Précisons enfin que la tomate contient une concentration d'hexose environ mille fois supérieure à celle du méthylglyoxal. Loiudice*, et coll.* (1995) ont mesuré 2,6 mg de glucose et de fructose dans 100 g de jus de tomate fraîche (variété San Marzano) alors que Hayashi et Shibamoto (1985) n'ont détecté que 6,4 µg de méthylglyoxal/100 mL de jus de tomate d'origine non précisée. Ainsi, la compétition que nous avons déjà identifiée dans des modèles simples entre deux concentrations équimolaires de glucose et de méthylglyoxal (chapitre II : II.9 ; p 182) ne peut être que fortement amplifiée dans une matrice alimentaire telle que la tomate.

e. Ajouts de glutamine et de méthylglyoxal dans la sauce Buitoni

Comme précédemment, dans le cas de la tomate chauffée, nous avons réalisé des ajouts de glutamine, de méthylglyoxal et des deux substrats combinés dans la sauce. Les quantités ajoutées sont identiques à celles employées pour l'essai sur la tomate fraîche.

L'analyse chromatographique d'un extrait de sauce Buitoni chauffée en présence de glutamine 1 h à 120°C ne révèle pas la présence d'acide hydroxy-diméthylnicotinique. Ce résultat est identique à celui que nous avions observé avec l'ajout de glutamine dans la tomate fraîche. Par contre, les ajouts de méthylglyoxal, et à fortiori de glutamine/méthylglyoxal entraînent la formation de la pyridine recherchée (figure 99). Ces observations prouvent que **1 -** la formation d'acide hydroxy-diméthylnicotinique est possible dans une matrice alimentaire telle que la sauce Buitoni, **2 -** que l'absence ou la faible réactivité du méthylglyoxal est ici le facteur limitant de la réaction, et que **3 -** dans cette même sauce tomate, il existe une source d'ammoniac différente de la glutamine ou plus importante que celle présente dans la tomate fraîche. Ne connaissant ni le procédé exact de fabrication ni la composition précise des ingrédients pour cette sauce, il est impossible de connaître l'origine de l'ammoniac qui participe à la formation d'acide hydroxy-diméthylnicotinique lorsque du méthylglyoxal est ajouté.

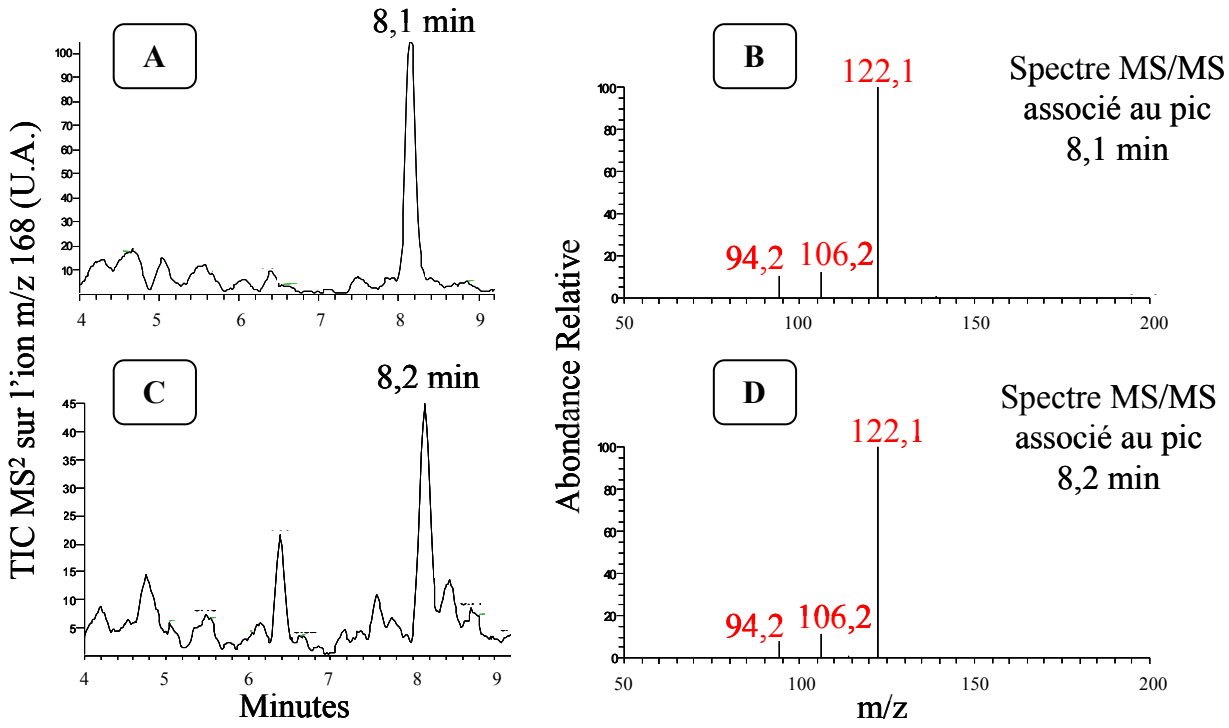


Figure 99 : Analyses chromatographiques d'un extrait de sauce Buitoni chauffée 1 h à 120°C en présence de glutamine et de méthylglyoxal (A) avec le spectre MS^2 associé au pic chromatographique à 8,1 min (B) et en présence de méthylglyoxal (C) avec le spectre MS^2 correspondant au pic chromatographique à 8,2 min (D).

4. Recherche des poly-hydroxyalkyl-pyrazines

Les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines qui nous intéressent n'ont été détectées que dans la sauce de soja (Tsuchida, *et coll.*, 1990), les cacahuètes grillées (Magaletta & Ho, 1996 ; Magaletta, *et coll.*, 1996) et le caramel commercial (Tsuchida, *et coll.*, 1986 ; Patey, *et coll.*, 1987). Nous allons les rechercher dans la tomate et dans les différentes sauces analysées dans l'étude précédente.

a. Tomate fraîche

Après avoir vérifié que la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine n'était pas présente dans la tomate crue, nous avons recherché sa formation dans des extraits de tomate fraîche chauffée pendant 1 et 2 h à 120°C (figure 100 A & C).

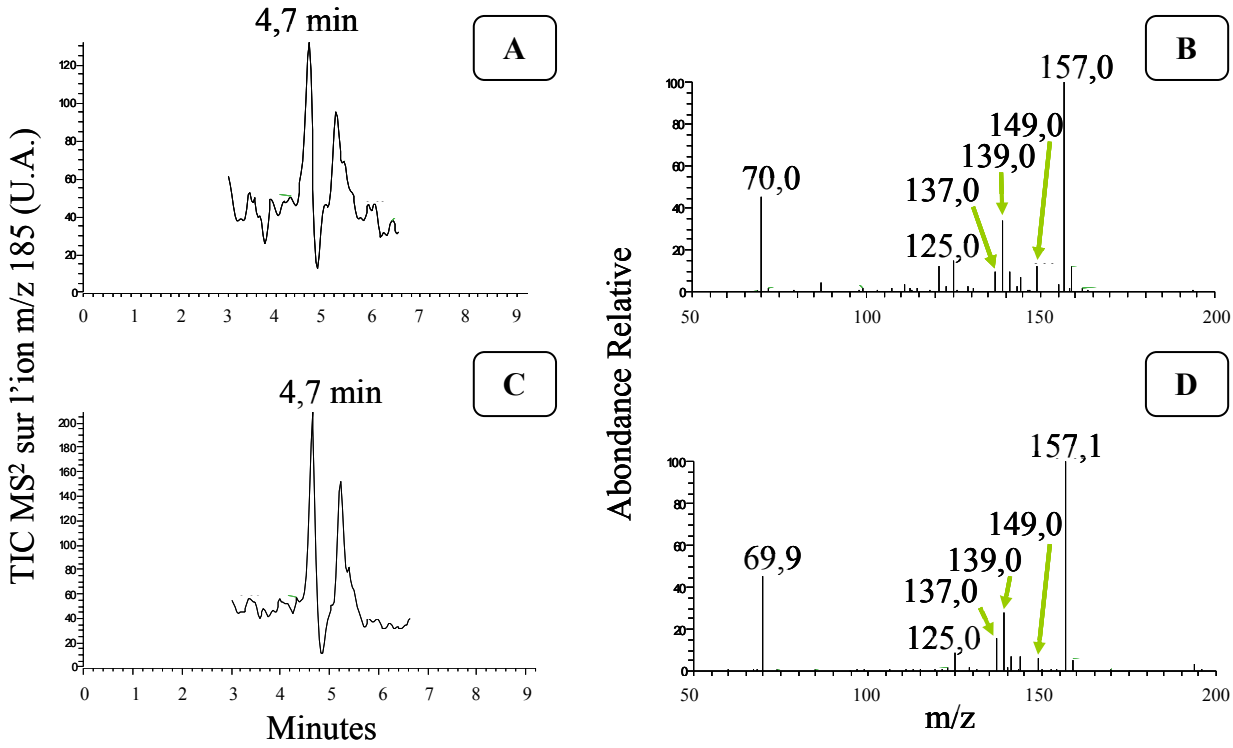


Figure 100 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 185) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,7 min (B) et 2 h à 120°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,7 min (D).

Sur les spectres MS/MS, nous recherchons les fragments 149, 131, 121 et 107 qui sont caractéristiques de l'ion m/z 185 (figure 74 A, p 191). Dans les deux échantillons de tomate chauffée à 120°C, nous observons le même pic chromatographique au temps de rétention de 4,7 min. Les spectres MS^2 associés à ce pic sont identiques quelle que soit la durée du traitement thermique. Nous remarquons un fragment de m/z égale à 149. La faible intensité de ce fragment et l'absence d'autres fragments caractéristiques de la trihydroxybutyl-pyrazine

permettent de conclure que cette pyrazine ne se forme pas dans un broyat de tomate lorsqu'il est chauffé dans ces conditions.

Nous avons tenté d'identifier la seconde pyrazine dans ces mêmes extraits (figure 101). Les fragments suivants ont alors été recherchés : 179, 161, 151 et 137 (figure 74 B). Dans les deux extraits, nous observons un pic chromatographique au temps de rétention de 5,2 min. Mais les spectres MS^2 associés à ces deux pics ne correspondent toujours pas à ce que nous attendons pour cette pyrazine.

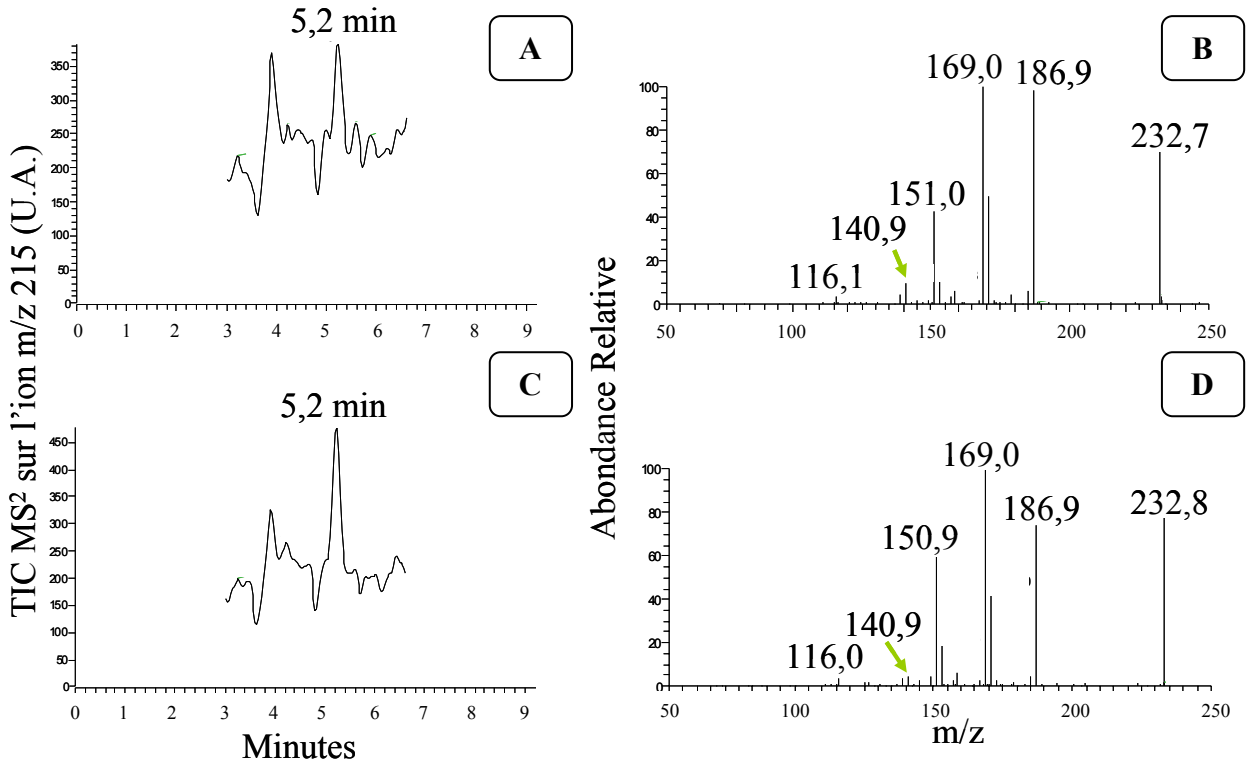


Figure 101 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 215) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 1 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 5,2 min (B) et 2 h à 120°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 5,2 min (D).

