

Influence des protéines laitières sur le pouvoir antioxydant et la biodisponibilité des polyphénols du café

Coralie Dupas

▶ **To cite this version:**

Coralie Dupas. Influence des protéines laitières sur le pouvoir antioxydant et la biodisponibilité des polyphénols du café. Sciences du Vivant [q-bio]. ENSIA (AgroParisTech), 2005. Français. NNT : 2005EIAA0154 . pastel-00003694

HAL Id: pastel-00003694
https://pastel.hal.science/pastel-00003694

Submitted on 17 Jun 2009

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.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES (ENSIA)

DOCTORAT

Spécialité : SCIENCES ALIMENTAIRES

(Ecole doctorale ABIES)

par

Coralie DUPAS

INFLUENCE DES PROTEINES LAITIERES SUR LE POUVOIR ANTIOXYDANT ET LA BIODISPONIBILITE DES POLYPHENOLS DU CAFE

Thèse dirigée par **M^me^ MAILLARD Marie-Noëlle, Maître de conférences (ENSIA)**

Soutenue devant la commission d'examen composée de :

M. TOME D., Professeur (I.N.A.-Paris Grignon)	**Président du Jury**
M^me^ GENOT C., Chargée de recherches (INRA, Nantes)	**Rapporteur**
M. DANGLES O., Professeur (Université d'Avignon)	**Rapporteur**
M. NICOLAS J., Professeur (C.N.A.M., Paris)	**Examinateur**
M^me^ MAILLARD M.-N., Maître de conférences (ENSIA, Massy)	**Directrice de Thèse**
Mme CAMARA HURTADO M., Professeur (Université Complutense de Madrid)	**Invitée**

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé dans l'UMR SCALE, au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles : antioxydants, arômes, colorants de l'ENSIA. Il a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Il a donné lieu aux publications suivantes :

Articles dans des revues à comité de lecture

Publiés :

- Dupas C., Marsset-Bagliéri A., Peyrat-Maillard M.-N. (2002). Les interactions protéines/polyphénol et leur influence sur la biodisponibilité des polyphénols. *NAFAS*, 9, 15-30.
- Rondini L., Dupas C., Marsset-Bagliéri A., Berset C., Peyrat-Maillard M.-N. (2003). Biodisponibilité des composés phénoliques et de leurs métabolites. *NAFAS*, 1, 19-57.
- Dupas C., Marsset-Baglieri A., Ordonaud C., Tomé D., Ducept F. and Maillard M.N., Positive Health Effects of Coffee Drinking : the Effect of Milk Addition and Beverage Industrial Processing. *Journal of Food Science*, 71(3), S253-258.

En cours de rédaction :

- Dupas C., Ordonaud C., Marsset-Baglieri A., Tomé D., Maillard M.N., Chlorogenic Acid is Poorly Absorbed : Food Matrix Effects. Soumis à *Food Molecular Research* .

Communications à des congrès, avec comité de lecture

- Marsset-Bagliéri A., Fromentin G., Morens C., Dupas C., Berger V., Tomé D., Peyrat-Maillard M.-N. (2003). Bioavailability in rat of Chlorogenic acid and derivatives from salad antioxidant extract. *1st International Conference on Polyphenols and Health*, Vichy, France. (poster)
- Peyrat-Maillard M.-N., Dupas C., Rondini L., Ordonaud C., Fromentin G., Tomé D., Marsset-Bagliéri A. (2004). Impact de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité d'antioxydants phénoliques: acide férulique et son de blé, acide chlorogénique et café au lait. *16emes Rencontres Scientifiques et Technologiques des Industries Alimentaires AGORAL*, Nantes, France. Ed. Tec et Doc, 48-55.
- Dupas C., Marsset-Baglieri A., Ordonaud C., Fromentin G., Tomé D., Ducept F., and Maillard M.-N. (2005). Positive Health Effects of Coffee Drinking : the Effect of Milk Addition and Beverage Industrial Processing. *Health Molecules and Ingrédients*, Rennes, France, poster et communication orale. Prix du meilleur poster.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier toutes les personnes qui ont participé à l'encadrement de ma thèse, sans lesquelles ce travail ne serait pas ce qu'il est.

Madame BERSET, Professeure à l'ENSIA, qui a accepté d'encadrer cette thèse, malgré son départ en retraite programmé un an après le début de celle-ci. Les discussions que nous avons eues ont toujours été pour moi une source d'enrichissement aussi bien au plan scientifique, que culturel et personnel. Pour toutes ces raisons (et bien d'autres encore), je lui suis infiniment reconnaissante.

Madame Marie-Noëlle PEYRAT-MAILLARD, Maître de Conférence à l'ENSIA, qui a pris la relève dans l'encadrement de ce travail. Sa patience, son soutien moral et sa disponibilité ont largement contribué au bon déroulement de ce travail, mais c'est avant tout pour sa rigueur scientifique que je lui suis le plus reconnaissante. J'espère en avoir en partie hérité et la remercie très sincèrement.

Madame MARSSET-BAGLIERI, Maître de Conférence à l'ENSIA, qui a co-encadré les aspects de ce travail concernant la nutrition, m'a beaucoup conseillée et aidée sur le plan expérimental. Je la remercie chaleureusement.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

Madame Claude GENOT, Chargée de Recherche à l'INRA de Nantes, et Monsieur Olivier DANGLES, Professeur à l'Université d'Avignon, pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse en tant que rapporteurs.

Monsieur Daniel TOME, Professeur à l'INA-PG, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser les expérimentations animales au sein de son laboratoire. Je suis par ailleurs honorée de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail et pour avoir accepté de présider ce jury.

Monsieur Jacques NICOLAS, Professeur au C.N.A.M. de Paris, ainsi que Mme Montaña CAMARA HURTADO, Professeure à l'Université de Madrid, que je remercie également d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont contribué par leurs conseils ou leur aide à la réalisation de ce travail

Claire ORDONAUD, Technicienne au laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'ENSIA, pour sa collaboration inestimable dans la mise au point des tests de mesure du pouvoir antioxydant et l'analyse des acides phénoliques dans le plasma, sa grande rigueur scientifique, sa bonne humeur quotidienne et pour tant d'autres choses encore.

Gilles FROMENTIN, Ingénieur de Recherche à l'INA-PG, pour son investissement dans la mise en place des expérimentations animales. Ses conseils éclairés ont été précieux et je lui en suis très reconnaissante.

Fabrice DUCEPT, Maître de Conférences à l'ENSIA, pour son aide précieuse dans la préparation des boissons atomisées.

Anne REGOURD (ENSIA), pour sa disponibilité, et surtout pour toute l'aide qu'elle m'a apportée, aussi bien au niveau des expérimentations animales que des analyses ultérieures.

Je n'oublie pas non plus toutes les personnes qui à l'aide de petits conseils et de petits coups de mains ont contribué à ce travail : Catherine BILLAUD (CNAM), Pierre GIAMPAOLI (ENSIA), Ludovic RONDINI, Séverine FERAL ainsi que Louise BUFFEL et Charlotte, qui ont contribué à l'avancement de ce travail par leur stages respectifs.

Je remercie tous les membres du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, qui ont contribué au quotidien au bon déroulement de cette thèse, et qui ont réussi à me supporter au quotidien, moi et toutes mes lubies…Je remercie tout particulièrement Murielle MAIRE, dont la disponibilité, les compétences techniques et la bonne humeur m'ont énormément aidé.

Enfin, je tenais à remercier également l'amour de ma vie et futur mari, Jean-Philippe FARRUGIA, ainsi que mes parents et mes amis, qui m'ont soutenue moralement au quotidien pendant ces quatre années que j'ai passées au laboratoire. Sans vous tous je n'en serais pas là.

Merci infiniment.

SOMMAIRE

AVANT PROPOS **2**

REMERCIEMENTS **3**

SOMMAIRE **5**

LISTE DES ABREVIATIONS **11**

LISTE DES TABLEAUX **12**

LISTE DES FIGURES **14**

INTRODUCTION **20**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **32**

I. Interactions polyphénols/macronutriments : leur nature **33**

I.1. Interactions « spécifiques » **33**

I.1.1. Interactions avec les protéines : 33

I.1.1.1. La complexation réversible *35*

I.1.1.2. La complexation irréversible *41*

I.1.2. Interactions avec les glucides et les fibres 45

I.1.2.1. Fruits et légumes, matrices naturelles des polyphénols *46*

I.1.2.2. Interactions constitutives *47*

I.1.2.3. Interactions formées lors de la transformation des fruits *49*

I.1.3. Interactions avec les lipides des fruits 53

I.2. Interactions « non spécifiques » : en lien avec la solubilité des polyphénols **53**

I.2.1. Influence des lipides 53

I.2.2. Influence de l'alcool 54

II. Influence des interactions polyphénols/macronutriments sur le pouvoir antioxydant des polyphénols **55**

II.1. Interactions dans l'aliment et pouvoir antioxydant des polyphénols **55**

II.1.1. Interactions se produisant lors de la fabrication ou la conservation de l'aliment 56

II.1.1.1. Evolution du pouvoir antioxydant des fruits pendant leur conservation *56*

II.1.1.2. Pertes de pouvoir antioxydant liées à la transformation des fruits *58*

II.1.1.3. Valorisation de sous produits alimentaires : vers une amélioration du pouvoir antioxydant des aliments ? ... *63*
II.1.2. Interactions se produisant lors de la consommation de l'aliment ... 65
II.1.2.1. Effets de la préparation domestique des aliments ... *65*
II.1.2.2. Effets de la cuisson domestique des aliments ... *65*
II.1.2.3. Préparation domestique des boissons au lait ... *66*
II.2. Interactions dans l'organisme et pouvoir antioxydant des polyphénols ... 67
II.2.1. Interactions se formant lors de la digestion des composés phénoliques ... 68
II.2.1.1. Interactions au niveau buccal : l'astringence ... *68*
II.2.1.2. Interactions au niveau gastro-intestinal ... *68*
II.2.1.3. Devenir des complexes polyphénol / macromolécules au niveau du côlon ... *70*
II.2.2. Interactions après absorption ... 71
III. Influence des interactions polyphénols/macronutriments sur la biodisponibilité des polyphénols ... 74
III.1. Evaluation de l'influence de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité des polyphénols de manière « indirecte » ... 75
III.2. Evaluation de l'influence de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité des polyphénols de manière « directe » ... 78
III.2.1. Difficultés couramment rencontrées lors de l'étude de l'influence de la matrice alimentaire sur la biodisponiblité des polyphénols ... 78
III.2.2. Données disponibles ... 80
III.2.2.1. Etudes de biodisponibilité faisant intervenir des matrices contenant des protéines ... *80*
III.2.2.2. Etudes de biodisponibilité faisant intervenir des matrices contenant des fibres alimentaires, des polysaccharides ... *81*
III.2.2.3. Etudes de biodisponibilité faisant intervenir des matrices lipidiques ... *85*
III.2.2.4. Etudes de biodisponibilité faisant intervenir des matrices contenant de l'alcool ... *87*
MATERIEL ET METHODES ... 91
I. Réactifs et solvants utilisés ... 92
II. Echantillons de Café ... 92
II.1. Préparation des Cafés extemporanés ... 92
II.2. Préparation des Cafés atomisés ... 92
II.3. Préparation des Cafés à base de café en grains (vert et torréfié) ... 92
II.4. Détermination des matières sèches ... 93
III. Dosage des acides hydroxycinnamiques dans les solutions de Café et Café au lait par CLHP-DEC ... 93
III.1. Mise au point des conditions d'analyse par CLHP-DEC ... 93
III.1.1. Système chromatographique ... 93