Cependant, nous avons observé que la formation de ces pyrazines était plus rapide à forte température (180°C) comparée à une température plus modérée de 120°C (voir chapitre III : VI.2 ; p 210). Nous avons donc incubé le même broyat de tomate fraîche pendant 10 min à 180°C. Le chromatogramme et le spectre MS^2 associé au pic qui apparaît à 4,3 min,

indiquent qu'à cette température, la trihydroxybutyl-pyrazine se forme dans la tomate (figure 102 A & B). Pour confirmer cette observation, nous avons réalisé une incubation en présence de glucose. Nous avons ajouté une quantité de glucose trois fois supérieure à la quantité décrite dans la variété San Marzano par Loiudice, *et coll.* (1995).

L'augmentation de l'aire du pic chromatographique de temps de rétention 4,3 et la confirmation de l'empreinte spectacle en MS^2 (figure 102 C & D) permet de certifier la présence de trihydroxybutyl-pyrazine dans une tomate fraîche chauffée à 180°C.

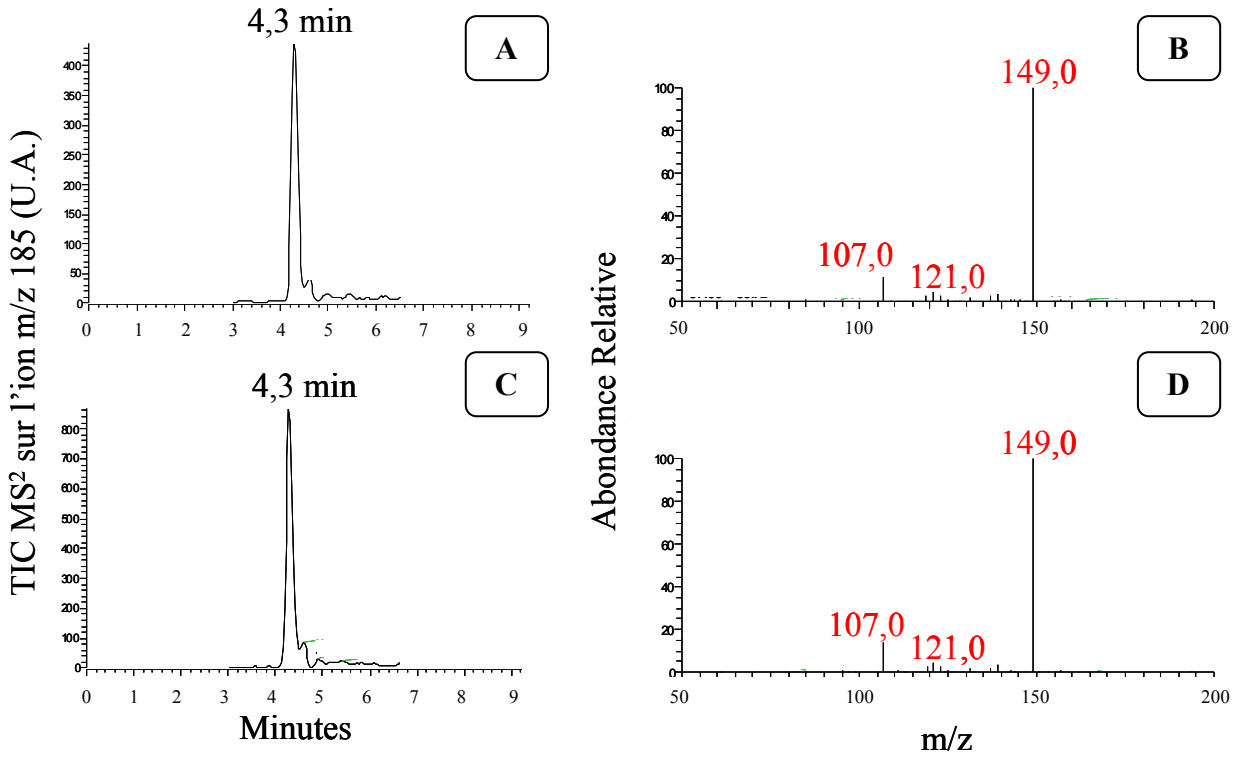


Figure 102 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 185) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 10 min à 180°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (B) et 10 min à 180°C avec un ajout de glucose (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (D).

Nous avons également cherché à identifier la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine dans les deux extraits de tomate chauffée à haute température. De même que pour la trihydroxybutyl-pyrazine, nous obtenons un pic chromatographique au temps de rétention de

4,3 min (figure 103 A). Le spectre MS^2 correspondant (figure 103 B) est constitué de fragments caractéristiques des ions fils attendus pour la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine et indiqués en rouge sur le spectre. Enfin, l'ajout de glucose confirme la présence de cette pyrazine puisque l'intensité de son pic chromatographique est encore augmentée dans ce cas.

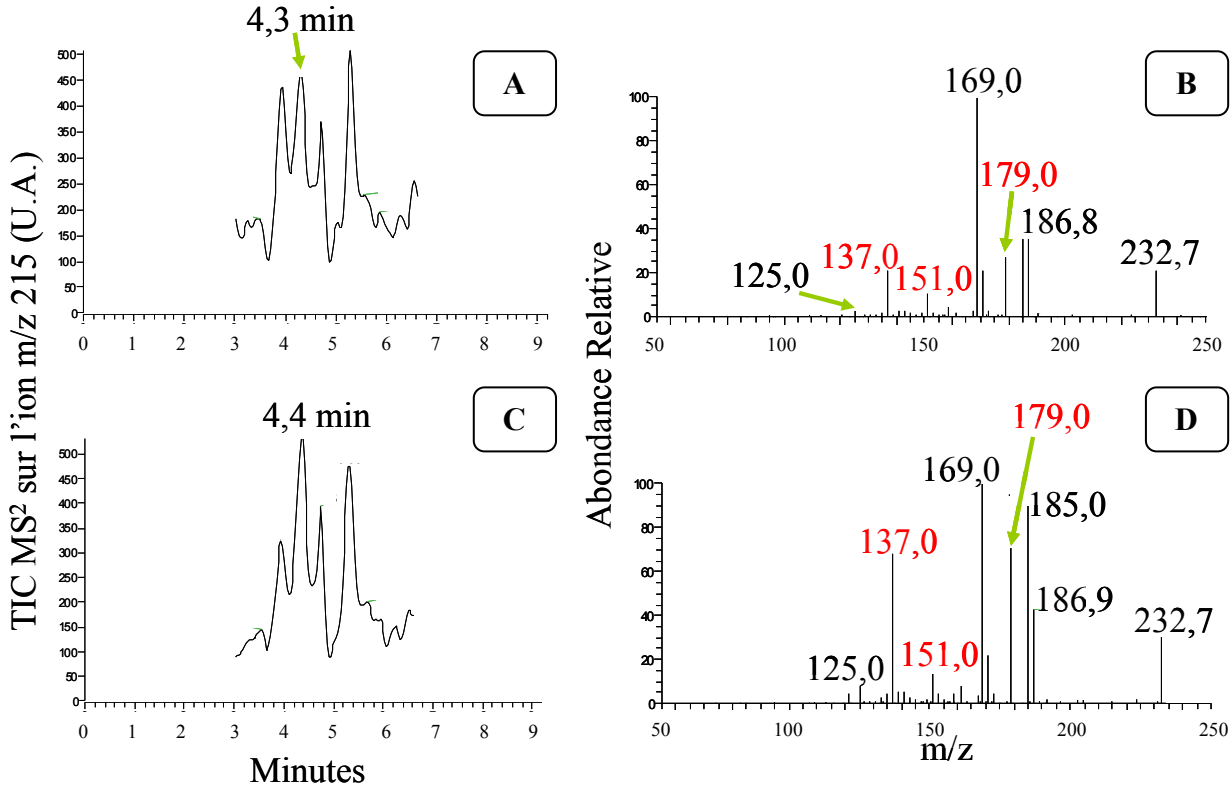


Figure 103 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 215) d'un extrait de tomate fraîche chauffée 10 min à 180°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (B) et 10 min à 180°C avec un ajout de glucose (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (D).

En conclusion, il semble qu'il faille une température élevée associée à un temps de chauffage relativement court (chapitre III : VI.2 ; p 210) pour détecter les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines aussi bien dans les modèles simples que dans une matrice plus complexe telle que la tomate.

b. Sauce Buitoni

La sauce Buitoni est une sauce commerciale préparée avec du sucre. Il est donc raisonnable de penser que les deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines pourraient être présentes dans cette sauce commerciale sans traitement domestique préalable. Cependant, l'analyse LC-MS-MS ne révèle aucune poly-hydroxyalkyl-pyrazine dans la sauce Buitoni (figure 104).

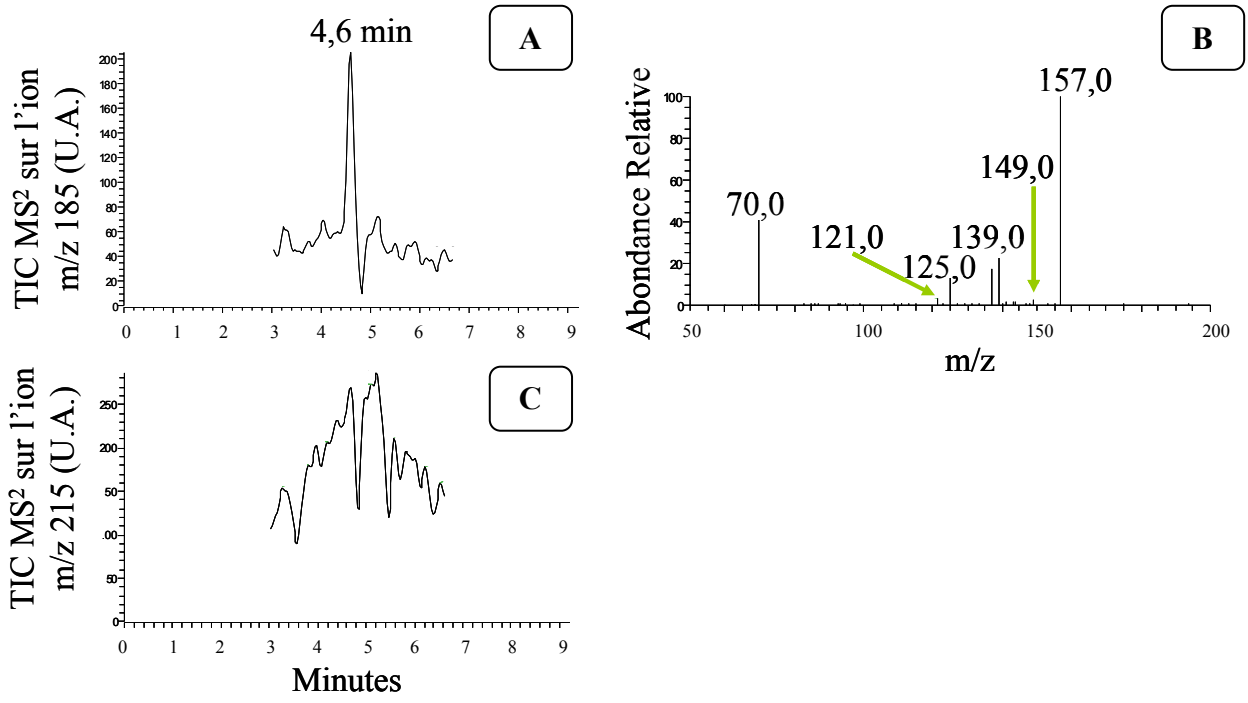


Figure 104 : Analyse chromatographique d'un extrait de sauce Buitoni non chauffée avec LC-MS-MS sur l'ion m/z 185 (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,6 min (B) et m/z 215 (C).

En absence de poly-hydroxyalkyl-pyrazines dans la sauce tomate du commerce, nous l'avons chauffé pendant 1 h et 2 h à 120°C, et avons recherché la présence ce ces deux produits de Maillard (figure 105 & figure 106).

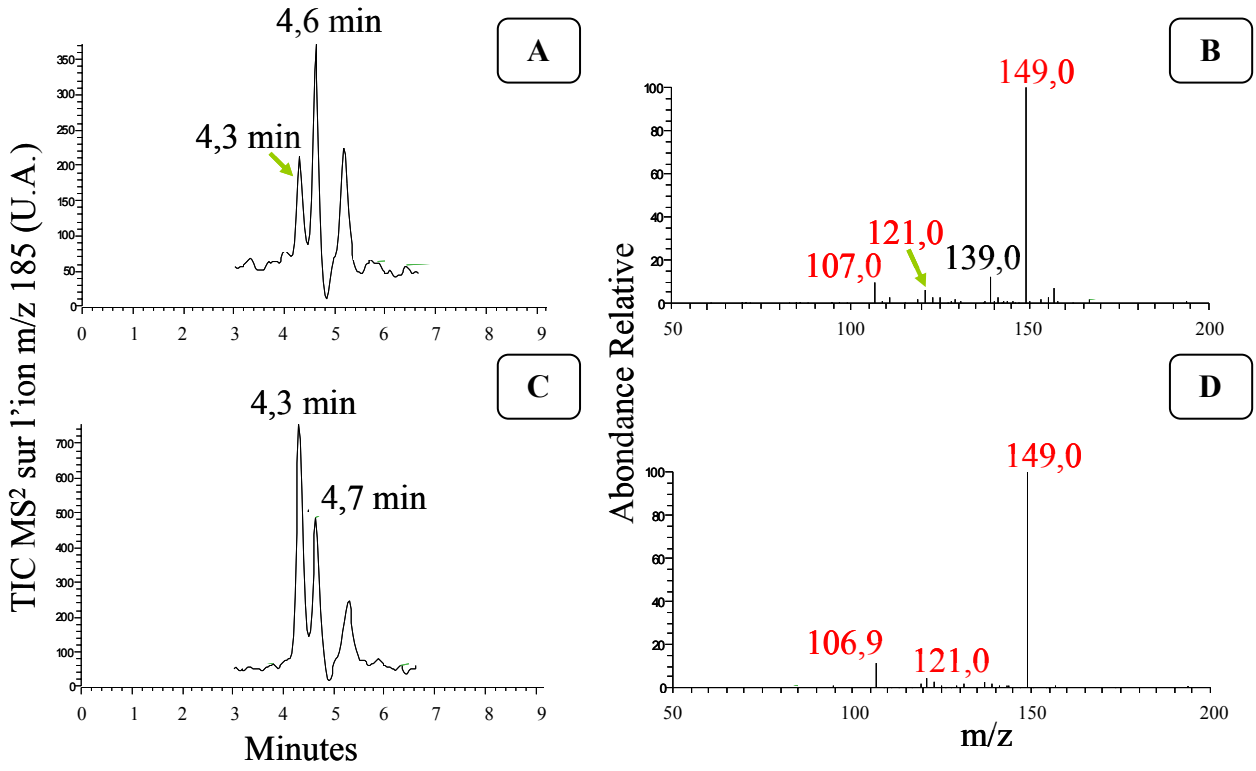


Figure 105 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 185) d'un extrait de sauce Buitoni chauffée 1 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (B) et 2 h à 120°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,3 min (D).

Le chauffage de cette sauce à 120°C a permis de détecter la présence de la trihydroxybutyl-pyrazine. En effet, nous observons l'apparition d'un pic chromatographique à 4,3 min (figure 105 A & C) dont le spectre MS^2 correspond au profil attendu. De plus, nous constatons que l'aire du pic augmente avec la durée du chauffage. Ceci confirme que la synthèse de la trihydroxybutyl-pyrazine est dépendante de la durée de chauffage dans nos conditions. Enfin, contrairement au broyat de tomate fraîche, la trihydroxybutyl-pyrazine peut être formée dès 120°C dans une sauce commerciale. L'ajout de sucre dans cette sauce rend plus probable une formation de produits de Maillard, cela a d'ailleurs été montré avec un ajout de glucose à la tomate fraîche (p 240). La présence supposée d'une source plus importante d'ammoniac est aussi probablement à l'origine de la différence observée.

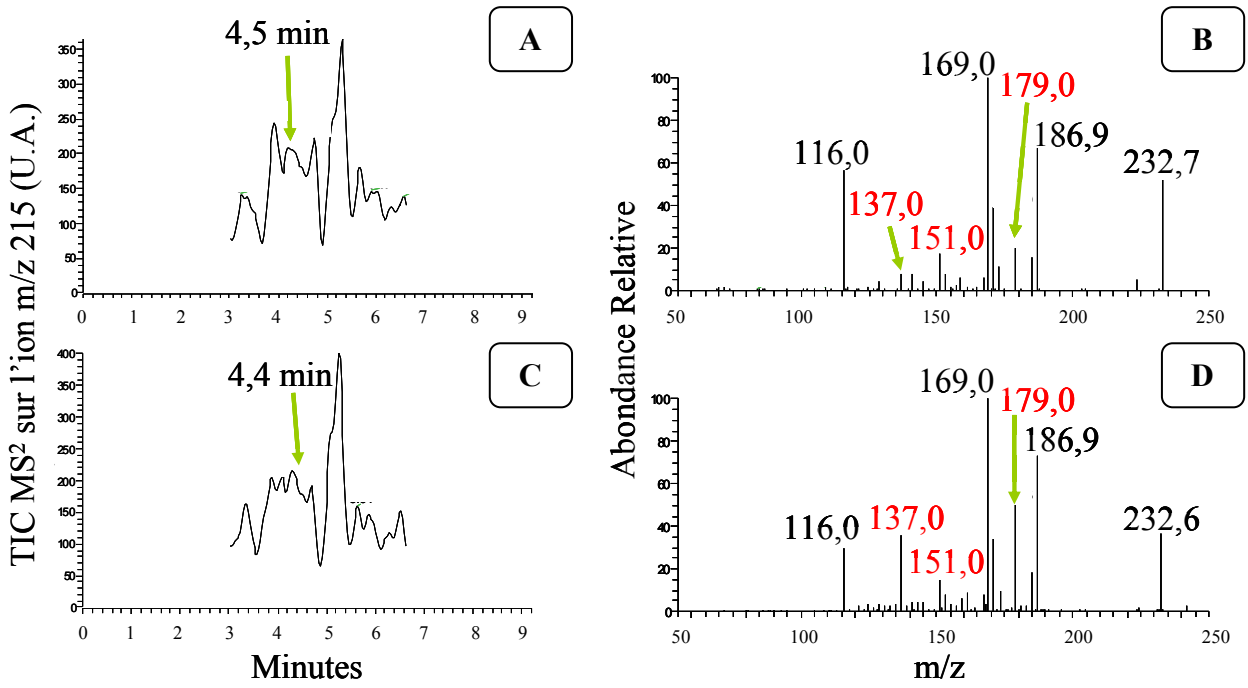


Figure 106 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 215) d'un extrait de sauce Buitoni chauffée 1 h à 120°C (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,5 min (B) et 2 h à 120°C (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,4 min (D).

Il est plus difficile de détecter la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine dans les extraits de sauce Buitoni chauffée de 1 à 2 h à 120°C. En effet, nous n'observons pas de pic bien distinct (figure 106 A & C). Cependant, si nous regardons le spectre MS^2 dans la zone de rétention de cette pyrazine (entre 4,2 et 4,6 min), nous obtenons les ions fils m/z 179 ; 151 et 137 qui correspondent à trois des quatre fragments que nous attendons pour cette pyrazine (figure 106 B & D). De plus, en augmentant la durée du chauffage, ces trois ions fils augmentent en abondance et se dégagent du bruit de fond formé par les autres ions présents dans la zone d'élution.

La faible détection de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine par HPLC-MS-MS s'explique probablement par une mauvaise chromatographie de cette molécule. En effet, en raison d'une mauvaise efficacité de la colonne, une rétention trop étalée dans le temps entraîne un élargissement du pic chromatographique. Il serait souhaitable d'optimiser la résolution de la chromatographie (efficacité, sélectivité et facteur de capacité) pour baisser le seuil de détection de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine dans des matrices complexes.

c. Sauce brune et ketchup

Comme dans la sauce Buitoni, la sauce brune et le ketchup contiennent du sucre. De plus, il semble que la sauce brune en est particulièrement riche puisque c'est le premier ingrédient cité dans sa composition.

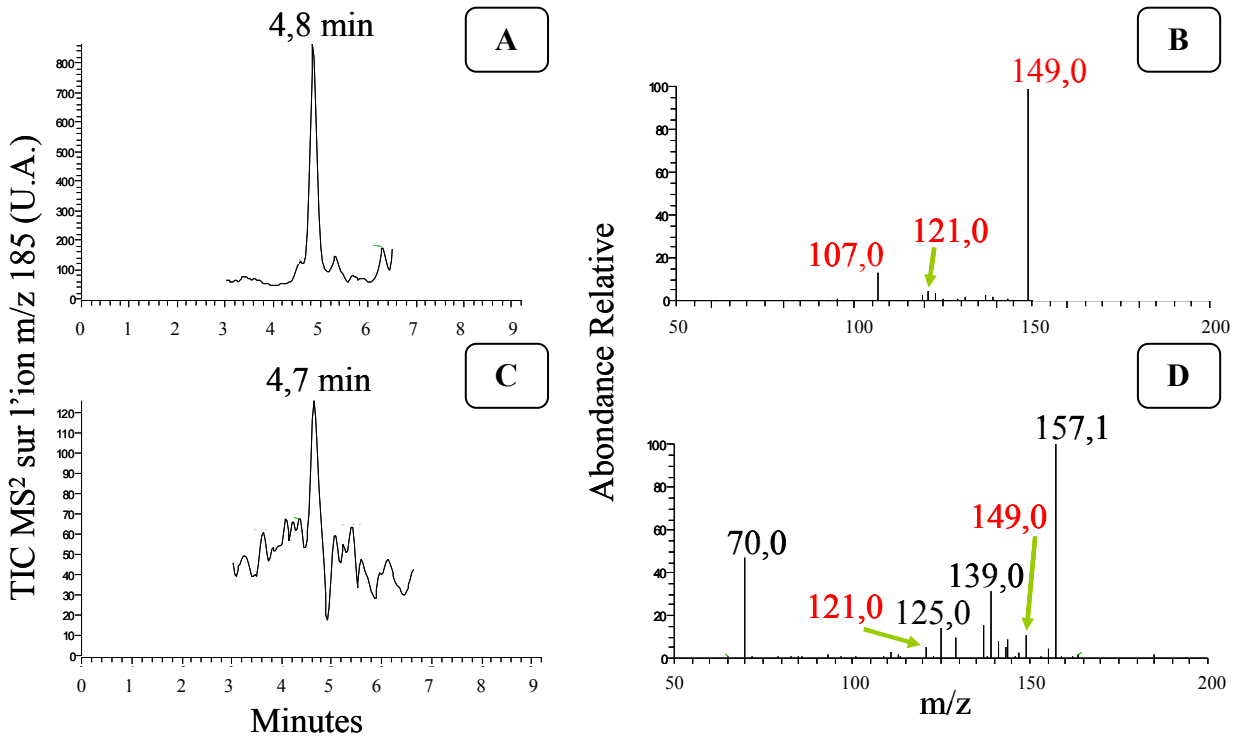


Figure 107 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 185) d'un extrait de sauce brune (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,8 min (B) et de ketchup (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,7 min (D).

Dans l'extrait de sauce brune, nous détectons un ion de m/z 185 élué à 4,8 min dont le spectre MS/MS correspond au profil du spectre MS/MS de la trihydroxybutyl-pyrazine (figure 107 A & B). En revanche dans l'extrait de ketchup, la détection n'est pas aussi aisée. En effet, nous observons un pic à 4,7 min dont le spectre MS/MS ne permet pas d'identifier avec certitude la présence de trihydroxybutyl-pyrazine (figure 107 D). Nous ne détectons que deux ions (m/z 149 et 121) parmi les trois fragments attendus pour cette pyrazine.

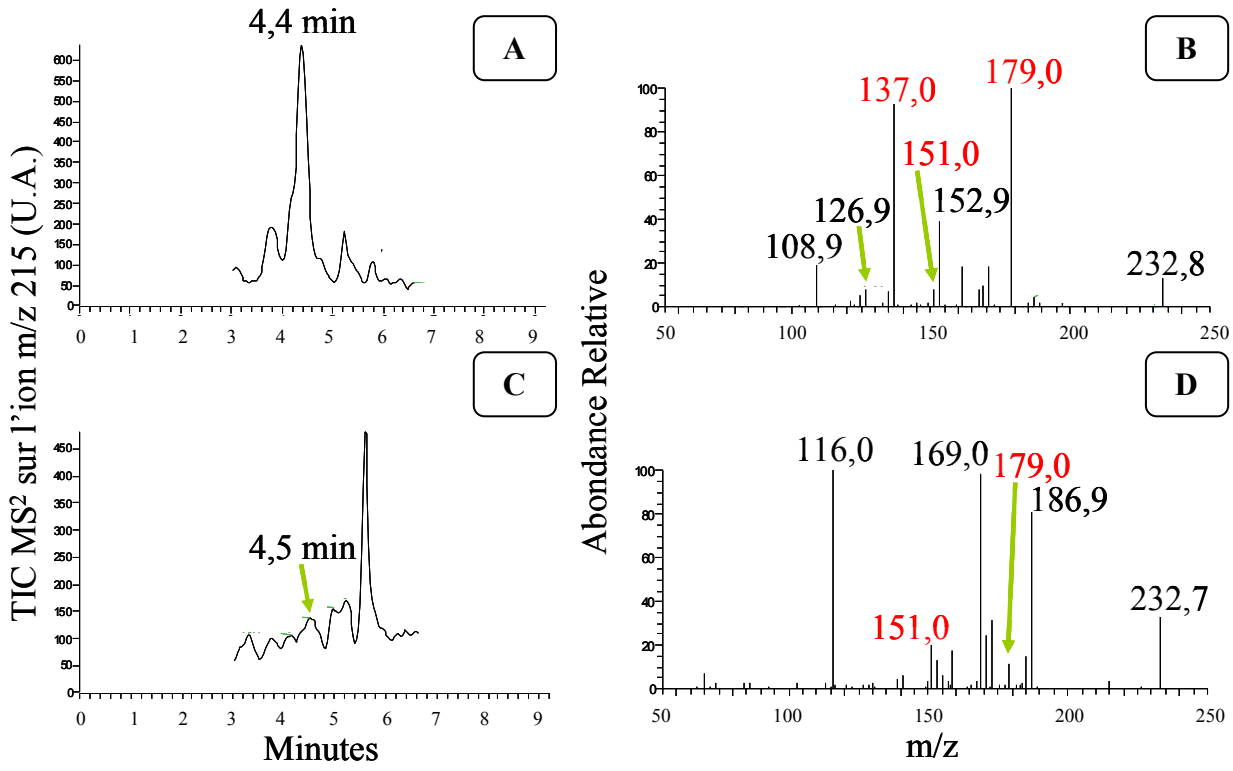


Figure 108 : Analyses chromatographiques (LC-MS-MS sur l'ion m/z 215) d'un extrait de sauce brune (A) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,4 min (B) et de ketchup (C) avec le spectre MS^2 associé au pic à 4,5 min (D).