III.1.2. Etablissement des voltamogrammes des acides hydroxycinnamiques et dérivés 93
III.1.3. Etablissement de gammes d'étalonnage pour l'analyse des acides phénoliques 94
III.2. Extraction des acides hydroxycinnamiques et dérivés du Café 94
III.2.1. Extraction directe des acides hydroxycinnamiques 94
III.2.2. Hydrolyse basique et extraction des dérivés hydroxycinnamiques 95
III.2.3. Détermination des taux de récupération 95
IV. Séparation des acides hydroxycinnamiques et des produits de la réaction de Maillard présents dans les solutions de Café 95
IV.1. Séparation chromatographique sur colonne LH-20 95
IV.2. Séparation par ultrafiltration 96
V. Mesure du pouvoir antioxydant des solutions de Café et de Café au lait 97
V.1. Test DPPH 97
V.1.1. Principe 97
V.1.2. Protocole expérimental 98
V.1.3. Calculs et expression des résultats 98
V.2. Test AAPH 98
V.2.1. Principe 98
V.2.2. Protocole expérimental 99
V.2.3. Calculs et expression des résultats 99
V.3. Test TAC 100
V.3.1. Principe 100
V.3.2. Protocole expérimental 100
V.3.2.1. Extraction et analyse du substrat d'oxydation : la crocine 100
V.3.2.2. Protocole du test TAC 101
V.3.3. Calculs et expression des résultats 101
VI. Mise en évidence d'interactions acides hydroxycinnamiques / protéines dans le Café au lait 102
VI.1. Mise en évidence d'interactions par ultrafiltration 102
VI.1.1. Validation de la méthode 103
VI.1.2. Etude des interactions dans le café au lait 103
VI.2. Mise en évidence d'interactions par mesure du pouvoir antioxydant des complexes covalents acide chlorogénique-protéines 105
VII. Suivi du devenir des interactions acide chlorogénique-protéines au cours de la digestion : modèle *in vitro* 105
VII.1. Préparation des solutions à « digérer » 106
VII.1.1. Modèles acide chlorogénique et protéines laitières 106
VII.1.2. Modèle acide chlorogénique et lait 106

VII.1.3. Modèle acide chlorogénique / produits de la réaction de Maillard 106
VII.2. Déroulement de la digestion *in vitro* et détermination des ratios d'ACQ liés aux protéines 107
VII.2.1. Digestion gastrique 107
VII.2.2. Digestion intestinale 107
VIII. Détermination de la biodisponibilité de l'ACQ sur modèle cellulaire de type Caco-2 108
VIII.1. Cultures cellulaires 108
VIII.2. Etape préalable indispensable à l'application des digestats obtenus *in vitro* sur les cultures cellulaires : inactivation définitive des enzymes digestives 108
VIII.3. Application des surnageants de digestion *in vitro* sur les cellules Caco-2 109
VIII.4. Analyse des perméats cellulaires 110
IX. Détermination de la biodisponibilité de l'acide chlorogénique sur modèle animal (rat) 110
IX.1. Expérimentation animale en chronique 110
IX.1.1. Animaux 110
IX.1.2. Régimes 110
IX.1.3. Sacrifice des animaux 111
IX.2. Détermination de quelques paramètres sanguins 111
IX.3. Détermination du statut antioxydant plasmatique 111
IX.3.1. Protocole d'analyse : 111
IX.3.1.1. Sans hydrolyse enzymatique 111
IX.3.1.2. Avec hydrolyse enzymatique 112
IX.3.2. Calculs et expression des résultats 112
IX.4. Détermination des teneurs plasmatiques en acides hydroxycinnamiques 113
IX.4.1. Préparation des échantillons pour l'analyse par CLHP-DEC 113
IX.4.1.1. Hydrolyse enzymatique et extraction des composés phénoliques 113
IX.4.1.2. Précipitation des protéines plasmatiques 113
IX.4.2. Détermination du taux de récupération de l'acide chlorogénique 114
IX.4.3. Analyse par CLHP-DEC 114
IX.4.3.1. Conditions d'analyse en CLHP-DEC 114
IX.4.3.2. Identification des isomères de l'acide chlorogénique 115
IX.4.3.3. Etalonnage des acides chlorogénique, caféique et férulique 115
X. Analyses statistiques 115
RESULTATS ET DISCUSSION 116
I. Etude de la matrice alimentaire : le café au lait 117
I.1. Choix de la dose de Café 117

I.2. Analyse des acides hydroxycinnamiques dans les cafés 117
I.2.1. Mise au point de la méthode d'analyse 118
I.2.2. Dosage des acides hydroxycinnamiques 118
I.2.2.1. Concentrations en acides hydroxycinnamiques dans les cafés préparés extemporanement 118
I.2.2.2. Comparaison des cafés préparés extemporanément avec des boissons préparées à partir de café en grains 119
I.2.2.3. Influence de l'atomisation sur les acides hydroxycinnamiques 119
I.3. Détermination du pouvoir antioxydant 120
I.3.1. Pouvoir antioxydant global des boissons 120
I.3.1.1. Pouvoir antioxydant du café extemporané 120
I.3.1.2. Effets de la formation de liaisons covalentes avec des protéines sur le pouvoir antioxydant de l'acide chlorogénique 122
I.3.1.3. Pouvoir antioxydant du café au lait préparé extemporanément 124
I.3.1.4. Effet de l'atomisation du café en présence de lait sur le pouvoir antioxydant 126
I.3.2. Rôle de l'acide chlorogénique dans le pouvoir antioxydant du café 127
I.3.2.1. Evalué par le test DPPH 127
I.3.2.2. Evalué par le test AAPH 128
I.3.2.3. Evalué par le test TAC 128
I.3.3. Part relative des polyphénols et des produits de la réaction de Maillard dans l'activité antioxydante du café 129
I.3.3.1. Séparation des molécules antioxydantes du café 129
I.3.3.2. Pouvoir antioxydant des fractions obtenues par séparation sur colonne Sephadex LH-20 130
I.4. Etude des interactions acide chlorogénique/protéines dans la matrice alimentaire 132
I.4.1. Etude des interactions par ultrafiltration 132
I.4.1.1. Validation de la méthode 132
I.4.1.2. Interactions dans les solutions de lait 133
I.4.1.3. Interactions dans les solutions modèles 133
II. Devenir de la matrice café au lait après ingestion 135
II.1. Digestion *in vitro* et ultrafiltration 135
II.1.1. Problématique 135
II.1.2. Elaboration des solutions modèles 135
II.1.3. Elaboration du protocole de digestion *in vitro* 136
II.1.3.2. Digestion du mélange acide chlorogénique / lait écrémé 137
II.1.3.3. Digestion des mélanges acide chlorogénique / protéines laitières 137
II.2. Absorption sur cellules Caco-2 138
II.3. Détermination de la biodisponibilité des antioxydants du café par une étude *in vivo* sur modèle animal 140
II.3.1. Evolutions pondérales des animaux et efficacité alimentaire des régimes contenant du café 140
II.3.2. Evaluation de paramètres sanguins 141

II.3.3. Evaluation du pouvoir antioxydant des plasmas..... 141
II.3.3.1. Détermination du statut antioxydant plasmatique des animaux après consommation des régimes expérimentaux, sans hydrolyse enzymatique..... 141
II.3.3.2. Statut antioxydant plasmatique des animaux après consommation de café ou de café au lait, après hydrolyse enzymatique..... 143
II.3.4. Détermination des teneurs plasmatiques en antioxydants phénoliques 145
II.3.4.1. La biodisponibilité de l'acide chlorogénique : données de la littérature..... 145
II.3.4.2. Mise au point de la méthode d'analyse 146
II.3.4.3. Dosage des acides hydroxycinnamiques plasmatiques..... 147
II.3.4.4. Identification du composé n°7 retrouvé dans les plasmas des animaux ayant consommé du café..... 149
II.3.4.5. Corrélation entre les concentrations en acide chlorogénique et le pouvoir antioxydant des plasmas.. 150
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 152
BIBLIOGRAPHIE..... 231

LISTE DES ABREVIATIONS

AAPH : 2,2'azo-bis-(2méthylpropionamidine) dihydrochloride
ABTS : 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AC : Acide caféique
ACQ : Acide chlorogénique
ApC : Acide para-coumarique
AF : Acide férulique
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
COMT : Catéchol-O-méthyltransférase
DEC : Détection électrochimique
DPPH : 1,1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl
FRAP : Ferric Reducing Ability of Plasma
HDL : Lipoprotéines de haute densité (« High Density Lipoproteins »)
i.v. : par voie intraveineuse
LDL : Lipoprotéines de faible densité (« Low Density Lipoproteins »)
MCV : Maladies cardio-vasculaires
ORAC : Oxygen-Radical Absorbance Capacity assay
PAO : pouvoir antioxydant
PRM : Produits de la réaction de Maillard
PST : Phénolsulfotransférase
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SAB : Sérum albumine bovine
TAC : Total Antioxydant Capacity
TBA-RS : : ThioBarbituric Acid Reactive Substances
TEAC : : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TOSCA : : Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay
TRAP : Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter
UGT : Uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférase
VLDL : Lipoprotéines de très faible densité (« Very Low Density Lipoproteins »)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Contenu en polyphénols de quelques aliments (d'après Bravo, 1998)

Tableau II : Divergence sur la perception des monomères de polyphénols dans la littérature (d'après Robichaud et Noble, 1990 ; Tsai-Su et Singleton, 1969 ; Arnold et Lea, 1983 ; Delcour *et al.*, 1984 ; Kielhorn et Thorngate, 1999 ; Arnold *et al.*, 1980 ; Dadic et Belleau, 1973 ; Thorngate et Noble, 1995)

Tableau III : Composition en acides aminés de trois protéines de salive de rat induite par 3 jours d'un régime hautement enrichi en tanins de sorgho (d'après Mehansho *et al.*, 1985)

Tableau IV : Composés de la paroi végétale entrant dans la composition des fibres (d'après Macheix *et al.*, 1990 ; Ferguson *et al.*, 2001)

Tableau V : coefficients de partage des composés antioxydants de l'huile d'olive dans des émulsions huile/eau (d'après Rodis *et al.*, 2002)

Tableau VI : Différents tests permettant l'évaluation d'un pouvoir antioxydant

Tableau VII : Contenu en polyphénols et pouvoir antioxydant de différents échantillons de cacao, chocolat au lait et chocolat noir du commerce (d'après Vinson *et al.*, 1999)

Tableau VIII : Composition d'un jus de pamplemousse domestique et d'un jus industriel, et implication des différents composés phénoliques dans le pouvoir antioxydant (d'après Gil *et al.*, 2000)

Tableau IX : Effets de la cuisson domestique sur le pouvoir antioxydant et le contenu en polyphénols de quelques légumes (d'après Wu *et al.*, 2004)

Tableau X : Distribution de la radioactivité dans des rats, 72 heures après ingestion de complexes acide caféique - caséine marquée radioactivement au niveau de la lysine (d'après Hurell *et al.*, 1982)

Tableau XI : Biodisponibilité relative et paramètres pharmacocinétiques de la quercétine chez le porc après ingestion de quercétine aglycone ou de quercétine-3-O-glucoside dans des régimes différant par leur contenu en matière grasse (d'après Lesser *et al.*, 2004)

Tableau XII : Liste des produits alimentaires utilisés

Tableau XIII : Liste des réactifs et produits utilisés

Tableau XIV : Quantité de matière sèche par g de produit dans les différents cafés

Tableau XV : Paramètres testés par les différents tests de pouvoir antioxydant

Tableau XVI : Composition du régime P14

Tableau XVII : Composition des boissons expérimentales consommées par les animaux pendant 22 jours

Tableau XVIII : Concentrations d'acides hydroxycinnamiques dans les différents cafés préparés

Tableau XIX : Quantités de composés phénoliques dans le café (d'après Clifford, 1999 ; Herrmann, 1989 ; Savolainen, 1992 ; Maeztu *et al.*, 2001 ; Nardini *et al.*, 2002)

Tableau XX : Comparaison du pouvoir antioxydant du café expérimental à celui d'une infusion de thé vert

Tableau XXI : Pouvoir antioxydant d'une infusion de thé vert, avec ou sans lait

Tableau XXII : Pourcentages d'acide chlorogénique lié aux protéines de lait, déterminé par ultrafiltration.