Dans l'extrait de sauce brune, nous détectons également la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine qui est éluée à 4,4 min, et qui est caractérisée par le spectre MS/MS présenté dans la figure 108 B. Dans ce spectre, nous observons à nouveau trois des quatre ions fils attendus pour la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine.

Dans l'extrait de ketchup, il est difficile de détecter la présence de méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine. En effet, au temps de rétention attendu, nous obtenons un spectre MS/MS (figure 108 D) dans lequel nous retrouvons les ions m/z 179 et 151. Mais ces ions, caractéristiques de la pyridine recherchée, ne sont pas présents dans les proportions attendues (l'ion m/z 179 devrait être plus abondant que l'ion m/z 151) et se trouvent parmi d'autres ions beaucoup plus abondants.

II. LES BISCUITS

Les biscuits sont généralement préparés avec un agent levant. Dans l'industrie alimentaire, deux poudres levantes sont communément utilisées : l'hydrogénocarbonate d'ammonium et l'hydrogénocarbonate de sodium. Sous l'effet de la chaleur et de l'humidité, ces composés dégagent du dioxyde de carbone qui fait lever la pâte (voir PARTIE I chapitre III : IV.2.e ; p 75). L'hydrogénocarbonate de sodium est généralement associé à un acide, de type acide citrique qui neutralise le milieu lorsque la réaction débute. Hormis le dégagement gazeux, l'hydrogénocarbonate d'ammonium libère de l'ammoniac sous forme gazeuse. Nous faisons l'hypothèse que l'ammoniac libéré peut alors participer à la réaction de Maillard et générer les produits que nous avons étudiés dans cette thèse comme cela a été montré pour la formation d'acrylamide (Becalski*, et coll.*, 2003 ; Yasuhara*, et coll.*, 2003).

Nous allons donc rechercher la présence d'acide hydroxy-diméthylnicotinique, de trihydroxybutyl-pyrazine et de méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine dans des biscuits du commerce ainsi que dans des biscuits modèles.

1. Protocole d'extraction

Pour l'extraction des deux hydroxy-polyalkyl-pyrazines, nous avons adapté un protocole d'extraction d'un autre produit de Maillard, l'HMF (Ait-Ameur*, et coll.*, 2007). Nous ajoutons 5 mL d'acide trichloroacétique 40% à 5 g de biscuit finement broyé. Le volume est ajusté à 25 mL avec de l'eau UHQ. Le mélange est agité 5 min à l'aide d'un vortex puis centrifugé pendant 10 min à 4 000 g. Le surnageant est filtré sur une membrane en nylon de porosité de 0,45 µm et 10 µL sont analysés par LC-MS-MS. Pour certains biscuits, une délipidation par extraction à l'hexane est nécessaire. Pour cela, 600 µL d'hexane sont ajouté à 1 mL de surnageant. Après agitation et centrifugation (10 min à 5 000 g), la phase inférieure (phase aqueuse) est filtrée comme précédemment et analysée par LC-MS-MS.

2. Biscuits du commerce

Nous avons tout d'abord recherché la présence d'acide hydroxy-diméthylnicotinique et de poly-hydroxyalkyl-pyrazines dans des biscuits du commerce qui sont répertoriés dans le tableau 15. Huit de ces biscuits contiennent de l'hydrogénocarbonate d'ammonium et sont donc susceptibles de contenir les produits de Maillard que nous recherchons. Les trois autres n'ont pas d'hydrogénocarbonate d'ammonium dans leur composition, et seront utilisés comme témoin négatif. En effet, le taux de glutamine est faible dans les céréales (tableau 2 ; p 63). Précisons que nous n'avons aucune indication sur la teneur en poudre levante dans les biscuits que nous avons sélectionnés.

		Nom	Marque	Composition
Avec NH_4HCO_3	1	Galettes	Top Budget	Farine de blé/sucre/huile de palme/sirop de sucre inverti/$NaHCO_3$+**NH_4HCO_3**
	2	Petit Déjeuner Miel	LU	Céréales 58,5%/Farine de blé 21,5%/Sucre/Matière grasse végétale/Miel 5%/Sirop de glucose-fructose/$NaHCO_3$+**NH_4HCO_3**
	3	Nonnettes	Painsol	Farine de blé/sucre inverti liquide/sucre/miel 0,5%/$NaHCO_3$(E500)+**NH_4HCO_3**(E503)
	4	Oreo	Nabisco	Sucre/farine de blé/graisse végétale/sirop de glucose-fructose/$NaHCO_3$+**NH_4HCO_3**
	5	Sprits	Brink	Farine de froment/graisses végétales/sucre/amidon de blé/**NH_4HCO_3**
	6	Petit Beurre	LU	Farine de blé 72,5%/sucre/beurre frais 13%/$NaHCO_3$+**NH_4HCO_3**
	7	Galettes bretonnes	Chabrior	Farine de blé/sucre/beurre concentré 18,4%/orthophosphate monocalcique+$NaHCO_3$+**NH_4HCO_3**
	8	Taillefine Equilibre	LU	Farine de blé 52,5%/sucre/matière grasse végétale (colza, palme, palmiste)/beurre concentré 18,4%/diphosphate disodique+$NaHCO_3$+**NH_4HCO_3**
Sans NH_4HCO_3	9	Pain d'épices	Brossard	Sirop de glucose-fructose/farine de seigle/miel 11%/diphosphate disodique+$NaHCO_3$
	10	Palets bretons	Chabrior	Farine de blé/beurre patissier 30%/sucre/diphosphate disodique+$NaHCO_3$
	11	Original Sprits	Delacre	Farine de froment/sucre/graisse végétale/beurre patissier/diphosphate disodique+$NaHCO_3$

Tableau 15 : Liste des biscuits du commerce testés avec leur composition.

L'analyse LC-MS-MS des biscuits a permis de détecter la trihydroxybutyl-pyrazine avec une bonne résolution. Par contre, l'identification de la méthyl-tétrahydroxybutyl-pyrazine est incertaine. En effet une mauvaise résolution associée à une faible concentration de cette pyrazine dans les biscuits, rend l'intégration des pics chromatographiques impossible. Enfin l'acide hydroxy-diméthylnicotinique, issu d'une réaction de Maillard entre l'ammoniac et le méthylglyoxal, n'a été détecté dans aucun biscuit du commerce. Nous pensions pourtant que les deux biscuits qui contiennent du miel (biscuits n° 2 et 3 du tableau 15) seraient relativement riches en méthylglyoxal (Mavric*, et coll.*, 2006). Même si le miel utilisé pour la fabrication de ces biscuits est potentiellement riche en méthylglyoxal (dicabonyle que nous n'avons pas dosé), ce dernier est probablement en compétition avec le glucose provenant de l'hydrolyse du saccharose et de l'amidon des produits céréaliers en nettement plus forte concentration que le méthylglyoxal. Cela conforte notre hypothèse selon laquelle une compétition, que nous avons déjà décrite dans nos modèles simples, empêcherait la formation de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique au profit des poly-hydroxyalkyl-pyrazines.

Nous allons donc nous concentrer sur l'identification de l'une d'entres elles, la trihydroxybutyl-pyrazine. Mais en absence de standard, nous ne présenterons les résultats qu'en quantité relative (figure 109).

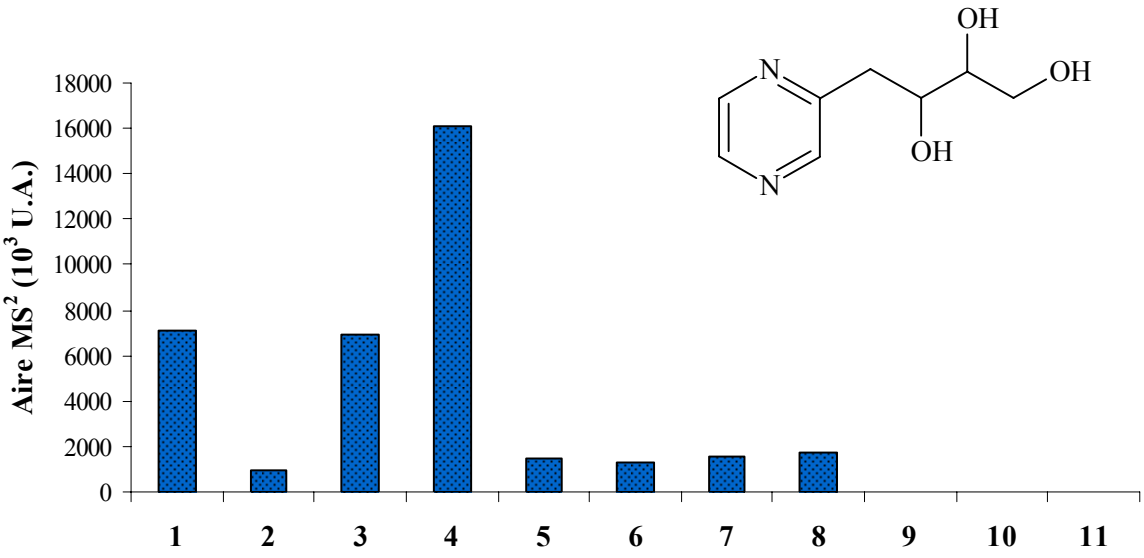


Figure 109 : Teneurs (unités relatives) en 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine dans des extraits de biscuits du commerce contenant de l'hydrogénocarbonate d'ammonium (1 à 8) et des biscuits n'en contenant pas (9 à 11).

Nous remarquons que les biscuits exempts de NH_4HCO_3 (figure 109 ; échantillons 9 à 11) ne contiennent pas de trihydroxybutyl-pyrazine. En revanche, la cuisson de biscuits préparés avec de l'hydrogénocarbonate d'ammonium conduit à la formation de cette pyrazine. Ce résultat montre que, dans ce modèle, l'amine est limitante. Les concentrations de trihydroxybutyl-pyrazine sont assez hétérogènes entre les biscuits. Cette forte disparité s'explique certainement par des différences de concentration en NH_4HCO_3 et en sucre dans la composition des biscuits, mais aussi par des différences de température et de durée de cuisson.

La trihydroxybutyl-pyrazine, que nous avons identifiée dans les biscuits du commerce, n'est probablement pas la seule poly-hydroxyalkyl-pyrazine à se former dans cette matrice alimentaire. La déoxyfructosazine et son 6-isomère (chapitre III : III.4 ; p 196) sont certainement deux autres pyrazines non volatiles qui peuvent être synthétisées dans les biscuits au cours de leur traitement thermique. C'est ainsi que nous avons recherché la présence de ces deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines dans les extraits de biscuits du commerce. Nous observons un pic chromatographique avec un temps de rétention de 2 min. En absence de standard de déoxyfructosazine ou de son 6-isomère, il est impossible de garantir son identité sur le chromatogramme. Cependant, une masse moléculaire de 305 ainsi qu'une élution logiquement plus rapide que la trihydroxybutyl-pyrazine (molécule théoriquement plus hydrophile que la trihydroxybutyl-pyrazine) permet de conforter notre identification.

Après intégration des pics et calcul des aires, nous observons des teneurs relatives plus ou moins fortes selon les biscuits contenant de l'hydrogénocarbonate d'ammonium (figure 110). Nous ne pouvons pas comparé les aires relatives entre la déoxyfructosazine ou de son 6-isomère et la trihydroxybutyl-pyrazine. En revanche, nous remarquons que le profil de formation des deux composés n'est pas semblable. Enfin, aucune déoxyfructosazine (ou 6-isomère) n'est détectée dans les biscuits exempts de NH_4HCO_3.