Tableau XXIII : Pourcentage d'acide chlorogénique lié aux protéines laitières après digestion de solutions modélisant le café au lait, déterminé par ultrafiltration

Tableau XXIV : Composition corporelle des animaux (% de la masse des animaux)

Tableau XXV : Consommation moyenne du régime expérimental par les rats, rat par rat.

Tableau XXVI : Efficacité alimentaire des régimes, calculé sur les deux dernières semaines

Tableau XXVII : Effets des Acides phénoliques et du café sur quelques paramètres sanguins (d'après Rodriguez de Sotillo et Hadley, 2002 ; Frank *et al.*, 2003 ; Debry, 1993 ; Ha Jee *et al.*, 2001 ; Superko *et al.*, 1991 ; Wahrburg *et al.*, 1994 ; Kamal-Eldin *et al.*, 2000)

Tableau XXVIII : Paramètres sanguins mesurés après trois semaines de consommation des régimes expérimentaux (valeurs par L de plasma rapportées à la consommation quotidienne des régimes)

Tableau XXIX : Biodisponibilité de l'acide chlorogénique : principaux résultats bibliographiques (d'après Olthof *et al.*, 2003 ; Cremin *et al.*, 2001 ; Olthof *et al.*, 2001 ; Nardini *et al.*, 2002 ; Bitsch *et al.*, 2001 ; Wittemer *et al.*, 2005 ; Rechner *et al.*, 2001 ; Gonthier *et al.*, 2003 ; Choudhury *et al.*, 1999)

Tableau XXX : Rapports des temps de rétention (Tr) des pics retrouvés dans les plasmas « café » ou « café au lait » par rapport au temps de rétention du pic n°1 présent dans l'ensemble des plasmas

Tableau XXXI : Rapport des temps de rétention des différents composés testés en CLHP/DEC par rapport à celui de l'acide *trans*-chlorogénique (*trans*-ACQ)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures chimiques des principaux composés phénoliques

Figure 2 : Schéma du métabolisme des polyphénols (d'après Rondini, 2002)

Figure 3 : Effet d'un régime enrichi en tanins sur l'activité des enzymes digestives in vivo chez le rat (d'après Griffith et Moseley, 1980)

Figure 4 : Devenir physiologique de protéines endogènes marquées à la [15N]glycine après consommation ou non de thé noir chez le rat (d'après Shahkhalili et al., 1990)

Figure 5 : Complexation réversible des protéines par les polyphénols en solution (d'après Haslam et Lilley, 1988)

Figure 6 : Influence de la polymérisation des tanins sur les sensations gustatives qu'ils provoquent (d'après Cheynier, 2000)

Figure 7 : Effet de 3 jours d'un régime hautement enrichi en sorgho sur (a) la masse de glandes sécrétrices de salive et sur (b) le contenu en protéines riches en proline de cette dernière (d'après Mehansho et al., 1985)

Figure 8 : Trouble formé dans des mélanges de peptides homopolymériques avec de la (+)-catéchine (60 mg/L), placés 30 minutes à 80°C et à pH = 4,2 (d'après Siebert et al., 1996)

Figure 9 : Particularité du résidu proline: un hétérocycle rigide imprimant une courbure aux chaînes polypeptidiques.

Figure 10 : Diminution de la flexibilité conformationnelle du D-galloyl-glucose.

Figure 11 : Influence de la concentration des protéines et de la nature du polyphénol sur la complexation, l'agrégation et la précipitation des protéines (d'après Haslam et Lilley, 1988)

Figure 12 : Influence du pH sur la formation de complexes (turbidimétrie) entre des tanins et différents types de protéines (d'après Naczk et al., 1996)

Figure 13 : Proposition d'un modèle moléculaire de la complexation réversible des protéines (d'après Spencer et al., 1988)

Figure 14 : Structure cristalline des complexes caféine-gallate de méthyle (a) : empilement des cycles, (b) interactions entre les différentes molécules (d'après Haslam et Lilley, 1988)

Figure 15 : Modèle d'association entre le pentagalloyl glucose et les résidus prolines d'un peptide modèle (d'après Baxter et al., 1997)

Figure 16 : Réaction en milieu acide des flavanols oligomériques avec les groupements SH des protéines : Formation du trouble permanent de la bière (d'après Haslam et Lilley, 1988)

Figure 17 : Trouble produit lors du mélange de différentes concentrations de gélatine et d'acide tannique dans un tampon phosphate de potassium 0,02 mol/L, pH 4 (30 minutes, 25°C) (d'après Siebert et al., 1996)

Figure 18 : Modèle de complexation protéines - polyphénols en solution (d'après Siebert et al., 1996)

Figure 19 : Effet du degré de polymérisation de polymères de (+) catéchine sur le trouble de la bière (d'après Siebert, 1999)

Figure 20 : Quelques réactions susceptibles de se produire entre les résidus lysine de la caséine et l'acide chlorogénique ou l'acide caféique à pH≥7 (d'après Hurell et al., 1982)

Figure 21 : Les différentes réactions d'oxydation catalysées par les polyphénol oxidases (d'après Nicolas et al., 1994)

Figure 22 : Localisation tissulaire des composés phénoliques dans les fruits charnus (d'après Macheix et al., 1990)

Figure 23 : structure de la paroi végétale primaire (d'après McCann et Roberts, 1991)

Figure 24 : (a) liaison de l'acide férulique aux arabinoxylanes ; (b) Modèle structurel de l'interconnexion des arabinoxylanes du seigle (d'après Bunzel et al., 2002 ; Bunzel et al., 2004)

Figure 25 : Structures chimiques des acides diféruliques et triféruliques des fibres (d'après Bunzel et al., 2001 ; Bunzel et al., 2003 ; Funk et al., 2005)

Figure 26 : Complexe néohespéridine dihydrochalcone / β-cyclodextrine (d'après Haslam et Lilley, 1988 ; Malpezzi et al., 2004)

Figure 27 : Effet de l'éthanol sur la précipitation des tanins du vin rouge par la sérum albumine bovine, évaluée par l'absorbance de la solution à 510nm après centrifugation, et effet de l'éthanol sur le pouvoir antioxydant de ces mêmes fractions évalué par le test TRAP (d'après Serafini et al., 1997)

Figure 28 : Cinétique d'apparition du trouble permanent de la bière (d'après Siebert, 1999)

Figure 29 : Structure chimique des polyphénols de l'huile d'olive

Figure 30 : Effet du procédé d'extraction des composés phénoliques sur le pouvoir antioxydant du jus de pamplemousse, évalué par trois tests différents (d'après Gil et al., 2000)

Figure 31 : Effet masquant de diverses protéines sur le pouvoir antioxydant de la (+)-catéchine (d'après Arts et al., 2002)

Figure 32 : Effet masquant de la β-caséine sur le pouvoir antioxydant de divers polyphénols du thé (d'après Arts et al., 2002)

Figure 33 : Pouvoir antioxydant de solutions de thé, vert ou noir, auxquelles sont ajoutés ou non 25 % de lait (d'après Serafini et al., 1996)

Figure 34 : Effet de la gélatine sur le captage de l'Acide 2, 2'-azinobis (3-éthylBenzoThiazoline 6-Sulfonique) .+ par les procyanidines à pH 4,9 (d'après Riedl et Hagerman, 2001)

Figure 35 : Susceptibilité à la digestion enzymatique in vitro de dérivés myoglobine/acides phénoliques. (a) : Digestion trypsique ; (b) : Digestion chymotrypsique ; (c) Digestion pepsique (d'après Kroll et al., 2000)

Figure 36 : Hydrolyse des fibres par la flore intestinale (d'après Kroon et al., 1997)

Figure 37 : Masquage du pouvoir antioxydant du plasma acquis suite à un enrichissement en polyphénols par liaison à l'albumine (d'après Arts et al., 2001)

Figure 38 : Activité antioxydante (pouvoir réducteur) moyenne du plasma humain (n=5) après la consommation de thé vert ou noir, en présence ou non de 25% de lait, test FRAP (d'après Serafini et al., 1996)

Figure 39 : Concentration totale en (+)-catéchine détectée dans le sang par spectrophotométrie U.V. après ingestion de 600 mL de thé avec ou sans lait (d'après Van Het Hof et al., 1998)

Figure 40 : Concentration en quercétine dans le plasma de 9 sujets humains ayant ingéré du thé noir , du thé noir avec 10 % de lait , du thé vert ou de l'eau, mesurée par CLHP/UV (d'après Hollman et al., 2000)

Figure 41: chocolat au lait serafini

Figure 42 : Cinétiques d'apparition de l'acide férulique et de ses métabolites dans la circulation sanguine après ingestion (a) : de 5,15 mg/kg de masse corporelle d'acide férulique pur ou de (b) d'un aliment contenant 26 % de son de blé apportant 4,04 mg/kg de masse corporelle d'acide férulique (AF), chez le rat (d'après Rondini et al., 2002 ; Rondini et al., 2004)

Figure 43 : Quantités d'acide chlorogénique (a) et de naringénine (b) retrouvées dans le plasma chez l'homme, après consommation de 500 g de tomates cerise crues (trait pointillé) ou cuites (15 minutes dans l'eau bouillante, trait plein) dans le cadre d'un repas à base de pâtes (d'après Bugianesi et al., 2004)

Figure 44 : Concentration plasmatique de la quercétine après ingestion de quercétine-3-O-glucoside avec un repas standard ou avec le même repas contenant 15 g de viande de bœuf hachée contenant 9,5 % de matière grasse chez le porc (d'après Cermak et al., 2003)

Figure 45 : Concentration plasmatique de la quercétine et de l'isorhamnétine après ingestion chronique d'oignons dans un repas standard contenant des quantités variables d'huile de soja (d'après Azuma et al., 2003)

Figure 46 : Schéma du concentrateur Vivaspin 20

Figure 47 : Structure chimique du 2,2-diphényl 1-pycrilhydrazyl (DPPH°)

Figure 48 : Evolution de l'absorbance à 515 nm en fonction du temps de solutions contenant du DPPH et différentes concentrations de café

Figure 49 : Courbe effet-dose obtenue pour la mesure du pouvoir antioxydant par le test DPPH

Figure 50 : Structure chimique du 2,2'azo-bis-(2 méthylpropionamide) dihydrochloride (APPH)

Figure 51 : Cinétiques d'apparition des diènes conjugués dans le test AAPH

Figure 52 : Courbe dose-réponse obtenue à l'aide de la méthode des tangentes dans le test AAPH

Figure 53 : Structure chimique de la crocine

Figure 54 : Spectre d'absorption de l'extrait de crocine dilué dans du tampon phosphate de sodium 10 mmol/L pH 7,4

Figure 55 : Cinétique d'oxydation de la crocine (10 µmol/L) par l'AAPH (18,4 mmol/L) en présence d'antioxydant (λ = 438 nm)

Figure 56 : Puits de culture des cellules Caco-2

Figure 57 : Voltamogrammes des acides phénoliques dans les conditions d'analyse du café

Figure 58 : Chromatogrammes des Cafés expérimentaux extemporanés.

Figure 59 : Chromatogrammes des Cafés expérimentaux, sans hydrolyse alcaline.