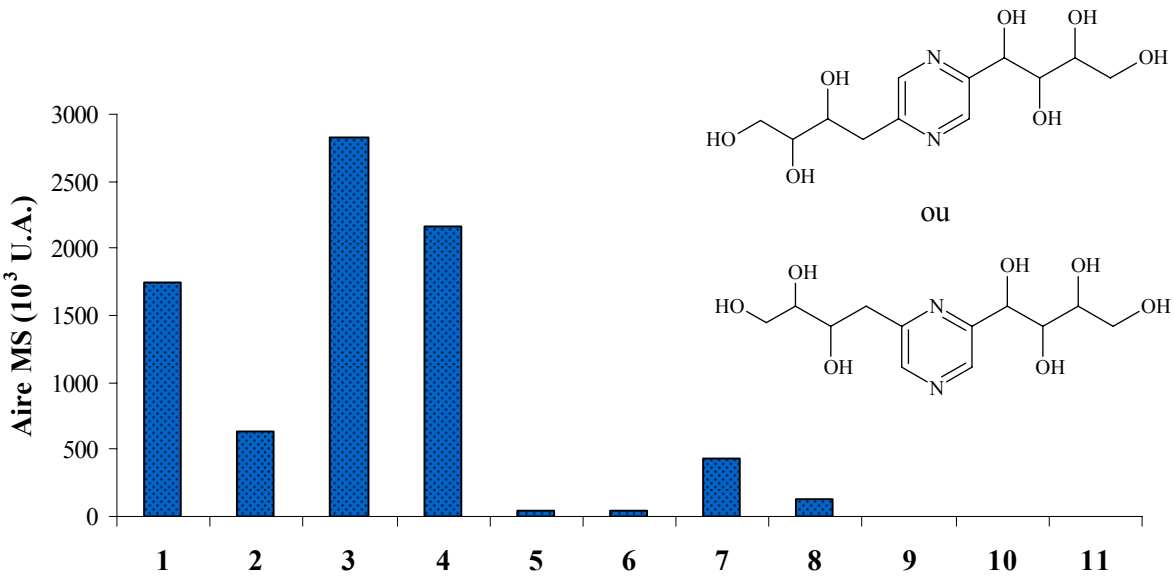


Figure 110 : Teneurs (unités relatives) en déoxyfructosazine (et son 6-isomère) dans des extraits de biscuits du commerce contenant de l'hydrogénocarbonate d'ammonium (1 à 8) et des biscuits n'en contenant pas (9 à 11).

3. Des biscuits modèles

Dans le cadre du projet européen ICARE (Impeding neoformed Constituants Accumulation to Reduce their health Effects), des biscuits ont été formulés par Mathilde Courel, Maître de conférence de l'AgroParisTech. Ils ont été préparés soit avec du glucose, soit avec du saccharose. Les premiers ont été cuits pendant 15 min à 230°C alors que les derniers ont été cuits de 15 à 22 min à la même température.

Après analyse LC-MS-MS, les résultats montrent que, à cette température de cuisson, l'origine du sucre n'a pas d'influence sur la formation de la trihydroxybutyl-pyrazine. A 15 min de cuisson, nous obtenons une aire de pic MS/MS de l'ion m/z 185 de 43.10^3 U.A. pour le glucose et de 44.10^3 U.A. pour le saccharose.

En revanche, le temps de cuisson affecte la teneur en poly-hydroxyalkyl-pyrazines (figure 111). En effet, nous observons une augmentation de la teneur en trihydroxybutyl-pyrazine en fonction du temps de cuisson. La concentration de déoxyfructosazine ou de son 6-isomère quant à elle augmente entre 15 et 16 min de cuisson, puis reste stable jusqu'à 22 min.

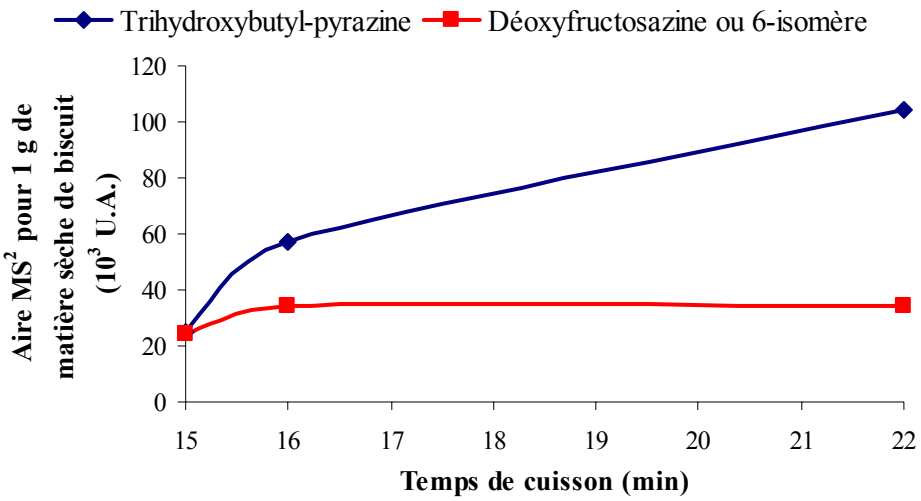


Figure 111 : Formation de la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine et de la déoxyfructosazine (ou son 6-isomère) dans des biscuits modèles en fonction du temps de cuisson.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

De nombreuses modifications chimiques ont lieu au cours de la cuisson des aliments. Ces changements sont largement associés à la réaction de Maillard qui implique une réaction entre des composés carbonylés et des amines. Les protéines des matrices alimentaires sont considérées comme étant la principale source d'amines impliquées dans la formation de composés de Maillard. Cependant, bien qu'en faible concentration, les acides aminés libres contribuent également à la formation de composés néoformés dont la présence a un rôle capital dans la qualité des aliments soumis à un traitement thermique. L'acrylamide formé à partir de l'asparagine et les composés aromatiques formés par la plupart des amines libres sont deux exemples d'acides aminés impliqués respectivement dans la formation de composés néoformés indésirables et désirables. Enfin, de nombreuses publications indiquent que la glutamine est l'un des acides aminés libres les plus abondants dans les aliments crus.

A partir de ce constat, il nous est apparu essentiel de rechercher quels pouvaient être les produits de Maillard formés à partir de la glutamine. Parmi les acides aminés libres des aliments, nous avons montré que la glutamine s'avérait être une source importante d'ammoniac. De plus, nos résultats montrent qu'en présence de méthylglyoxal, cet acide aminé est un important précurseur de la formation de pigments bruns et de fluorophores issus de la réaction de Maillard.

Ce travail préliminaire nous a conduit à étudier quatre produits de Maillard fluorescents formés dans des modèles simples de glutamine et de méthylglyoxal. Le principal fluorophore, responsable d'environ 75% de la fluorescence totale a été identifié par différentes techniques de chimie analytique dont la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire. Ces résultats révèlent la formation d'une pyridine appelée acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. Cette molécule, qui à notre connaissance n'a jamais été décrite en tant que produit de Maillard, est un composé non volatil issu de la réaction entre 3 molécules de méthylglyoxal et une molécule d'ammoniac dérivé de la glutamine.

Un suivi analytique de la concentration d'un standard pur d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique soumis à différents traitements thermiques pendant plusieurs jours a permis de mettre en évidence la forte stabilité de ce produit de Maillard en milieu aqueux. Nous pouvons donc supposer que cet acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique n'est pas un intermédiaire, mais plutôt un produit avancé de la réaction de Maillard de la famille des AGEs. Notons cependant qu'il reste à prouver la stabilité de cet acide hydroxy-diméthylnicotinique en présence d'hexoses et de composés dicarbonylés. Malgré une structure relativement stable et un atome d'azote non disponible (impliqué dans un cycle

pyridine), nous ne pouvons pas exclure une dégradation partielle de cette molécule par réaction de Maillard terminale qui participerait à la formation de mélanoïdines.

Par ailleurs, en se fondant sur les principaux mécanismes de dégradation des composés dicarbonylés ainsi que sur les mécanismes classiques de formation des produits de Maillard, nous avons pu proposer un mécanisme pour la synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. Celui-ci implique la dimérisation du méthylglyoxal, la double réaction nucléophile par l'ammoniac issu de la dégradation de la glutamine, l'élimination d'une molécule d'acide formique suivie d'un réarrangement oxydatif. Pour tenter de prouver ce mécanisme, différentes expériences sont encore à réaliser. Par exemple il serait souhaitable de reproduire la réaction de synthèse de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique en absence d'oxygène et après chélation des métaux de transition afin de vérifier l'importance d'un processus oxydatif. Enfin, à ce jour, nous ne pouvons expliquer la différence de formation de ce fluorophore observée entre la glutamine et l'ammoniac incubés en présence de méthylglyoxal. En effet, la formation prépondérante obtenue avec l'acide aminé ne peut s'expliquer par la présence de deux atomes d'azote dans sa structure chimique puisque nous avons prouvé la non-participation de l'α-amine dans la synthèse de l'acide hydroxy-diméthylnicotinique. Une deuxième hypothèse qui considérait que l'acide pyroglutamique formé au cours de la dégradation de la glutamine pouvait avoir un effet catalytique a également été rejetée. Il reste à supposer qu'un intermédiaire de dégradation de la glutamine en acide pyroglutamique puisse être le catalyseur recherché.

Grâce à sa forte stabilité et à sa synthèse possible dans des conditions classiques de traitement thermique des aliments, nous pouvons supposer que l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique se forme et s'accumule au cours de la cuisson des denrées alimentaires riches en glutamine ou autres précurseurs d'ammoniac. Cependant notre recherche dans la tomate et ses produits dérivés (fruit relativement riche en glutamine libre) ainsi que dans les biscuits riches en hydrogénocarbonate d'ammonium s'est révélée infructueuse. Avant de conclure définitivement sur l'absence de ce produit de Maillard dans les aliments, il serait important de poursuivre cette recherche : **1-** en optimisant et validant notre méthode d'extraction liquide-liquide (recherche de différents solvants, optimisation du pH et de la température d'extraction…), **2-** en recherchant l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique dans d'autres matrices alimentaires particulièrement riches en glutamine comme la viande et d'autres variétés de tomates, plus riches en glutamine que celle employée dans notre étude préliminaire. Cependant il faut admettre que la probabilité pour qu'un produit de Maillard soit issu de la liaison entre 3 molécules de méthylglyoxal sera plus faible que celle de la formation

d'un composé néoformé avec une seule ou deux molécules de méthyglyoxal. Précisons que pour conforter cette hypothèse, nous avons fait deux observations intéressantes : l'argpyrimidine (constituée d'arginine + 2 méthyglyoxal) n'a été détectée que dans une seule matrice alimentaire après plusieurs années de recherche (Glomb*, et coll.*, 2001) et Nemet & Varga-Defterdarovic semblent avoir détecté très récemment un produit de condensation entre le tryptophane et une seule molécule de méthylglyoxal (une β–carboline) dans une matrice alimentaire chauffée composée de sauce tomate du commerce (Nemet & Varga-Defterdarovic, 2007). Enfin, la faible concentration de méthylglyoxal dans les matrices alimentaires associée à la compétition avec le glucose rendrait la formation de l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique encore plus improbable. La présence de fortes concentrations de polyphénols tels que les catéchines dans les sauces tomates, pourrait également expliquer la faible implication du méthylglyoxal dans la réaction de Maillard et l'absence de détection d'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique. En effet, il a été montré que ces antioxydants pouvaient piéger le méthylglyoxal et, par conséquent, le rendre inactif (Lo*, et coll.*, 2006).

Si ce composé non volatil était finalement identifié dans une matrice alimentaire, il serait alors intéressant de poursuivre cette recherche pour caractériser son implication dans la qualité nutritionnelle et sanitaire des aliments. Une structure proche de la vitamine PP (ou acide nicotinique), ne permet pas de supposer que l'acide 5-hydroxy-2,6-diméthylnicotinique possède la même atoxicité. Il serait encore plus incertain d'affirmer que ce nouveau produit de Maillard possède les mêmes propriétés vitaminiques ou pharmacologiques que la vitamine PP. En effet, il a été montré qu'une simple substitution d'un radical hydroxyle par une fonction amine supprimait toute action hypolipémiante de l'acide nicotinique (Carlson, 2005). Enfin, une autre perspective importante de cette recherche serait d'identifier l'impact organoleptique de cet acide hydroxy-diméthylnicotinique.

En présence de glucose, la glutamine participe à d'autres réactions de Maillard. Dans ces conditions, nous avons identifié deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines : la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine et la 2-méthyl-5(ou6)-tétrahydroxybutylpyrazine. Ces poly-hydroxyalkyl-pyrazines ont été identifiées dans les années 1910, mais n'ont été que partiellement étudiées. Ce qui les distingue des principales pyrazines issues de la réaction de Maillard (les alkylpyrazines) est leur caractère hydrophile. Ainsi, contrairement aux pyrazines de faible poids moléculaire, les molécules que nous avons identifiées dans nos modèles

simples ne sont pas des substances aromatiques susceptibles d'apporter des arômes aux aliments. A l'inverse, si ces molécules contribuaient aux propriétés organoleptiques des aliments, ce serait en tant que saveurs présentes dans les matrices. Mais cette participation des poly-hydroxyalkyl-pyrazines à la saveur des aliments reste à prouver.