Figure 60 : Chromatogrammes des Cafés expérimentaux, avec hydrolyse alcaline

Figure 61 : Pouvoir antioxydant du café expérimental et de café vert ou torréfié préparé par filtration déterminé par le test TAC, et contenu en acide chlorogénique des boissons

Figure 62 : Effet de la formation de complexes de nature covalente entre des protéines et de l'acide chlorogénique sur le pouvoir antioxydant de l'acide chlorogénique (test TAC)

Figure 63 : Effet de l'ajout extemporané de lait sur le pouvoir antioxydant des cafés expérimentaux

Figure 64 : Effet de l'ajout extemporané de lait demi-écrémé sur le pouvoir antioxydant de différentes solutions de café, déterminé par le test TAC

Figure 65 : Effet de la quantité de matière grasse du lait sur le pouvoir antioxydant de différentes solutions de café au lait

Figure 66 : Effets du mode de préparation sur le pouvoir antiradicalaire de différentes solutions de café au lait demi-écrémé, déterminé par le test DPPH

Figure 67 : Effets de l'ajout de lait et de l'atomisation sur le pouvoir antiradicalaire de différentes solutions de café.

Figure 68 : Part de l'acide chlorogénique dans le pouvoir antioxydant du café évalué par les différents tests de mesure du pouvoir antioxydant (DPPH, AAPH et TAC)

Figure 69 : Spectre d'absorption du café Carte Noire soluble dans l'eau

Figure 70 : Spectres de la « fraction PRM » éluée par la solution acide pendant la séparation du café sur colonne chromatographique LH-20, et étalon de PRM

Figure 71 : Spectres de la fraction méthanolique du café séparée sur colonne LH-20 et standards d'ACQ

Figure 72 : Spectres obtenus après séparation par ultrafiltration de la fraction PRM obtenue par chromatographie sur colonne Sephadex LH-20

Figure 73 : Pourcentage du pouvoir antioxydant du café Carte Noire soluble à 50 g/L dû aux fractions du café séparées sur colonne LH-20

Figure 74 : Recherche de synergies entre les fractions HCl du café et l'acide chlorogénique

Figure 75 : Pourcentages du pouvoir antioxydant du café Carte Noire dus aux produits de la réaction de Maillard, après séparation sur colonne chromatographique Sephadex LH-20 puis par ultrafiltration.

Figure 76 : Validation de l'ultrafiltration pour l'étude des interactions acide chlorogénique/protéines

Figure 77 : Cinétiques d'absorption sur cellules Caco-2 de l'acide chlorogénique après digestion in vitro, (a) seul (b) en présence de produits de la réaction de Maillard, (c) en présence de β-lactoglobuline, (d) en présence d'un mélange de caséines extraites du lait

Figure 78 : Statut antioxydant plasmatique des animaux après consommation des régimes expérimentaux pendant trois semaines

Figure 79 : Comparaison du statut antioxydant plasmatique du groupe « café au lait » analysé directement au test TAC ou après extraction à l'acétone, avec ou sans hydrolyse par un mélange sulfatase/β-glucuronidase

Figure 80 : Voie métabolique supposée des acides hydroxycinnamiques dans l'organisme (adapté de Rechner et al., 2001 ; Olthof et al., 2003)

Figure 81 : Chromatogramme d'un plasma témoin (rat n°4) traité par la méthode d'extraction, en présence du mélange sulfatase/β-glucuronidase

Figure 82 : Chromatogramme d'un mélange étalon composé d'acide trans-chlorogénique (1 µmol/L), d'acide trans-caféique (1 µmol/L) et d'acide trans-férulique (1 µmol/L)

Figure 83 : Voltamogrammes du composé non identifié issu plasma témoin (a) et des acides chlorogénique, caféique et férulique (b) et pour E1 = 300 mV (1 µA) et E2 variant entre 300 et 1000 mV (1 µA)

Figure 84 : Chromatogramme d'un plasma « café au lait » (rat n°13) traité par la méthode d'extraction mise au point sans hydrolyse par le mélange sulfatase/β-glucuronidase

Figure 85 : Chromatogramme d'un café Carte Noire à 20 g/L après extraction à l'acétate d'éthyle

Figure 86 : Concentration plasmatique en acide chlorogénique (ACQ, cis + trans) pour les différents groupes, avec ou sans hydrolyse par le mélange sulfatase/β-glucuronidase et extraction selon le protocole d'extraction retenu

Figure 87 : Concentration plasmatique en composé 7 exprimé en équivalent acide chlorogénique (ACQ) pour les différents groupes, avec ou sans hydrolyse par le mélange sulfatase/β-glucuronidase et extraction selon le protocole d'extraction retenu

Figure 88 : Spectres du composé n°7 obtenu par analyse CLHP/UV à barrettes de diodes à partir de plasmas des groupes café ou café au lait (A) et spectre de l'acide benzoïque (B)

Figure 89 : Recherche d'une corrélation entre les quantités d'acide chlorogénique retrouvées dans les plasmas et le pouvoir antioxydant observé par le test TAC dans ces mêmes plasmas

INTRODUCTION

Le régime méditerranéen a été associé grâce à des études épidémiologiques à un allongement de l'espérance de vie lié à une protection contre diverses pathologies (de Lorgeril et Salen, 2001 ; Renaud et de Lorgeril, 1992 ; Trichopoulou *et al.*, 2001 ; Visioli et Galli, 2002). Il a été suggéré que sa teneur importante en fruits et légumes, associée à sa pauvreté en graisses saturées et à une consommation modérée de produits laitiers et d'alcool, pourrait être à l'origine de la prévention des maladies cardio-vasculaires (MCV) (Ness et Powles, 1997) et de certains cancers (Block *et al.*, 1992 ; Willett, 2000). Des effets similaires ont été rapportés pour d'autres produits alimentaires, dérivés des végétaux, comme le thé (Geleijnse *et al.*, 1999), le vin (« paradoxe français ») (Renaud et de Lorgeril, 1992), ou les céréales complètes (Jacobs *et al.*, 1998 ; Jacobs *et al.*, 2000 ; Kasum *et al.*, 2001). Tous ces aliments ont un dénominateur commun : ils contiennent des polyphénols.

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, impliqués dans de nombreuses facettes de leurs systèmes biologiques : pigmentation, mécanismes de croissance et de reproduction, protection contre les prédateurs… Ces composés d'intérêt biologique sont principalement présents dans les végétaux (fruits, légumes, céréales…) et dans les produits qui en dérivent (vin, thé, bière, jus de fruits…) (Tableau I). Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un motif phénolique (cycle aromatique sur lequel viennent se greffer un ou plusieurs groupements –OH).

Une des particularités des polyphénols réside dans leur incroyable diversité, puisque l'on dénombre à l'heure actuelle plus de 8000 composés phénoliques, dont 5000 pour la sous-classe des flavonoïdes (Bravo, 1998). On peut cependant les rassembler en trois grands groupes, de la masse moléculaire la plus faible à la plus élevée : les acides phénoliques et composés phénoliques simples ; les flavonoïdes ; les tanins, condensés ou hydrolysables. D'autres composés, les stilbènes et les polyphénols de l'huile d'olive, ont été intégrés plus récemment (figure 1).

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet d'une littérature abondante. En effet, leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine seraient nombreuses : effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires, effets anti-inflammatoires, ou encore anti-viraux pour n'en citer que quelques-uns (Chung *et al.*, 1998a). Ils peuvent également participer à la bonne conservation de certains aliments transformés, comme l'huile d'olive, en limitant l'oxydation des lipides qu'ils contiennent (Servili *et al.*, 2004).

Les premières estimations évaluaient à 1 g par jour l'apport en composés phénoliques dans l'alimentation (Kunhau, 1976), mais l'affinement des techniques de dosage dans les aliments

(Scalbert et Williamson, 2000) et la prise en compte des variations dans les habitudes de consommation de produits végétaux d'un pays à l'autre (Manach, 1998) ont permis de réaliser qu'il n'était en fait pas possible de donner un chiffre exact pour la consommation totale de polyphénols tant celle-ci varie selon les aliments consommés et leur teneur en polyphénols (Bravo, 1998). Les enquêtes rapportent par exemple une consommation de flavones et de flavanones de l'ordre de 26 ± 15 mg/jour aux Pays-Bas (Keli *et al.*, 1996) ou de 68 mg/jour pour l'Etude des Sept Pays réalisée dans divers pays d'Europe et aux Etats-Unis (Hertog *et al.*, 1995), et une consommation de flavan-3-ols allant de 25 ± 32 mg/jour chez les femmes ménopausées de l'Iowa (Arts *et al.*, 2001a) à 50 ± 56 mg aux Pays-Bas (Arts *et al.*, 2001b) avec de fortes variations interindividuelles.

Parmi les nombreuses études épidémiologiques effectuées sur des populations très diverses (Arts *et al.*, 2001a ; Arts *et al.*, 2001b ; Arts *et al.*, 2001c ; Hertog *et al.*, 1993a ; Hertog *et al.*, 1993b ; Hirvonen *et al.*, 2001a ; Hirvonen *et al.*, 2000 ; Hirvonen *et al.*, 2001b ; Keli *et al.*, 1996 ; Knekt *et al.*, 1996 ; Knekt *et al.*, 1997 ; Rimm *et al.*, 1996a ; Rimm *et al.*, 1996b), seules quelques-unes montrent une corrélation inverse significative entre la consommation de flavonoïdes et les MCV (Hertog *et al.*, 1993a ; Hirvonen *et al.*, 2001a ; Keli *et al.*, 1996), ou le cancer (Hirvonen *et al.*, 2001b ; Knekt *et al.*, 1997), après correction par les facteurs de risques connus, les autres études allant en général dans le sens d'une diminution de la fréquence de ces pathologies, bien que les résultats ne soient pas significatifs.

Une autre approche consiste à évaluer l'effet des composés phénoliques sur les MCV et le cancer grâce à des modèles animaux ou par des études *in vitro*. A l'origine, les polyphénols (les flavonoïdes en particulier) ont surtout été considérés comme des molécules dangereuses pouvant être à l'origine de certaines mutations par altération de l'ADN (Formica et Regelson, 1995 ; I.S.L.I., 1999 ; Shirahata *et al.*, 1989). Cependant, il semblerait que ces effets délétères mis en évidence *in vitro* soient fortement dépendants des conditions de test, et soient rarement retrouvés *in vivo* (Formica et Regelson, 1995), compte-tenu notamment de la métabolisation importante de ces molécules dans l'organisme (Czeczot *et al.*, 1990).
Par la suite, il a au contraire été suggéré que le **pouvoir antiradicalaire des polyphénols** ainsi que leurs **propriétés chélatrices des métaux** participeraient à la protection de nombreuses structures (lipoprotéines, bicouches lipidiques, ADN…) (Cook et Samman, 1996 ; Meyer *et al.*, 1998), permettant ainsi de lutter contre les dégâts engendrés par les radicaux libres continuellement produits dans les cellules par des réactions enzymatiques ou chimiques

(Beauvieux *et al.*, 2002). Ces composés phénoliques seraient ainsi capables d'inhiber les différentes étapes du processus de cancérisation (Formica et Regelson, 1995 ; Fritz *et al.*, 1998). Les mécanismes d'action proposés sont **le piégeage de la substance cancérogène** (notamment par formation de complexes) ou la **modification de l'activité des enzymes impliquées dans la détoxification des cancérogènes**. Certains flavonoïdes par exemple peuvent agir en phase d'initiation (Heo *et al.*, 2001), en diminuant la production de radicaux libres ou en inhibant la cyclooxygénase et la lipoxygénase. Ces deux enzymes interviennent dans la synthèse des eicosanoïdes, notamment précurseurs de molécules biologiquement actives impliquées dans le processus de cancérisation et les MCV (Gusman *et al.*, 2001). D'autres composés phénoliques peuvent inhiber les phases de promotion et de progression de la cancérisation. Le resvératrol (Vercauteren *et al.*, 1999) et les composés du thé vert (I.S.L.I., 1999) sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire par induction de l'apoptose. Les flavan-3-ols pourraient inhiber la protéine kinase C ou d'autres kinases impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire.