Nous avons, par ailleurs, vérifié deux hypothèses de formation de ces deux pyrazines. Contrairement aux alkylpyrazines, la participation de l'α-amine de la glutamine est négligeable et nous présumons que nos deux molécules sont exclusivement formées par l'ammoniac libéré par lactamisation (ou désamination cyclisante) de la glutamine. D'autres molécules génératrices d'ammoniac sont également identifiées comme précurseur de poly-hydroxyalkyl-pyrazines. Nous avons également montré que si les deux produits de Maillard pouvaient se former uniquement en présence d'hexose (glucose et fructose), des intermédiaires dicarbonylés (glyoxal et méthylglyoxal) pouvaient aussi contribuer à leur synthèse.

Nos analyses alimentaires révèlent pour la première fois que la 2-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine et la 2-méthyl-5(ou6)-tétrahydroxybutylpyrazine, précédemment détectées dans seulement trois matrices alimentaires, le caramel commercial (Tsuchida*, et coll.*, 1986), la sauce de soja (Tsuchida*, et coll.*, 1990) et les cacahuètes grillées (Tsuchida*, et coll.*, 1990 ; Magaletta*, et coll.*, 1996), sont aussi formées lors du traitement thermique de différents produits dérivés de la tomate (broyats de tomates fraîches et sauces tomate du commerce). Enfin, nous avons détecté la trihydroxybutyl-pyrazine dans des biscuits riches en hydrogénocarbonate d'ammonium. Hélas, l'absence de standard commercial ne nous permet pas d'obtenir des valeurs quantitatives des poly-hydroxyalkyl-pyrazines dans les aliments testés.

Après la découverte des poly-hydroxyalkyl-pyrazines dans des aliments de consommation courante, il apparaît fondamental de poursuivre cette étude par un screening dans une plus grande variété de matrices alimentaires. Il est aussi important d'engager une recherche approfondie sur les effets métaboliques et cytotoxiques de ces molécules. Cependant, au regard de la littérature, nous pouvons suspecter que les poly-hydroxyalkyl-pyrazines étudiées dans cette thèse ne possèdent par de propriétés toxiques. En effet, les alkylpyrazines sont décrites comme n'étant pas toxiques. Il est donc fort probable que des pyrazines substituées avec des groupements hydroxy-alkyles le soient encore moins. La découverte d'actions pharmacologiques de fortes doses de poly-hydroxyalkyl-pyrazines pour

lutter contre certaines maladies dégénératives, établie une preuve supplémentaire de la non toxicité des pyrazines hydrosolubles (Giordani*, et coll.*, 2006).

Enfin, une amélioration de la séparation chromatographique des deux poly-hydroxyalkyl-pyrazines et une purification de chaque molécule constituent les étapes préalables et indispensables à l'identification de leur contribution aux caractéristiques organoleptiques des aliments.

En conclusion, la recherche de composés de Maillard à partir de la glutamine a permis de découvrir six molécules dont deux ont déjà été décrites dans quelques aliments. Malgré l'absence de détection de certaines de ces molécules dans les matrices alimentaires sélectionnées dans cette thèse, cette recherche par étude préliminaire sur modèles simples constitue une approche expérimentale rigoureuse, relativement rapide et efficace. La découverte de nouveaux produits de Maillard dans les aliments constitue la première étape vers l'identification de leurs impacts nutritionnels, toxiques et organoleptiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adrian, J. (1974) Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. *World Rev. Nutr. Diet.*, 9, 71-122.

Ahmed, M. U., Thorpe, S. R. et Baynes, J. W. (1986) Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.*, 261, 4889-4894.

Ait-Ameur, L., Trystram, G. et Birlouez-Aragon, I. (2006) Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the baking process: validation of an extraction method. *Food Chem.*, 98, 790-796.

Ait-Ameur, L., Mathieu, O., Lalanne, V., Trystram, G. et Birlouez-Aragon, I. (2007) Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at diefferent temperatures. *Food Chem.*, 101, 1407-1416.

Ajandouz, E. H. et 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.

Ames, J. M., Wynne, A., Hofmann, A., Plos, S. et Gibson, G. R. (1999) The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. *Brit. J. Nutr.*, 82, 489-495.

Amrein, T. M., Schönbächler, B., Escher, F. et Amado, R. (2004) Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways for reduction. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4282-4288.

Amrein, T. M., Andres, L., Manzardo, G. G. G. et Amado, R. (2006) Investigations of the promoting effect of ammonium hydrogenocarbonate on the formation of acrylamide in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 10253-10261.

Aristoy, M.-C. et Toldra, F. (1998) Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Sci.*, 50, 327-332.

Ashoor, S. H. et Zent, J. B. (1984) Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.*, 49, 1206-1207.

Baines, D. A. et Moltkiewicz, J. A. (1984) The chemistry of meat flavor. *Dans*: Bailey, A. J. (eds), *Recent advances in the chemistry of meat*, Royal Society of Chemistry, London, 119-164.

Baisier, W. M. et Labuza, T. P. (1992) Maillard browning kinetics in a liquid model system. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 707-713.

Becalski, A., Lau, B. P. Y., Lewis, D. et Seaman, S. W. (2003) Acrylamide in foods: occurence, sources and modeling. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 802-808.

Bersuder, P. et Hole, M. (2002) The isolation and characterisation of potential antioxydants from heated histidine-glucose model system. *Dans*: Vegarud, G. et Morales, F. J. (eds), *Melanoidins in food and health. Proceedings of COST Action 919 workshops*, 4, 158-166.

Bialès, C. (1988) L'analyse statistique des données. Chotard et Associés (eds), Paris.

Biedermann, M., Noti, A., Biedermann-Brem, S., Mozzetti, V. et Grob, K. (2002) Experiments on acrylamide formation and possibilities to decrease the potential of acrylamide formation in potatoes. *Mitt. Lebensm. Hyg.*, 93, 668-687.

Bjarnason, J. et Carpenter, K. J. (1970) Mechanisms of heat damage in proteins. *Brit. J. Nutr.*, 24, 313-329.

Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A. et Fogliano, V. (2004) Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1338-1343.

Borrelli, R. C. et Fogliano, V. (2005) Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 673-678.

Cämmerer, B. et Kroh, L. W. (1995) Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. *Food Chem.*, 53, 55-59.

Cämmerer, B., Jalyschko, W. et Kroh, L. W. (2002) Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2083-2087.

Carlson, L. A. (2005) Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J. Intern. Med.*, 258, 94-114.

Chen, Y., Xing, J., Chin, C.-K. et Ho, C.-T. (2000) Effect of urea on volatile generation from Maillard reaction of cysteine and ribose. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3512-3518.

Chen, Y. et Ho, C.-T. (2002) Effects of carnosine on volatile generation from Maillard reaction of ribose and cysteine. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2372-2376.

Cheuk, W. L. et Finne, G. (1984) Enzymati determination of urea and ammonia in refrigerated seafood products. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 14-18.

Colonna, P. (2002) Rôle de l'eau dans les propriétés sensorielles des aliments. *Dans*: Le Meste, M., Lorient, D. et Simatos, D. (eds), *L'eau dans les aliments*, Paris, 207-234.

Cuzzoni, M. T., Stoppini, G. et Gazzani, G. (1988) Influence of water activity and reaction temperature of ribose-lysine and glucose-lysine Maillard systems on mutagenicity, absorbance and content of furfurals. *Food Chem. Toxicol.*, 26, 815-822.

De Vleeschouwer, K., Van der Plancken, I., Van Loey, A. et Hendrickx, M. E. (2006) Impact of pH on the kinetics of acrylamide formation/elimination reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7847-7855.

Del Castillo, M. D., Silvan, J. M., Amigo-Benavent, M., Gugliucci, A. et Villamiel, M. (2007) Electromigration analyses for assessing glycation and deglycosylation of soy allergens. *9th International Symposium on the Maillard Reaction*, Munich, Germany.

Delgado-Andrade, C., Seiquer, I. et Navarro, M. P. (2005) Comparative effects of glucose-lysine versus glucose-methionine Maillard reaction products consumption: in vitro and in vivo calcium availability. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 679-684.

Dizy, M., Martin-Alvarez, P. J., Cabezudo, M. D. et Polo, M. C. (1992) Grape, apple and pineapple juice characterisation and detection of mixtures. *J. Sci. Food Agric.*, 60, 47-53.

Eichner, K. et Karel, M. (1972) The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 20, 218-223.

Eppendorfer, W. H. et Bille, S. W. (1996) Free and total amino acid composition of edible parts of beans, kale, spinach, cauliflower and potatoes as influenced by nitrogen fertilisation and phosphorus and potassium deficiency. *J. Sci. Food Agric.*, 71, 449-458.

Faist, V. et 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.

FAO (1995) Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et Nutrition N°28, Rome.

Finot, P. A. et Furniss, D. E. (1989) Metabolic transit and toxicity of Maillard reaction products. *Dans*: Baynes, J. W. et Monnier, V. M. (eds), *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*, New York, 343-358.

Finot, P. A. (2005a) Historical perspective of the Maillard reaction in food science. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 1-8.

Finot, P. A. (2005b) The absorption and metabolism of modified amino acids in processed foods. *J. AOAC Int.*, 88, 894-903.

Flores, M., Moya, V. J., Aristoy, M. C. et Toldra, F. (2000) Nitrogen compounds as potential biochemical markers of pork meat quality. *Food Chem.*, 69, 371-377.

Friedman, M. (2003) Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4504-4526.

Gelderblom, W. C. A., Cawood, M. E., Snyman, S. D., Vleggaar, R. et Marasas, W. F. O. (1993) Structure-activity relationship of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.*, 31, 407-414.

Gerrard, J. A., Fayle, S. E. et Wilson, A. J. (1998) Dough properties and crumb strength of white pan bread as affected by microbial transglutaminase. *J. Food Sci.*, 63, 472-475.

Gerrard, J. A., Newberry, M. P. et Ross, M. (2000) Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. *J. Food Sci.*, 65, 312-314.

Gerrard, J. A., Fayle, S. E. et Brown, P. K. (2001) Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. *J. Food Sci.*, 66, 782-786.

Gerrard, J. A. et Brown, P. K. (2002) Protein cross-linking in food: mechanisms, consequences, applications. *International Congress Series*, 1245, 211-215.

Giordani, A., Letari, O., Persiani, S., Artusi, R., Peris, W., Caselli, G. et Rovati, L. C. (2006) 2,5-bis(tetrahydroxybutyl)pyrazines for the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Number:* EP 1 704 862 A1, Italy.

Glomb, M. A., Rösch, D. et Nagaraj, R. H. (2001) N^{δ}-(5-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-L-ornithine, a novel methylglyoxal-arginine modification in beer. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 366-372.

Glomb, M. A. et Tschirnich, R. (2001) Detection of α-dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5543-5550.

Gökmen, V. et Senyuva, H. Z. (2007) Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chem.*, 103, 196-203.

Granvogl, M., Jezussek, M., Koehler, P. et Schieberle, P. (2004) Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes - a minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4751-4757.

Hamon, M., Pellerin, F., Guernet, M. et Mahuzier, G. (1979) Méthodes spectrales et analyse organique. Masson (eds), *Abrégé de Chimie Analytique*, Paris.

Hayashi, T. et Shibamoto, T. (1985) Analysis of mutagenetic methylglyoxal in foods and beverage. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1090-1093.

Helena Seron, L., Garrigos Poveda, E., Prats Moya, M. S., Martin Carratala, M. L., Berenguer-Navarro, V. et Grane-Teruel, N. (1998) Characterisation of 19 almond cultivars on the basis of their free amino acids composition. *Food Chem.*, 61, 455-459.

Henle, T., Walter, A. W., Haebner, R. et Klostermeyer, H. (1994) Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 199, 55-58.

Heyns, K. et Koch, W. (1952) *Z. Naturforsch., B*, 7, 486.

Heyns, K. et Hauber, R. (1970) Determination of structure of specific C-14 labeled brown polymerisates of sorbose by thermal fragmentations. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 733, 159-169.

Hirayama, T., Yamada, N., Nohara, M. et Fukui, S. (1994) The existence of the 1,2-dicarbonyl compounds glyoxal, methylglyoxal and diacetyl in autoxidised edible oils. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 1357-1362.

Hodge, J. E. (1953) Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928-943.

Hofmann, S. M., Dong, H. J., Li, Z., Cai, W., Altomonte, J., Thung, S. N., Zeng, F., Fisher, E. A. et Vlassara, H. (2002) Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes*, 51, 2082-2089.

Hofmann, T. (1998) Studies on melanoidin-type colorants generated from the Maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde - chemical characterisation of a red coloured domaine. *Eur. Food Res. Technol.*, 206, 251-258.

Hollnagel, A. et Kroh, L. W. (1998) Formation of α-dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 207, 50-54.