De même, les composés phénoliques peuvent agir sur de nombreux processus impliqués dans le développement des MCV, par exemple en **inhibant l'oxydation des LDL** à l'origine de l'athérosclérose (Esterbauer et Ramos, 1995 ; Léger *et al.*, 2000). *In vitro*, parmi les flavonoïdes étudiés, les flavonols et les flavan-3-ols sont les plus efficaces (Da Silva *et al.*, 1998 ; Vinson *et al.*, 1995a ; Vinson *et al.*, 1995b), tandis que leurs dérivés glycosylés, ou les flavones et la génistéine, ont une activité plus faible.

De nombreux extraits végétaux et aliments testés chez le rat (thé vert (Yokozawa *et al.*, 2002), natto (Iwai *et al.*, 2002)), chez le hamster hyperlipidémique (mélange d'extrait de citron et d'acide ascorbique (Vinson *et al.*, 1998)), chez le lapin (thé vert ou noir (Tijburg *et al.*, 1997)) ou chez l'homme (vin rouge (Fuhrman *et al.*, 1995 ; Serafini *et al.*, 1998)) ont permis de montrer des effets similaires *in vivo*. Des extraits de vin rouge permettent d'inhiber la formation de pentanal et d'hexanal, composés volatils formés à l'issue des réactions d'oxydation des LDL (Frankel *et al.*, 1993), tandis que la consommation chronique (8 semaines) d'isoflavones aglycones réduit de manière significative la formation d'hydroperoxydes d'ester de cholestérol chez le lapin (Yamakoshi *et al.*, 2000).

Les composés agiraient également de manière indirecte, par **régénération des antioxydants vitaminiques** (α-tocophérol (Da Silva *et al.*, 1998)), **chélation des métaux** (Castelluccio *et al.*, 1996 ; Nardini *et al.*, 1995) ou encore en **modifiant la lipémie ou la cholestérolémie**, facteurs de risque bien connus responsables de l'apparition de maladies cardio-vasculaires (inhibition de l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse et la régulation du

cholestérol plasmatique (Bok *et al.*, 1999), réduction de la disponibilité du cholestérol exogène (Tijburg *et al.*, 1997), diminution des concentrations plasmatiques de LDL (Igarashi et Ohmuma, 1995 ; Vinson *et al.*, 1998)).

Les polyphénols pourraient également prévenir les MCV en intervenant sur **l'agrégation plaquettaire** à l'origine de thromboses (Janssen *et al.*, 1998 ; Pignatelli *et al.*, 2000). Cependant, ces effets montrés *in vitro* ne semblent pas directement transposables *in vivo* : les concentrations retrouvées dans le plasma des sujets ne sont probablement pas suffisantes pour diminuer l'agrégation *in vivo* (Janssen *et al.*, 1998). Les composés phénoliques agiraient à deux niveaux : soit en diminuant la concentration en radicaux libres, soit en inhibant les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique (Gusman *et al.*, 2001 ; Kinsella *et al.*, 1993). Ce dernier mécanisme est également celui de l'action des polyphénols sur les réactions inflammatoires.

Les polyphénols peuvent ainsi réduire ou bloquer de nombreux mécanismes impliqués dans la genèse ou l'amplification de pathologies cardio-vasculaires ou cancéreuses. Mais l'effet des composés phénoliques ne se limite pas à ces deux pathologies. En effet, ces composés pourraient également induire des **effets vasodilatateurs** (Kinsella *et al.*, 1993), exercer un **effet antimicrobien** (I.S.L.I., 1999) et une **action antivirale** par inhibition de la transcriptase reverse, **stimuler le système immunitaire** (Formica et Regelson, 1995), jouer **un rôle protecteur dans plusieurs maladies neuro-dégénératives** (Formica et Regelson, 1995 ; Spencer *et al.*, 2001 ; Sun *et al.*, 2002 ; Yan *et al.*, 2001), et **réduire le développement d'ulcères** par liaison avec certaines protéines de l'épithélium gastrique (Saito *et al.*, 1998).

Les données les plus récentes remettent partiellement en cause ces hypothèses, compte–tenu en particulier des faibles quantités détectées dans l'organisme : les doses physiologiques de la plupart des polyphénols seraient trop faibles pour qu'ils aient les effets qu'on leur attribuait jusqu'à maintenant. Cependant, ces doses détectées dans la circulation et les tissus sont largement suffisantes pour que les polyphénols puissent avoir un effet sur la **régulation de l'expression des gènes**, en particulier sur l'expression de la NF-κB (Comalada *et al.*, 2005 ; Reiterer *et al.*, 2004).

Il a par exemple été montré *in vitro* que des métabolites de la quercétine seraient capables de réguler la transcription et l'expression de l'ARNm de la cyclooxygénase dans les lymphocytes humains. Cependant ces résultats n'ont pas été retrouvés *in vivo* (de Pascual-Teresa *et al.*, 2004).

Dans le cas de l'asthérosclérose - due à l'accumulation d'une grande quantité d'oxy-cholestérol et de LDL hautement oxydées dans les macrophages, qui forment alors des

cellules spumeuses à l'origine de la plaque d'athérome - certains polyphénols, comme ceux de l'huile d'olive, seraient capables de réduire l'oxydation des LDL, non pas par un mécanisme antiradicalaire direct comme on l'a longtemps supposé, mais en augmentant la transcription de l'ARNm d'enzymes en lien avec le glutathion (Masella *et al.*, 2004). De plus, lors des premières étapes de la formation de la plaque d'athérome, l'intégration des LDL oxydées dans les macrophages est réalisée *via* le récepteur membranaire CD-36, dont la synthèse est activée par l'angiotensine II, produite par les macrophages. Cette dernière peut également former des complexes avec les LDL oxydées, qui sont alors encore plus facilement intégrées dans les macrophages et stimulent également la transcription de l'ARNm codant pour le récepteur CD-36. Il a été montré que des dérivés 4-O-méthylés de l'acide gallique pouvaient agir d'une part sur la synthèse d'angiotensine II, en régulant la synthèse des enzymes de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II ; et d'autre part inhiber directement l'expression génétique de l'ARNm des récepteurs CD-36 (Oliveira *et al.*, 2004).

L'action de l'angiotensine II est également régulée par la voie du NFκB. Cet activateur de la transcription, présent dans de nombreuses cellules, agit également sur de multiples gènes, activant prolifération et différenciation cellulaires. Son dysfonctionnement provoque des chocs anaphylactiques et des réactions inflammatoires. Il serait également impliqué dans la propagation de certains cancers par son contrôle de l'expression de diverses cytokines intervenant dans l'apparition des métastases (Natarajan *et al.*, 1996). Il a été montré que l'activation du NFκB était entre autres inhibée par certains phényl-esters de l'acide caféique (Natarajan *et al.*, 1996), ou encore par la quercétine (Comalada *et al.*, 2005). La régulation de ce facteur de transcription par l'acide chlorogénique pourrait également expliquer les propriétés anticancéreuses de ce dernier, mises en évidence sur modèle animal (Feng *et al.*, 2005).

Les polyphénols sont donc impliqués dans de nombreux mécanismes pouvant avoir une incidence postive sur la santé. Cependant, avant de conclure sur leur activité bénéfique réelle, il reste indipensable de réaliser des études de **biodisponibilité**. La proportion « biodisponible » d'un composé actif désigne la quantité de ce composé qui est **disponible** pour exercer une action bénéfique dans l'organisme. Le terme « biodisponibilité » recouvre donc les étapes d'absorption, de métabolisation, de stockage et d'excrétion de ce composé, la finalité étant la détermination de la **quantité finale disponible sous forme active dans l'organisme**.

La diversité naturelle des polyphénols étant à l'origine de différences importantes, en particulier au niveau de l'absorption, et ce également au sein d'une même famille, il n'est pas

possible de tirer des conclusions générales concernant « les effets des polyphénols sur l'organisme » : par exemple, les effets bénéfiques des composés les mieux absorbés pourront être mis en relation avec leurs effets antioxydants, si la dose retrouvée dans le plasma est suffisamment importante pour correspondre aux doses utilisées *in vitro*.

La biodisponibilité des composés phénoliques est restée pendant très longtemps méconnue : les études réalisées au cours des années 1960 à 1980 utilisaient pour la plupart des flavonoïdes aglycones, qui ne représentent pas les formes les plus abondantes des aliments. De plus, elles mettaient en œuvre des doses élevées de polyphénols (en raison de la faible sensibilité des méthodes analytiques), ce qui pouvait modifier leur répartition dans les différents compartiments (urine, fèces, tissus…). Enfin, l'identification s'avérait difficile lorsque les standards commerciaux n'étaient pas disponibles. Ces premières études ont cependant permis de faire avancer les connaissances sur le rôle de la flore intestinale dans la métabolisation des polyphénols. Depuis une vingtaine d'années, la plus grande sensibilité des techniques analytiques a permis de doser les métabolites plasmatiques après ingestion de teneurs proches des quantités habituellement ingérées.

Lorsqu'un polyphénol est ingéré, il traverse plusieurs compartiments dans lesquels il peut être métabolisé, accumulé ou éliminé (figure 2). Dans l'organisme, le mécanisme de métabolisation au niveau des entérocytes et du foie a pour conséquence de diminuer la toxicité de molécules qui lui sont étrangères (Vander *et al.*, 1995). Deux grandes phases de détoxification sont à distinguer, communes à l'ensemble des xénobiotiques :

- La phase I a pour finalité d'augmenter la polarité des phénols. Elle procède selon les mécanismes suivants : hydroxylation des cycles aromatiques et des chaînes aliphatiques, N-désalkylation, O-désalkylation, S-désalkylation, sulfoxydation, désulfuration, désamination, déshalogénation (Smith et Reynard, 1995). Ces réactions peuvent avoir lieu dans tous les tissus, exceptés les muscles et le tissu adipeux. Les polyphénols sont assez peu affectés par cette voie de détoxification.

- La phase II assure la conjugaison des molécules, l'augmentation de leur polarité facilitant leur élimination. Parmi les enzymes de phase II, l'uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférase (UGT) transfère un acide glucuronique, et la phénolsulfotransférase (PST) un groupement sulfate.

Le foie renferme la totalité des enzymes citées précédemment, mais son activité UGT est 7 fois plus faible que dans l'intestin grêle (Piskula et Terao, 1998a). Il serait le principal mais non le seul site de la sulfatation (Dooley *et al.*, 2000), et peut également participer au stockage de certains composés. Il constitue la première étape de l'élimination par voie biliaire

et du cycle entéro-hépatique. Les possibilités de métabolisation dans le tube digestif ne s'arrêtent pas à l'action des entérocytes ou du foie. En effet, les polyphénols sont intensivement dégradés par la flore intestinale. Des études ont par ailleurs montré que certaines enzymes de la paroi intestinale possédaient également une activité hydrolytique vis-à-vis des flavonoïdes glycosylés (Day *et al.*, 1999). L'ensemble de ces métabolites peut être ensuite réabsorbé au niveau du côlon et métabolisé dans l'organisme.

Ainsi, l'évaluation de la biodisponibilité d'un composé phénolique présent dans un aliment nécessite d'étudier à la fois son absorption, sa métabolisation et les effets sur le stress oxydatif provoqués par un grand nombre de produits de dégradation. La plupart des polyphénols suivent les voies de métabolisation tissulaire ou intestinale. Cependant, en fonction de leur nature, de leur polarité, de leur charge ou de leur niveau d'oxydation, l'importance de chacune des voies de métabolisation possibles varie. L'un des facteurs clé déterminant la première étape, l'absorption, est le rôle de la matrice alimentaire sur le comportement du polyphénol. Dans cette dernière, les polyphénols peuvent en effet interagir avec les macronutriments qu'elle contient. Ces interactions sont multiples et susceptibles de se produire à plusieurs niveaux :

- Dans les fruits et légumes avant transformation : il peut alors s'agir d'interactions constitutives, en rapport avec la structure de l'organe végétal (cas des fibres alimentaires)
- Dans les produits alimentaires dérivés des fruits et légumes, tels que les boissons (vin, jus de fruits, cidre, bière, thé, café), les aliments solides (compotes, confitures), ou même les aliments fonctionnels « enrichis en polyphénols » plus ou moins purifiés au préalable : dans ce cas, un certain nombre d'interactions plus ou moins désirables sont susceptibles de se produire lors des procédés de fabrication ou lors de la conservation (brunissement enzymatique, formation de trouble dans les boissons…)
- Dans le bol alimentaire lui-même : l'aliment n'est pas toujours consommé tel quel. Ainsi le fruit peut être pelé, découpé, cuit ou frit avant consommation, la confiture est consommée avec du pain, le café avec du lait…Autant de nouvelles occasions pour les interactions de se créer, dans l'aliment avant consommation, ou lors du tractus gastro-intestinal.

Il est donc important de connaître la nature de ces interactions et leurs effets sur le pouvoir antioxydant, ainsi que sur la biodisponibilité des polyphénols.

Afin d'évaluer l'influence de la matrice alimentaire et des traitements technologiques sur la biodisponibilité et la fonctionnalité des acides phénoliques, nous avons choisi le café comme système d'étude. Il s'agit d'un aliment largement consommé partout dans le monde : chaque jour, 1,5 milliard de tasses y sont consommées. La France, avec 0,31 millions de tonnes consommés par an, fait partie des 5 pays consommant le plus de café, derrière le Japon (0,35 millions de tonnes), l'Allemagne (0,56 millions de tonnes), le Brésil (0,81 millions de tonnes), et les Etats-Unis (1,09 millions de tonnes), selon l'International Coffee Organization. La production en 2002 est majoritairement localisée au Brésil (2,4 millions de tonnes par an), suivi du Vietnam (0,85 millions de tonnes par an), de la Colombie (0,66 millions de tonnes par an), de l'Indonésie (0,37 millions de tonnes par an) et du Mexique (0,32 millions de tonnes par an), selon la Food and Agriculture Organization of the United Nations. La culture du café représente un enjeu économique majeur puisqu'elle est longtemps demeurée la seconde production mondiale, en terme d'échanges commerciaux, après le pétrole, et représente de 20 à 25 millions d'exploitations, situées dans 70 pays producteurs de la zone tropicale humide (source : International Coffee Organization).

Le café (en tant que boisson) présente l'avantage de posséder un profil phénolique simple, majoritairement représenté par l'acide chlorogénique (dérivé hydroxycinnamique): de 250 et 750 mg/L (Clifford, 2000). Ce dernier, forme dérivée de l'acide caféique par estérification en position 5 par l'acide quinique, se trouve également dans d'autres fruits et légumes: le kiwi, le cassis et l'aubergine ont des teneurs supérieures à 500 mg/kg de poids frais et les pommes, les poires, les pêches et les prunes ont des teneurs comprises entre 50 et 500 mg/kg (Macheix *et al.*, 1990).

Le grain de café vert contient 6 à 10% en matière sèche d'acides hydroxycinnamiques (Clifford, 2000). Cependant, une partie de ce pool phénolique est perdu lors de la torréfaction : on observe de 60 à 100% de pertes selon l'intensité de cette dernière (Herrmann, 1989). La torréfaction, qui a lieu après que le grain ait été séparé du fruit, séché et trié, consiste en un traitement des grains par la chaleur sèche et élevée. Elle permet au café d'acquérir l'essentiel de ses qualités organoleptiques.

Il existe différents types de torréfaction. Lors de la torréfaction traditionnelle, la chaleur diffuse au travers d'un four constitué de briques et dalles réfractaires. Le café vert est introduit dans le cylindre dont la température est de 220°C. L'arrivée de cette masse de matière froide la fait chuter à 100°C. Elle va remonter à 220°C en 20 minutes. A 100°C, les grains de café jaunissent et se déhydratent. De 120°C à 150°C, leur teinte vire du jaune au châtain clair et au roux, leurs fentes s'ouvrent et libèrent une huile essentielle, la caféone. A 200°C, la

pyrogénisation dégage une fumée bleue, les grains deviennent brun-marron. A 220°C, le point critique est atteint : le café est alors refroidi rapidement, soit à l'air, soit à l'eau. Un autre procédé consiste en une torréfaction rapide qui dure dix minutes : le café est placé dans des "tours" où un air à une température très élevée (600°C) est pulsé puissamment par des turbines. Le café est mis en mouvement par ce flux d'air et est torréfié en 10 minutes. On stoppe donc la cuisson au moment précis où vont se produire les réactions de Maillard. On obtient ainsi un café qui a changé de pigmentation, perdu son acidité, gagné de l'amertume, mais qui a à peine développé 30 % de ses arômes. Enfin, la torréfaction " flash ", ne dure que 90 secondes. Le café passe dans un tunnel composé de centaines d'injecteurs propulsant de l'air à 880°C et qui le torréfient en 90 secondes. A cette température et à cette vitesse, les réactions de Maillard ne peuvent se produire. Le café est simplement carbonisé sur sa surface et cru à l'intérieur. Il est également refroidi à l'eau. Il s'agit de la plus mauvaise méthode de torréfaction, mais c'est aussi la plus économique, d'où son utilisation par les grands torréfacteurs mondiaux (Debry, 1993).

Lors de la torréfaction traditionnelle, la composition du grain de café évolue. Si la composition en minéraux (4,5 g / 100 g de matière sèche dans un café *Arabica* moyennement torréfié) du grain torréfié reste similaire à celle du grain de café vert, en revanche celle des glucides et des lipides est différente. Sous l'effet de la chaleur, quand il n'y a plus d'eau (dixième minute du procédé traditionnel), les sucres et les acides développent plus de 1000 arômes via les réactions de Maillard. Un café *Arabica* moyennement torréfié peut ainsi contenir jusqu'à 23 g/100 g de matière sèche de produits de la réaction de Maillard. La matière grasse, quant à elle, fournit une faible quantité des matières volatiles et contribue à fixer les arômes au grain. La teneur en lipides d'un café *Arabica* moyennement torréfié est d'environ 17 g / 100 g de matière sèche, mais la majorité de cette matière grasse est éliminée par la filtration lors de la préparation du café, ce qui différencie les cafés obtenus par filtration des cafés obtenus en faisant simplement bouillir les grains moulus dans l'eau, tels que le café dit "à la turque". A l'issue de la torréfaction, ce café *Arabica* moyennement torréfié contient également 1,0 g / 100 g de matière sèche de trigonelline, 0,3 g / 100 g de matière sèche de sucres réducteurs, 33,0 g / 100 g de matière sèche de polysaccharides inchangés du café vert, 2,0 g / 100 g de matière sèche de lignine, 3,0 g / 100 g de matière sèche de pectines, et 10,0 g / 100 g de matière sèche de protéines. Enfin, la teneur en caféine (1,3 g / 100 g de matière sèche, et 370-1315 mg/L de boisson café) n'est presque pas altérée par le procédé (Debry, 1993). Les produits de la réaction de Maillard du café font actuellement l'objet d'études, concernant notamment leur propriétés antioxydantes (Anese et Nicoli, 2003 ;

Borrelli *et al.*, 2002 ; Jing et Kitts, 2004a ; Jing et Kitts, 2004b ; López-Galilea *et al.*, 2005 ; Nicoli *et al.*, 1997 ; Sánchez-González *et al.*, 2005 ; Yanagimoto *et al.*, 2002 ; Yen *et al.*, 2005). Leur présence donne au café un second intérêt en tant que système d'étude présentant un pouvoir antioxydant.

Nous avons choisi d'utiliser du café soluble, pour des raisons évidentes de répétabilité dans les préparations. Il s'agit d'un type de café préparé industriellement dans un percolateur de 3 000 litres. La percolation consiste à faire passer de l'eau douce à 160-180°C, en continu ou en semi-continu et à contre-courant, dans le café moulu, placé dans des colonnes de percolation. L'eau chaude passe d'abord sous pression (14 à 16 bars) dans les colonnes où le café a subi le plus d'extraction (système à contre courant), puis atteint celles qui viennent d'être remplies de café moulu. L'eau est alors à 100°C. La boisson ainsi préparée est rapidement refroidie à 5°C pour éviter les pertes de composés volatils et le développement microbien. Elle peut être ensuite atomisée : on la pulvérise le plus finement possible en haut d'une tour, et simultanément, par le bas, on insuffle dans cette tour un air très chaud : quand les deux corps entrent en contact, l'eau du café s'évapore et on obtient une poudre soluble ayant un léger goût de caramel. Un autre procédé couramment utilisé pour la préparation de café soluble est la lyophilisation : de la même façon, 3000 litres de café sont préparés puis congelés à -40°C. On constitue ainsi des barres de café congelé qui sont alors moulues finement et placées dans une chambre de lyophilisation où l'on réalise un vide partiel (jusqu'à - 0,66 millibars) à 45-50°C. L'eau se sublime alors pour donner une poudre soluble, plus aromatique que son équivalent atomisé, d'autant plus que la législation permet d'y ajouter des composés aromatiques volatiles évaporés et récupérés lors de la torréfaction (Debry, 1993).

Enfin, le café soluble utilisé dans cette étude a été choisi décaféiné, afin de pouvoir être administré à des animaux sans effets secondaires dus à la caféine. Cette dernière est en effet responsable de nombre d'effets du café sur la santé humaine. Elle agit notamment sur le cerveau (action vasoconstrictrice sur la circulation cérébrale qui allonge la durée de vigilance et retarde l'apparition de la sensation de fatigue, prévient les migraines, diminue l'intensité des crises et potentialise l'effet analgésique de l'aspirine), les muscles (excitation du système nerveux central, accroissement de l'endurance, retardement de l'apparition de la sensation de fatigue), les poumons (action broncho-dilatatrice qui prévient les crises d'asthme) ou les reins (action diurétique) (Dorea et da Costa, 2005). D'autre part, la caféine est susceptible d'interagir avec l'acide chlorogénique dans le café vert, et le devenir de cette interaction lors de la torréfaction n'est pas connu (Herrmann, 1989). Le café décaféiné apparaissait donc comme étant plus adapté à notre étude. Pour avoir droit à l'appellation "décaféiné", un café ne

doit pas contenir plus de 0,01 % de caféine. La décaféinisation s'effectue sur le café vert, soit par la technique de partage eau-solvant, soit par adsorption de la caféine. La première méthode consiste à faire gonfler le café à la vapeur d'eau, ce qui permet de solubiliser la caféine, qui est ensuite extraite par des solvants non polaires tels que le chlorure de méthylène. Le solvant est ensuite éliminé par un courant de vapeur d'eau. Cette méthode présente l'inconvénient de mettre en jeu des solvants plus ou moins toxiques, ce qui implique un risque potentiel pour la santé humaine.

La méthode par adsorption, ou procédé de Zosel, consiste à extraire la caféine par adsorption sur du gaz carbonique en phase super-critique à 31,06°C et à 60 Bars. Le gaz traverse les grains de café et se charge en caféine. La phase chargée en caféine est alors traitée avec de l'eau à 70°C-90°C qui entraîne la caféine. Le gaz est ensuite recyclé puis réinjecté sur les grains jusqu'à l'extraction complète de la caféine. D'autre gaz tels que le propane, ainsi que des résines échangeuses d'ions peuvent également être utilisés pour ce procédé, qui est le plus utilisé dans l'industrie alimentaire (Ramalakshmi, 1999).