Homoki-Farkas, P., Örsi, F. et Kroh, L. W. (1997) Methylglyoxal determination from different carbohydrates during heat processing. *Food Chem.*, 59, 157-163.

Hough, L., Jones, J. K. N. et Richards, E. L. (1952) *J. Chem. Soc.*, 3854-3857.

Hwang, H. I., Hartman, T. G., Rosen, R. T. et Ho, C. T. (1993) Formation of pyrazines from the Maillard reaction of glucose and glutamine-amide-15N. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2112-2115.

Hwang, H. I., Hartman, T. G., Rosen, R. T., Lech, J. et Ho, C. T. (1994) Formation of pyrazines from the Maillard reaction of glucose and lysine-a-amine-15N. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1000-1004.

Hwang, H. I., Hartman, T. G. et Ho, C. T. (1995a) Relative reactivities of amino acids in pyrazine formation. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 179-184.

Hwang, H. I., Hartman, T. G. et Ho, C. T. (1995b) Relative reactivities of amino acids in the formation of pyridines, pyrroles and oxazoles. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2917-2921.

Jagerstad, M. et Skog, K. (2005) Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat. Res.*, 574, 156-172.

Jezo, I. et Luzak, I. (1963) *Chem. Zvesti.*, 17, 255.

Jezo, I. (1967) *Chem. Abstracts*, 67, 3201.

Jousse, F., Jongen, W., Agterof, W., Russell, S. et Braat, P. (2002) Simplified kinetic scheme of flavour by the Maillard reaction. *J. Food Sci.*, 67, 2534-2542.

Jung, M. Y., Choi, D. S. et Ju, J. W. (2003) A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in french fries. *J. Food Sci.*, 68, 1287-1290.

Kajita, T. et Senda, M. (1972) Simultaneous determination of ascorbic acid, triose reductose and their related compounds in foods by polarographic method. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 46, 137-145.

Kasper, M. et Schieberle, P. (2007) Model studies on the formation of N^{ε}-carboxymethyllysine (CML) and N^{ε}-carboxyethyllysine (CEL): Influence of thermal

processing and high hydrostatic pressure. *9th International Symposium on the Maillard Reaction*, Munich, Germany.

Kato, H. et Tsuchida, H. (1981) Estimation of melanoidin structure by pyrolysis and oxidation. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 147-156.

Kato, H., Hayase, F., Shin, D. B., Oimomi, M. et Baba, S. (1989) 3-Deoxyglucosone, an intermediate product of the Maillard reaction. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 304, 69-84.

Koehler, P. E., Mason, M. E. et Newell, J. A. (1969) Formation of pyrazine compounds in sugar-amino acid model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 17, 393-396.

Kort, M. J. (1970) Reactions of free sugars with aqueous ammonia. *Adv. Carbohyd. Chem.*, 25, 311-349.

Kroes, R., Galli, C., Munro, I., Schilter, B., Tran, L.-A., Walker, R. et Wurtzen, G. (2000) Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: A practical tool for assessing the need for toxicity testing. *Food Chem. Toxicol.*, 38, 255-312.

Kroh, L. W. (1994) Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.*, 51, 373-379.

Krug, E., Prellwitz, W. et Schaffner, E. (1959) Thermische Eiweissveränderungen und biologische Wertigkeit. *Naturwissenschaften*, 46, 534-535.

Kuhn, R., Krüger, G., Haas, H. J. et Seeliger, A. (1961) *Ann.*, 644, 117.

Labuza, T. P., Tannenbaum, S. R. et Karel, M. (1970) Water content and stability of low-moisture and intermediate-moisture foods. *Food Technol.*, 24, 543-550.

Lacey, J. M. et Wilmore, D. W. (1990) Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr. Rev.*, 48, 297-309.

Ledl, F. (1987) Analytik flüchtiger zuckerabbauprodukte. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.*, 41, 83-87.

Lee, K.-G. et Shibamoto, T. (2002) Toxicology and antioxydant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. *Food Rev. Int.*, 18, 151-175.

Lien, Y. C. et Nawar, W. W. (1974) Thermal decomposition of some amino acids. Valine, leucine, isoleucine. *J. Food Sci.*, 39, 911-916.

Lin, R. Y., Reis, E. D., Dore, A. T., Lu, M., Ghodsi, N., Fallon, J. T., Fisher, E. A. et Vlassara, H. (2002) Lowering of dietary advanced glycation endproducts (AGE) reduces neointimal formation after arterial injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*, 163, 303-311.

Lin, R. Y., Choudhury, R. P., Cai, W., Lu, M., Fallon, J. T., Fisher, E. A. et Vlassara, H. (2003) Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 168, 213-220.

Lindmark-Mansson, H., Fonden, R. et Pettersson, H.-E. (2003) Composition of Swedish dairy milk. *Int. Dairy J.*, 13, 409-425.

Lo, C. Y., Li, S., Tan, D., Pan, M. H., Sang, S. et Ho, C. T. (2006) Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 1118-1128.

Lobry de Bruyn, C. A. (1898) *Ber.*, 31, 2476.

Lobry de Bruyn, C. A. (1899) *Rec. Trav. Chim.*, 18, 72.

Loiudice, R., Impembo, M., Laratta, B., Villari, G., Lo Voi, A., Siviero, P. et Castaldo, D. (1995) Composition of San Marzano tomato varieties. *Food Chem.*, 53, 81-89.

Lorient, D. et Tainturier, G. (2002) Rôle de l'eau dans les réactions d'altération des aliments. *Dans*: Le Meste, M., Lorient, D. et Simatos, D. (eds), *L'eau dans les aliments*, Paris, 113-131.

Lu, Y., Clifford, L., Hauck, C. C., Hendrich, S., Osweiler, G. et Murphy, P. A. (2002) Characterization of fumonisin B_1-glucose reaction kinetics and products. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4726-4733.

Lu, Z., Dantzer, W. R., Hopmans, E. C., Prisk, V., Cunnick, J. E., Murphy, P. A. et Hendrich, S. (1997) Reaction with fructose detoxifies fumonisin B_1 while stimulating liver-associated natural killer cell activity in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 803-809.

Machiels, D. et Istasse, L. (2002) La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments. *Ann. Méd. Vét.*, 146, 347-352.

Maga, J. A. (1982) Pyrazines in foods: an update. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 16, 1-48.

Magaletta, R. L. et Ho, C. T. (1996) Effect of roasting time and temperature on the generation of nonvolatile (polyhydroxyalkyl)pyrazine compounds in peanuts, as determined by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2629-2935.

Magaletta, R. L., Rosen, R. T., Hartman, T. G. et Ho, C. T. (1996) Isolation and identification of polyhydroalkylpyrazines from roasted peanuts by HPLC and HPLC-MS. *Dans*: Pickenhagen, W., Ho, C. T. et Spanier, A. M. (eds), *Contribution of low- and non-volatile materials to the flavor of foods*, Allured Publishing Corporation, 27-35.

Maillard, L. C. (1912) Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoïdines par voie méthodique. *C. R. Acad. Sci.*, 154, 66-68.

Martin, F. L. et Ames, J. M. (2001) Formation of Strecker aldehydes and pyrazines in a fried potato model system. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3885-3892.

Mauron, J. (1981) The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 5-35.

Mavric, E., Wittmann, S., Lassen, A., Müller, L. et Henle, T. (2006) Antimicrobial and cytotoxic effects of dicarbonyl compounds in honey - Risk or benefits. *Cost Action 927 - IMARS. The Maillard Reaction in Food and Medecine*, Napoli.

Mehaia, M. A. et Al-Kanhal, M. A. (1992) Taurine and other free amino acids in milk of camel, goat, cow and man. *Milchwissenschaft*, 47, 351-353.

Mende, P., Ziebarth, D., Preussmann, R. et Spiegelhalder, B. (1994) Occurence of the nitrosamide precursor pyrrolidin-(2)-one in food and tobacco. *Carcinogenesis*, 15, 733-737.

Merritt, D. J. et Robertson, D. H. (1967) The analysis of proteins, peptides and amino acids by pyrolysis-gas chromatography and mass spectrometry. *J. Gas Chrom.*, 39, 741-742.

Mitsuhashi, T., Vlassara, H., Founds, H. W. et Li, Y. M. (1997) Standardizing the immunological measurement of advanced glycation endproducts using normal human serum. *J. Immunol. Methods*, 207, 79-88.

Moreaux, V., Birlouez-Aragon, I. et Ducauze, C. J. (1996) Trp oxidation by the copper-ascorbate system is dependent on Trp and vit C concentrations. *Redox Report*, 2, 191-197.

Mottram, D. S. (1998) Flavor formation in meat and meat products: a review. *Food Chem.*, 62, 415-424.

Mottram, D. S., Wedzicha, B. L. et Dodson, A. T. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448-449.

Murcia, M. A., Lopez-Ayerra, B., Martinez-Tome, M. et Garcia-Carmona, F. (2001) Effect of industrial processing on amino acid content of broccoli. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 1299-1305.

Mustafa, A., Aman, P., Andersson, R. et Kamal-Eldin, A. (2007) Analysis of free amino acids in cereal products. *J. Agric. Food Chem.*, 105, 317-324.

Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T. et Sugimura, T. (1977) Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett.*, 2, 221-226.

Neath, K. E., Del Barrio, A. N., Lapitan, R. M., Herrera, J. R. V., Cruz, L. C., Fujihara, T., Muroya, S., Chikuni, K., Hirabayashi, M. et Kanai, Y. (2007) Difference in tenderness and pH decline between water buffalo meat and beef during postmortem aging. *Meat Sci.*, 75, 499-505.

Nemet, I. et Varga-Defterdarovic, L. (2007) Nonenzymatic modifications of tryptophan and its metabolites with methylglyoxal into β-carbolines. *9th International Symposium on the Maillard Reaction*, Munich, Germany.

Niquet, C. et Tessier, F. J. (2007) Free glutamine as a major precursor of brown products and fluorophores in Maillard reaction systems. *Amino Acids*, 33, 165-171.

Ohmori, S., Kawase, M., Mori, M. et Hirote, T. (1987) Simple and sensitive determination of methylglyoxal in biological samples by gas chromatography with electron capture detection. *J. Chrom.*, 415, 221-229.

Oruna-Concha, M. J., Craig Duckham, S. et Ames, J. M. (2001) Comparison of volatile compounds isolated from the skin and flesh of four potato cultivars after baking. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2414-2421.

Patey, A. L., Startin, J. R., Rowbottom, P. M. et Shearer, G. (1987) Identification of substituted hydroxypyridines and hydroxypyrazines in caramel food colourings. *Food Add. Contamin.*, 4, 9-15.

Peppa, M., Brem, H., Cai, W., Zhang, J. G., Basgen, J., Li, Z., Vlassara, H. et Uribarri, J. (2006) Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-711). *Am. J. Nephrol.*, 26, 430-436.

Perrotin, G. (2004) Synthèse bibliographique sur la réaction de Maillard et les composés potentiellement toxiques. Inserm, Lyon. http://www.lc-maillard.org/PDF/SOMMAIREcup.pdf.

Pischetsrieder, M., Schoetter, C. et Severin, T. (1998) Formation of an aminoreductone during the Maillard reaction of lactose with Nα-acetyllysine or proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 928-931.

Pollien, P., Lindinger, C., Yeretzian, C. et Blank, I. (2003) Proton transfer reaction mass spectrometry is a suitable tool for on-line monitoring of acrylamide in food and Maillard systems. *Anal. Chem.*, 75, 5488-5494.

Potman, R. P. et van Wijk, T. A. (1989) Mechanistic studies of the Maillard reaction with emphasis on phosphate-mediated catalysis. *Dans*: Parliment, T. H., McCorin, R. J. et Ho, C. T. (eds), *Thermal Generation of Aromas*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 182-195.

Pratta, G., Zorzoli, R., Boggio, S. B., Picardi, L. A. et Valle, E. M. (2004) Glutamine and glutamate levels and related metabolizing enzymes in tomato fruits with different shelf-life. *Sci. Hort.*, 100, 341-347.

Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Marchand, S., Beloqui, A. A. et Bertrand, A. (2001) Automated HPLC method for the measurement of free amino acids including cysteine in musts and wines; first applications. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 731-738.

Rerat, A., Calmes, R., Vaissade, P. et Finot, P. A. (2002) Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *Eur. J. Nutr.*, 41, 1-11.

Rhabar, S., Blumenfeld, O. et Ranney, H. (1969) Hemoglobin studies of the unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36, 838-843.

Rhabar, S. (2005) The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. Review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 9-19.

Riha, W. E., Izzo, H. V., Zhang, J. et Ho, C.-T. (1996) Nonenzymatic deamidation of food proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 36, 225-255.

Rimek, H. J. (1963) Application of a redox rearrangement to the oxidation of alkylpyridine derivatives. *Ann.*, 670, 69-74.

Russev, M. et Kroh, L. (1993) Zur nichtenzymatischen bräunung in dessertxein-modellen. *Proceedings*, 322.

Sandu, O., Song, K., Cai, W., Zheng, F., Uribarri, J. et Vlassara, H. (2005) Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes*, 54, 2314-2319.