Enfin, notre choix s'est porté sur le café car cet aliment est fréquemment consommé en présence de lait, ce qui permet de disposer d'un « aliment modèle » pour étudier l'influence des protéines laitières sur la biodisponibilité des acides phénoliques. Ainsi, la matrice alimentaire « café au lait » préparée extemporanément ou obtenue après un procédé d'atomisation a été retenue.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au pouvoir antioxydant de la boisson elle-même, dans les différentes conditions de préparation (ajout de lait, atomisation, chauffage…), puis nous avons cherché à déterminer s'il se formait des interactions entre les acides phénoliques du café et les protéines laitières. Le devenir de ces interactions lors du tractus digestif a ensuite été étudié *in vitro*. Finalement, une étude de biodisponibilité de l'acide chlorogénique du café dans différentes conditions de préparation, a été menée *in vivo*, et les effets santé ont été brièvement explorés.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans une première partie, nous nous attacherons à décrire la nature des interactions polyphénols/macronutriments. Nous nous intéresserons ensuite aux effets de ces interactions sur le pouvoir antioxydant des polyphénols dans une deuxième partie. Enfin, la troisième partie de cette étude bibliographique sera consacrée aux effets de ces interactions sur la biodisponibilité des polyphénols.

I. INTERACTIONS POLYPHENOLS/MACRONUTRIMENTS : LEUR NATURE

Dans cette première partie, nous nous intéresserons à la nature chimique de ces interactions, en distinguant deux grands types d'interactions :

- des interactions « spécifiques », se produisant entre polyphénols et macronutriments ;
- des interactions « non spécifiques », en lien avec la solubilité des polyphénols dans la matrice.

I.1. INTERACTIONS « SPECIFIQUES »

I.1.1. Interactions avec les protéines :

L'élucidation des mécanismes de formation et de la nature des interactions protéines - polyphénols n'est pas un sujet d'étude récent. En effet, l'utilisation ancestrale et empirique de ce phénomène dans le tannage du cuir amenait Sir Humphry Davy, dès 1803, à définir le terme "tanin" pour désigner la "matière astringente des végétaux" utilisée dans ce procédé. L'évolution des méthodes de mesure a permis depuis de mieux caractériser ces interactions et de réaliser ainsi que ces complexes, s'ils sont largement présents dans l'industrie alimentaire, sont aussi largement impliqués dans bon nombre de phénomènes biologiques, tels que la formation de l'exosquelette des insectes, de l'humus ou encore dans la nécrose des tissus végétaux (Haslam *et al.*, 1992).

De même, historiquement, de nombreuses études se sont intéressées au devenir des polyphénols dans le tractus gastro-intestinal, les considérant souvent comme des composés anti-nutritionnels. Ceci concerne en particulier les tanins (Butler *et al.*, 1984 ; Mitaru *et al.*, 1984 ; Reddy et Pierson, 1985) et dans une moindre mesure les composés de masse moléculaire plus faible, comme la (+)-catéchine, qui les accompagnent (Eggum *et al.*, 1983). Ils seraient notamment à l'origine d'une altération de la digestion des protéines (augmentation de l'excrétion azotée, (Reddy et Pierson, 1985)), et provoqueraient une diminution du gain de poids chez le rat (Chung *et al.*, 1998b). Plusieurs hypothèses ont été suggérées pour expliquer ces résultats :

- Une complexation des protéines alimentaires par les polyphénols. Cette complexation les rendant moins accessibles à l'action des enzymes digestives, les protéines alimentaires seraient donc moins bien digérées. Ainsi, chez des rats soumis pendant 5 semaines à un régime enrichi en tanins condensés extraits de téguments de caroube, on observe une augmentation de l'excrétion azotée urinaire et fécale, une augmentation de la masse fécale totale ainsi qu'une diminution du gain de poids des animaux. La digestibilité apparente des protéines du régime est également affectée par la présence des tanins (Bravo *et al.*, 1993).
- Une diminution de l'activité enzymatique par complexation des enzymes digestives par les polyphénols (Chung *et al.*, 1998b). Une étude réalisée *in vivo* sur des rats ayant ingéré un régime enrichi en tanins, montre une diminution de l'activité enzymatique de deux enzymes du système digestif (trypsine et α-amylase) par rapport à un témoin n'ayant pas reçu ces polyphénols (figure 3, Griffith et Moseley, 1980). De plus, l'ajout de polyvinylpolyrrolidone dans le milieu réactionnel, agent connu pour sa capacité à fixer les polyphénols, permet de retrouver une activité enzymatique identique à celle constatée pour le témoin dans le cas de la trypsine. Un mécanisme d'inhibition non compétitive serait mis en cause. Cependant, quantitativement, l'hypothèse de l'altération de la digestion des protéines par une diminution de l'activité enzymatique ne saurait expliquer à elle seule une telle augmentation de la quantité d'azote fécal.
- Une origine endogène des protéines excrétées au niveau fécal et urinaire suite à l'ingestion des polyphénols (Shahkhalili *et al.*, 1990). Des rats soumis pendant huit jours à un régime enrichi en thé noir, ont été perfusés avec de la ^{15}N-glycine, afin d'effectuer un marquage isotopique des protéines endogènes. Le régime a été poursuivi pendant quatre jours durant lesquels les fèces ont été recueillis puis analysés. Cette analyse a révélé la présence d'azote isotopique en proportion directement corrélée à l'augmentation de l'azote fécal total due aux tanins du thé noir, ce qui permet de valider cette troisième hypothèse (figure 4).

Ainsi, dans l'organisme, il existe trois sites de formation de complexes protéines - polyphénols : la bouche (phénomène d'astringence), l'estomac et l'intestin. Mais de tels complexes sont également susceptibles de se former dans l'aliment.

De fait, qu'il s'agisse de complexes formés dans un organisme animal ou végétal, ou de complexes résultant d'un procédé de fabrication, les mécanismes sont divers et plus ou moins bien élucidés. On dispose de données assez précises concernant les interactions de polyphénols avec des protéines « organisées » telles que la sérum albumine bovine, dont les constantes d'affinité pour de nombreuses molécules telles qu'acides phénoliques ou

quercétine ont été calculées (Dufour et Dangles, 2005 ; Papadopoulou *et al.*, 2005 ; Prigent *et al.*, 2003). En revanche, la compréhension des interactions avec les protéines à structure déployée (« random coil »), telles que les protéines salivaires demeure plus délicate, même si de nombreuses études ont été réalisées sur ce thème.

On peut néanmoins distinguer deux grands types d'interactions :

- Des interactions réversibles : formation par liaisons de faible énergie de complexes solubles qui finissent par précipiter (figure 5). Il s'agit soit des complexes se formant dans l'organisme lorsque les polyphénols sont ingérés non complexés, soit de la première étape de la formation des complexes trouvés dans les aliments (Haslam et Lilley, 1988) ;
- Des interactions irréversibles : formation de complexes comportant des liaisons covalentes, dont la formation peut impliquer des phénomènes d'oxydation. Elles se rencontrent plutôt dans des aliments ayant subi une transformation industrielle : bière, jus de fruits.

I.1.1.1. La complexation réversible

I.1.1.1.1. Interactions des polyphénols avec les protéines à structure déployée: le phénomène d'astringence

Lorsque l'on consomme des produits riches en polyphénols tels que le vin rouge jeune ou des fruits encore verts, on ressent souvent une sensation râpeuse sur la langue associée à une sécheresse buccale et à un sentiment de contraction du palais. Ces sensations, non immédiates, ne sont pas circonscrites à une région particulière de la bouche, ce qui suggère qu'elles ne sont pas dues à un phénomène classique d'interaction avec des bourgeons gustatifs. En revanche, la sensation de sécheresse buccale laisse supposer une implication de la salive dans le phénomène. Ces observations s'appliquent également à de nombreux remèdes astringents utilisés dans la médecine chinoise comme agents anti-diarrhéiques ou anti-hémorragiques, remèdes dont on considère en général les polyphénols comme étant les principes actifs (Haslam et Lilley, 1988). Ces utilisations médicales impliquant une liaison des protéines avec les polyphénols, un rapprochement avec une précipitation possible des protéines salivaires par les polyphénols dans le cas des sensations décrites ci-dessus, a rapidement été établi.

Ce mode d'action a donné son nom à ce phénomène : l'astringence, du latin *ad* (vers) et *stringere* (lier). Ces interactions ont été largement étudiées et la littérature abondante existante sur ce phénomène fournit de nombreuses clés de compréhension concernant les phénomènes d'interactions réversibles susceptibles de se produire entre ces protéines à structure déployée

et les polyphénols, aussi bien dans l'aliment que dans l'organisme. En effet, les observations réalisées sur les protéines salivaires semblent généralisables aux interactions des polyphénols avec les protéines à structure déployée.

⇒ Influence de la nature du polyphénol ingéré

Les composés phénoliques qui provoquent l'astringence sont essentiellement les tanins condensés tels que les procyanidines présentes dans les fruits et légumes (Haslam et Lilley, 1988). Dans une moindre mesure, on trouve également les tanins hydrolysables de certaines noix et plantes médicinales (Bacon et Rhodes, 2000) tels que l'acide tannique ou les dérivés formés par condensation et oxydation enzymatique des polyphénols lors de la fabrication du thé noir tels que la théaflavine et la théarubigine.

La plupart des travaux consacrés à l'étude du phénomène d'astringence font ressortir **l'importance de la taille des composés polyphénoliques**. Ainsi, plus le degré de polymérisation de la molécule est important, et plus la sensation d'amertume également ressentie lors de la consommation de tanins s'efface au profit de la sensation d'astringence (Cheynier, 2000) (figure 6). De même, la capacité de précipitation des protéines par les procyanidines augmente avec le degré de polymérisation de ces dernières (Freitas et Mateus, 2001). Cependant, d'autres hypothèses font également intervenir certains composés phénoliques de masse moléculaire plus faible tels que le pyrogallol, le résorcinol ou encore l'acide chlorogénique (Haslam et Lilley, 1988). Les données relatives à l'astringence de monomères sont pourtant très contradictoires (Tableau II). La plupart des travaux relevant de l'astringence des monomères ont cependant été réalisés en présence de concentrations excessives de (+)-catéchine ou de (-)-épicatéchine, comparativement au seuil de perception. Bien que longtemps négligées, ces molécules peuvent participer à l'astringence pour une part non négligeable puisque le phénomène de complexation / précipitation nécessite uniquement la présence du groupement phénolique, à condition de se trouver en concentration suffisante dans le milieu (Haslam et Lilley, 1988).

⇒Proximité des groupements OH sur le composé phénolique

La proximité des groupements phénoliques sur la molécule semble favoriser la solidité de la liaison formée, comme cela a été mis en évidence par microcalorimétrie, méthode dans laquelle on évalue l'enthalpie libre de transfert de la protéine d'une solution aqueuse à une solution contenant un ligand, ici polyphénolique (Siebert, 1999). Ainsi, si l'on représente les quantités d'énergie libre mesurées lors de la liaison de molécules comportant différents motifs

phénoliques à de la sérum albumine bovine, on remarque que les *o*-diphénols forment des complexes plus solides que les *m*-diphénols, et que les meilleurs résultats sont obtenus avec des triphénols.

⇒Les protéines salivaires : l'importance du résidu proline

Les protéines salivaires impliquées dans l'astringence seraient essentiellement des **protéines riches en proline**. Il a été montré que la consommation prolongée (3 jours minimum) d'aliments riches en tanins pouvait induire chez le rat une hypertrophie de la glande parotide sécrétant la salive (figure 7.a), ainsi que la sécrétion de nouvelles glycoprotéines (figure 7.b) dont le contenu en acides aminés est caractérisé par une grande richesse en proline, en acide glutamique et en glycine et une déficience en acides aminés soufrés (tableau III) (Mehansho *et al.*, 1985). Ces protéines, ne représentant en temps normal que 10 % des protéines salivaires, ont neuf fois plus d'affinité pour les tanins que la sérum albumine bovine lorsqu'on les met en compétition pour la fixation à ces derniers. Leur sécrétion serait induite par un gène situé sur le chromosome 8 du rat (Mehansho *et al.*, 1985).

Chez l'homme en revanche, ces protéines sont constitutives et peuvent représenter jusqu'à 70 % des protéines de la salive. Elles y coexistent sous trois formes : acide, basique et glycosylée. S'il n'a pas été possible d'attribuer un rôle spécifique à chacune d'elles, on remarque que les protéines de la fraction basique, les plus riches en proline, ont une affinité plus forte que les autres pour les tanins hydrolysables (Bacon et Rhodes, 2000).