Schneider, T., Butz, P., Ludwig, H. et Tauscher, B. (2003) Pressure-induced formation of pyroglutamic acid from glutamine in neutral and alkaline solutions. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 36, 365-367.

Seiquer, I., Diaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., Lopez-Frias, M., Munoz Hoyos, A., Galdo, G. et Navarro, M. P. (2006) Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 1082-1088.

Sell, D. R. et Monnier, V. M. (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 25, 21597-21602.

Serra Bonvehi, J. et Ventura Coll, F. (2002) Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalinized cocoa powder. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3743-3750.

Sforza, S., Galaverna, G., Schivazappa, C., Marchelli, R., Dossena, A. et Virgili, R. (2006) Effect of extended aging of Parma dry-cured ham on the content of oligopeptides and free amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9422-9429.

Shabert, J. et Ehrlich, N. (1994) The ultimate nutrient glutamine: the essential nonessential amino acid. USA.

Shamsi, F. A., Partal, A., Sady, C., Glomb, M. A. et Nagaraj, R. H. (1998) Immunological evidence for methylglyoxal-derived modification *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 273, 6928-6936.

Shibamoto, T. et Bernhard, R. A. (1976) Effect of time, temperature, and reactant ratio on pyrazine formation in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 847-852.

Shipanova, I. N., Glomb, M. A. et Nagaraj, R. H. (1997) Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.*, 344, 29-36.

Snowden, M. K., Baxter, J. H., Mamula Bergana, M., Reyser, I. et Pound, V. (2002) Stability of N-acetylglutamine and glutamine in aqueous solution and in a liquid nutritional product by an improved HPLC method. *J. Food Sci.*, 67, 384-389.

Sohn, M. et Ho, C.-T. (1995) Ammonia generation during thermal degradation of amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 3001-3003.

Souba, W. W., Smith, R. J. et Wilmore, D. W. (1985) Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN-Parenter. Enter.*, 9, 297-309.

Spingarn, N. E. et Garvie, C. T. (1979) Formation of mutagens in sugar-ammonia model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1319-1321.

Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M.-C. et Riediker, S. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419, 449-450.

Stadler, R. H., Verzegnassi, L., Varga, N., Grigorov, M., Studer, A., Riediker, S. et Schilter, B. (2003) Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems. *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 1242-1250.

Surdyk, N., Rosen, J., Andersson, R. et Aman, P. (2004) Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2047-2051.

Suyama, K. et Adachi, S. (1980) Origin of alkyl-substituted pyridines in food flavor: formation of the pyridines from the reaction of alkanals with amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 546-549.

Suyama, K., Yoshioka, M., Akagawa, M., Murayama, Y., Horii, H., Takata, M., Yokoyama, T. et Mohri, S. (2007) Prion inactivation by the Maillard reaction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 356, 245-248.

Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R. H., Gondé, P., Van Eijck, P., Lalijie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Müller, D., Tallmadge, D., O'Brien, J., Thompson, S., Silvani, D. et Whitmore, T. (2004) A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 44, 323-347.

Tan, B. K. et Harris, N. D. (1995) Maillard reaction products inhibit apple polyphenoloxidase. *Food Chem.*, 53, 267-273.

Tanaka, M., Nagashima, Y. et Tagushi, T. (1986) A kinetic of the non-enzymatic browning reaction between histamine and glucose. *B. Jpn Soc. Sci. Fish.*, 52, 1271-1274.

Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. et Törnqvist, M. (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4998-5006.

Taubert, D., Harlfinger, S., Henkes, L., Berkels, R. et Schömig, E. (2004) Influence of processing parameters on acrylamide formation during frying of potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2735-2739.

Tessier, F. et Birlouez-Aragon, I. (1998) Effect of pH, phosphate and copper on the interaction of glucose with albumin. *Glycoconj. J.*, 15, 571-574.

Tessier, F., Obrenovich, M. et Monnier, V. M. (1999) Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1. Relationship to vesperlysine A and the advanced Maillard reaction in aging, diabete, and cataractogenesis. *J. Biol. Chem.*, 274, 20796-20804.

Tessier, F. J., Monnier, V. M., Sayre, L. M. et Kornfield, J. A. (2003) Triosidines: novel Maillard reaction products and croos-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem. J.*, 369, 705-719.

Thornalley, P. J. (2005) Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 111-117.

Tressl, R., Wondrak, G. T., Garbe, L. A., Kruger, R. P. et Rewicki, D. (1998) Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1765-1776.

Tritscher, A. M. (2004) Human health risk assessment of processing-related compounds in food. *Toxicol. Lett.*, 149, 177-186.

Tsuchida, H., Komoto, M., Kato, H. et Fujimaki, M. (1973) Formation of deoxy-fructosazine and its 6-isomer on the browning reaction between glucose and ammonia in weak acidic medium. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2571-2578.

Tsuchida, H., Morinaka, K., Fujii, S., Komoto, M. et Mizuno, S. (1986) Identification of novel non-volatile pyrazines in commercial caramel colors. *Dev. Food Sci.*, 13, 85-94.

Tsuchida, H., Komoto, M. et Mizuno, S. (1990) Isolation and identification of polyhydroxyalkylpyrazines in soy sauce. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 154-161.

Uribarri, J., Peppa, M., Cai, W., Goldberg, T., Lu, M., Baliga, S., Vassalotti, J. A. et Vlassara, H. (2003) Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 42, 532-538.

Valle, E. M., Boggio, S. B. et Heldt, H. W. (1998) Free amino acids composition of phloem sap and growing fruit of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell Physiol.*, 39, 458-461.

van Boekel, M. A. J. S. (2006) Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol. Adv.*, 24, 230-233.

Van den Berg, C. et Bruin, S. (1981) Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. *Dans*: Rockland, L. B. et F, S. G. (eds), *Water activity: influences on food quality*, Academic Press, New-York, 1-61.

Vlassara, H., Cai, W., Crandall, J., Goldberg, T., Oberstein, R., Dardaine, V., Peppa, M. et Rayfield, E. J. (2002) Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 15596-15601.

Vlassara, H. (2005) Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 452-460.

Warmbier, H. C., Schinckles, R. A. et Labuza, T. P. (1976) Effect of glycerol on nonenzymatic browning in a solid intermediate moisture model food system. *J. Food Sci.*, 41, 528-531.

Weisshaar, R. et Gutsche, G. (2002) Formation of acrylamide in heated potato products-model experiments pointing to asparagine as precursor. *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 98, 397-400.

Wenzel, E., Tasto, S., Erbersdobler, H. F. et Faist, V. (2002) Effect of heat-treated proteins on selected parameters of the biotransformation system in the rat. *Ann. Nutr. Metab.*, 46, 9-16.

Wilkinson, C., Dijkserhuis, G. B. et Minekus, M. (2000) From food to structure. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 442-450.

Wolff, S. P., Bascal, Z. A. et Hunt, J. V. (1989) "Autoxidative glycosylation": free radicals and glycation theory. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 304, 259-275.

Wright, T. H. (1991) Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 26, 1-52.

Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M. et Shibamoto, T. (2003) Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3999-4003.

Yaylayan, V. A., Wnorowski, A. et Perez Locas, C. (2003) Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1753-1757.

Yen, G. C., Tsai, L. C. et Lii, J. D. (1992) Antimutagenic effect of Maillard browning products obtained from amino acids and sugars. *Food Chem. Toxicol.*, 30, 127-132.

Yoshida, D., Saito, Y. et Mizusaki, S. (1984) Isolation of 2-amino-3-methylimidazole [4,5-*f*]quinoline as a mutagen from the heated product of a mixture of creatinine and proline. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 241-243.

Zheng, F., He, C., Cai, W., Hattori, M., Steffes, M. et Vlassara, H. (2002) Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycoxidation products. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 18, 224-237.

Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P. et Villagran, M. D. (2003) Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4782-4787.

ANNEXES

ANNEXE I

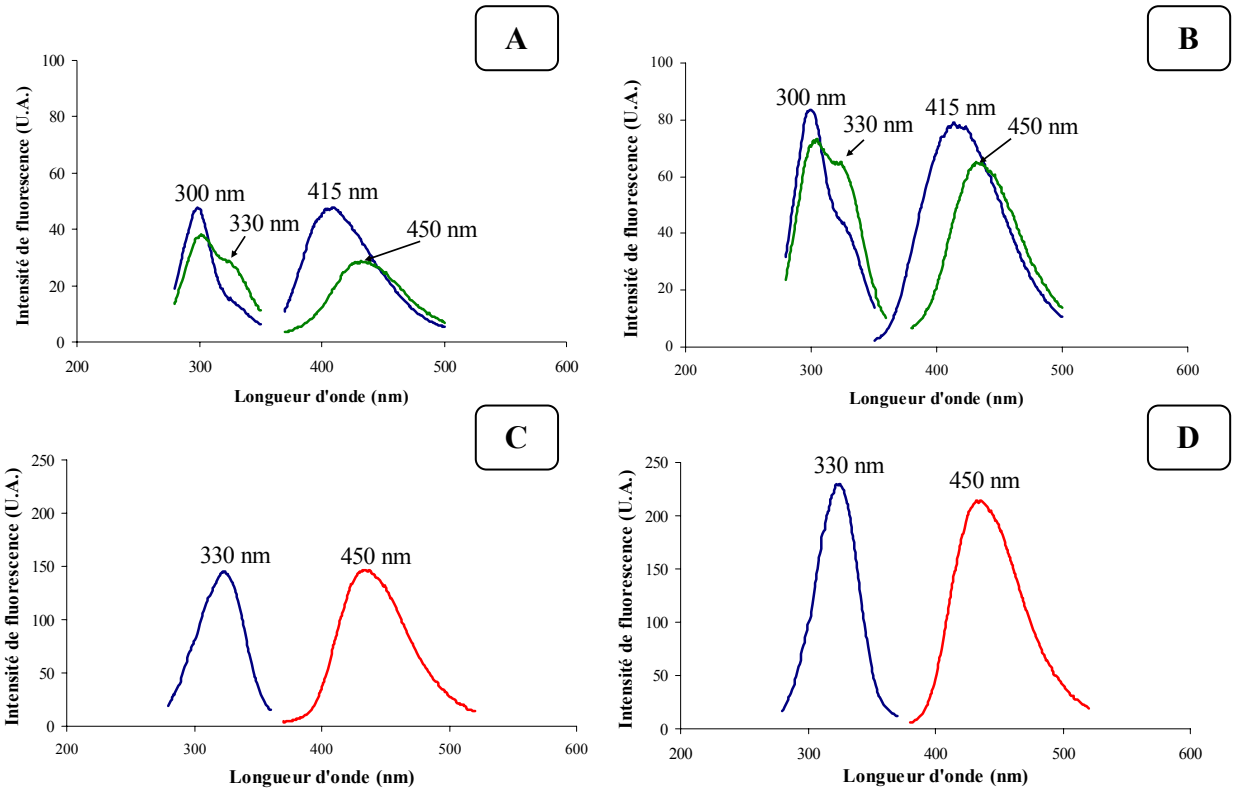


Figure 112 : Spectres de fluorescence d'un mélange composé de glutamine et de méthylglyoxal (rapport molaire des deux substrats 1/2) en milieu tampon phosphate 200 mM à pH 9 incubé 30 min (A) ; 1 h (B) ; 2 h (C) et 4 h (D) à 120°C.

ANNEXE II

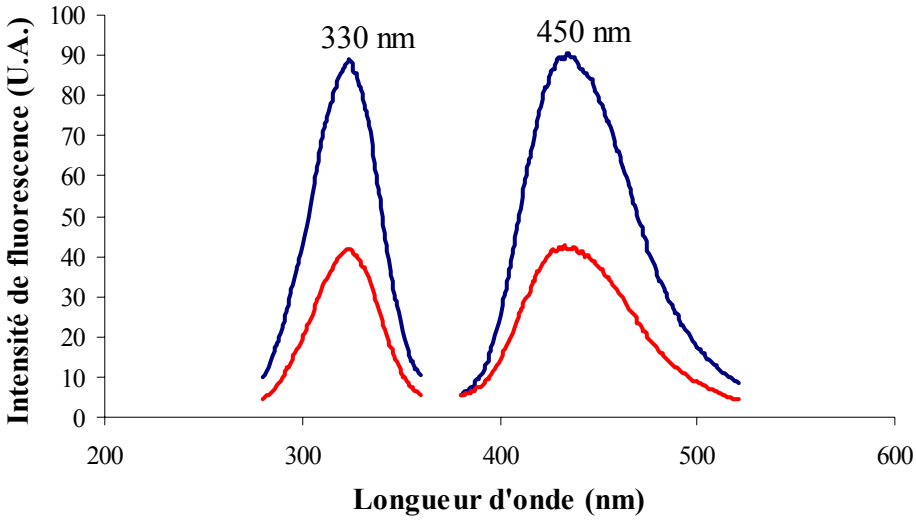


Figure 113 : Spectres de fluorescence des mélanges de glutamine/méthylglyoxal (—) et d'ammoniac/méthylglyoxal (—) incubés 2 h à 120°C en milieu tampon pH 9.