Cette importance de la richesse en proline semble être un caractère déterminant dans les phénomènes de complexation réversible entre protéines et composés phénoliques, d'une manière plus générale qu'au simple niveau buccal. En effet, lorsque l'on ajoute différents homopolymères d'acides aminés à une solution de (+)-catéchine, les peptides les plus à même de former un trouble sont de type polyproline (figure 8), la plupart des autres polymères testés formant peu ou pas de trouble (Siebert *et al.*, 1996).

La proline serait ainsi le constituant majeur d'un site de liaison aux polyphénols constitué de un à dix acides aminés selon la taille du polyphénol à lier (Charlton *et al.*, 2002). Le résidu proline possède un hétérocycle rigide incluant le groupement amine impliqué dans la liaison peptidique. Cette particularité structurale imprime aux chaînes polypeptidiques contenant ce résidu une courbure dans l'espace, ce qui peut participer à la formation de "poches hydrophobes" (figure 9). On peut de plus noter que la turbidité augmente avec le nombre de carbones dans les chaînes latérales aliphatiques des résidus, ce qui est corrélé avec l'hydrophobie des résidus acides aminés (Oh *et al.*, 1980).

⇒ **Structure et flexibilité des différents intervenants**

La **capacité des polyphénols à changer de conformation** et la **présence de groupements phénoliques accessibles** semblent être également importantes (Freitas et Mateus, 2001). De même, la déglycosylation des protéines salivaires riches en proline, qui conduit à une conformation plus compacte, réduit l'affinité de ces protéines pour les tanins (Asquith *et al.*, 1987). Une structure flexible de la protéine favoriserait donc également les interactions.

La flexibilité, notamment la capacité à changer d'organisation spatiale, semble être de manière générale un des facteurs clés dans le phénomène de complexation. Par exemple, la formation de liaisons biphényles intramoléculaires au sein du D-galloyl-glucose réduit considérablement la flexibilité de la molécule (figure 10) ainsi que sa capacité à se lier aux protéines (Spencer *et al.*, 1988).

⇒**Importance des concentrations relatives des différents protagonistes**

Haslam et Lilley (1988) rapportent que lorsque la concentration en protéines est faible par rapport à la concentration en composés phénoliques, on observe une perte de solubilité de la protéine et la formation de particules de faible taille dans le cas des composés polyphénoliques, alors que dans le cas de monophénols, on constate seulement une diminution rapide du caractère hydrophile de la protéine. Cette diminution du caractère hydrophile, observée en présence de mono- ou de polyphénols, serait due à la fixation des composés phénoliques sur toute la surface extérieure de la protéine (figure 11). D'autres travaux sur l'astringence (interactions protéines salivaires/polyphénols du thé) confirment cette hypothèse grâce à des données obtenues par Résonance Magnétique Nucléaire, et montrent de plus l'existence d'un seuil critique de recouvrement de la protéine par les composés phénoliques (Charlton *et al.*, 2002). Lorsque ce seuil est atteint, une précipitation expliquant le changement observable de la stœchiométrie des agrégats intervient rapidement : une concentration plus importante en polyphénols est nécessaire pour faire précipiter les protéines dans une solution où elles sont diluées, par rapport à une solution dans laquelle elles sont concentrées. Toutefois, en présence d'un excès de protéines, on observe la redissolution des complexes. Ce phénomène a été expliqué par une agrégation des protéines dans laquelle les polyphénols agiraient comme ligands à sites de liaisons multiples et feraient diminuer le caractère hydrophile de l'agrégat en surface, ce qui se traduirait par sa précipitation (figure 11) (Haslam et Lilley, 1988).

Dans tous les cas, les auteurs suggèrent que ces complexations protéines - polyphénols mettent essentiellement en jeu **un phénomène de surface (collage)**.

⇒ **Détermination de la nature des liaisons impliquées**

Plusieurs expériences de modification de divers paramètres du milieu réactionnel ont permis de mieux comprendre la nature des liaisons entre protéines et polyphénols dans le phénomène d'astringence.

- *Influence du pH de l'environnement*

Le pH de la salive influence le phénomène d'astringence : l'ajout d'acide malique jusqu'à un pH de 3,5 augmenterait l'intensité maximale et la persistance de la sensation d'astringence (Kallithraka *et al.*, 1997). La consommation conjuguée d'aliments acides et astringents pourrait donc accentuer d'autant plus ces phénomènes d'interactions.

Selon certains travaux (Naczk *et al.*, 1996), le pH optimal de précipitation de différentes protéines avec des tanins condensés se trouve à 0,3 unités pH en dessous de leur pH isoélectrique, soit à un pH compris entre 2 et 5 pour les quatre protéines testées : fétuine, pepsine, sérum albumine bovine et gélatine (figure 12). Ceci suggère que le phénomène de précipitation serait favorisé par la neutralité globale de la protéine et que **la nature des liaisons ne serait donc pas ionique**.

- *Influence de l'alcool*

Certains aliments astringents, comme le vin, contiennent également de l'alcool. Cet agent, faisant diminuer la polarité du milieu, est capable de réduire les interactions entre les tanins du vin et les protéines salivaires, ce qui suggère l'implication **d'effets hydrophobes** dans le phénomène d'interactions (Le Bourvellec *et al.*, 2004a).

- *Effet de l'ajout de produits accepteurs de liaisons hydrogène ou de détergents*

L'ajout de produits accepteurs de liaisons hydrogène ou de détergents agissant par effet hydrophobe avec les protéines, tels que l'acétone, l'urée, le polyéthylène glycol, le dodécyl sulfate de sodium ou encore la polyvinylpolyrrolidone, suffit à dissocier les complexes de nature réversible (Haslam *et al.*, 1992). On peut donc penser que si ces produits sont capables d'entrer en compétition avec le polyphénol pour la liaison avec la protéine, c'est probablement que les liaisons impliquées dans la complexation sont de même nature que celles impliquant ces détergents, à savoir des **effets hydrophobes et des liaisons hydrogène**.

⇒ **Modélisation des complexes réversibles**

Suite à ces observations expérimentales, plusieurs équipes se sont attachées à proposer un mécanisme de formation des complexes réversibles protéines – polyphénols.

Dans une première étape, les deux molécules (protéine et polyphénol) s'orientent l'une par rapport à l'autre, guidées par des effets hydrophobes, ce qui expliquerait la dépendance de la capacité de flexibilité conformationelle du polyphénol évoquée précédemment.

La liaison s'effectuerait ainsi dans une poche hydrophobe de la protéine (figure 13), constituée en grande partie de résidus proline (Spencer *et al.,* 1988), mais également de résidus glycine et arginine comme le montrent des données obtenues par Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) avec des peptides de synthèse (Baxter *et al.,* 1997). Des liaisons hydrogène se formeraient entre les groupements phénoliques et les groupements polaires de la protéine (Spencer *et al.,* 1988). Ce résultat est confirmé par le fait que l'augmentation du nombre de groupements phénoliques de la molécule, autrement dit son degré de polymérisation, est corrélé positivement à l'intensité de la formation des interactions. L'importance relative des effets hydrophobes par rapport aux liaisons hydrogène lors de cette phase n'est en revanche pas bien connue.

D'autres hypothèses font intervenir le **phénomène de « stacking »,** terme anglais désignant un empilement de cycles aromatiques. Cette hypothèse a d'abord été émise en extrapolant les données obtenues par diffraction des rayons X et R.M.N. dans le cas des complexes de la caféine avec les polyphénols (Haslam et Lilley, 1988), étant donné la ressemblance de structure entre la caféine et les peptides riches en proline. On observe une structure tridimensionnelle due à l'empilement de "couches" polyphénol - caféine - polyphénol séparées les unes des autres d'environ 3,4 Å (figure 14). Cet empilement est dû à des liaisons faibles non covalentes. En effet, on peut observer que les groupements phénoliques se trouvent face à face avec les hétérocycles à 6 atomes de la caféine, ce qui s'explique par des interactions électrostatiques entre les deux cycles : il y a juxtaposition des groupements polarisables. Des résultats similaires à ce modèle, longtemps resté la meilleure approximation du phénomène, ont été retrouvés par R.M.N. (Baxter *et al.,* 1997). En étudiant les interactions entre le gallate de propyle et des peptides de synthèse dont la séquence est très riche en proline, ils montrent que les interactions peptide - polyphénol impliquent bien un empilement des cycles similaires et rappellent l'importance des effets hydrophobes dans le phénomène (figure 15).

I.1.1.1.2. Interactions des polyphénols avec les protéines à structure globulaire

De nombreuses données ont été générées concernant l'interaction des protéines salivaires avec les tanins, et de fait, les interactions de molécules phénoliques de masse moléculaire plus faible, telles que les acides hydroxycinnamiques, avec les protéines (globulaires ou non), ont longtemps été négligées. Pourtant, il semble que ces interactions puissent également exister, à condition que ceux-ci soient maintenus en concentration suffisante dans le milieu (Spencer *et al.*, 1988). L'existence d'interactions entre la Sérum albumine bovine et des acides phénoliques tels que l'acide caféique, sous forme estérifiée ou non, a par exemple été montrée (Bartholome *et al.*, 2000 ; Rawel *et al.*, 2005). L'utilisation de la spectrofluorimétrie et d'autres méthodes comme la dialyse à l'équilibre, pour l'étude de ce type d'interactions, a permis de déterminer les constantes d'affinité de nombreuse molécules telles qu'acides phénoliques ou quercétine (Dufour et Dangles, 2005 ; Papadopoulou *et al.*, 2005 ; Prigent *et al.*, 2003) pour différentes protéines à structure spatiale organisée. Par exemple, les flavonoides présentent des constantes d'affinité faibles pour la sérum albumine bovine, de l'ordre de 1-15 . 10^4 M^{-1}, les flavones et les flavonols étant ceux qui se lient le plus à cette molécule (Dufour et Dangles, 2005).

Les données rassemblées suggèrent l'existence de phénomènes similaires à ceux décrits précédemment pour les protéines à structure déployée. La conformation des protéines (cas de la sérum albumine bovine) ne semble cependant pas être modifiée consécutivement aux interactions (Dufour et Dangles, 2005 ; Prigent *et al.*, 2003). Des phénomènes de stacking seraient impliqués, mais également des liaisons hydrogène et des effets hydrophobes (Dufour et Dangles, 2005). Il semble que les liaisons se fassent à proximité des résidus tryptophane de la protéine, puisqu'il est possible de les mettre en évidence par quenching de fluorescence, au niveau de sites de fixation bien déterminés, dont il est possible de calculer le nombre grâce aux diagrammes de Scatchard. Deux sites de liaison distincts ont été mis en evidence dans le cas des interactions sérum albumine bovine / acide chlorogénique (Prigent *et al.*, 2003). Cependant, les constantes d'affinité observées demeurent relativement faibles, puisqu'inférieures à 10^3 (Dufour et Dangles, 2005 ; Papadopoulou *et al.*, 2005 ; Prigent *et al.*, 2003). L'étude de ces complexes demeure un point qu'il serait important d'approfondir dans la connaissance des interactions protéines / polyphénols.

I.1.1.2.La complexation irréversible

Cette complexation se produit dans les produits alimentaires ayant subi des traitements plus ou moins drastiques. Il se forme par exemple des liaisons covalentes entre l'acide chlorogénique et les protéines de la graine de tournesol lors de l'extraction de ces dernières en

conditions basiques (Shamanthaka et Narasinga, 1990). L'établissement de ces nouvelles liaisons est facilité par le rapprochement occasionné par les complexes formés dans la phase réversible, et favorisé par l'intervention d'agents extérieurs tels que le di-oxygène.

Deux phénomènes distincts peuvent se produire selon les caractéristiques physiques du produit alimentaire et le traitement qu'il reçoit (pH, présence d'enzymes et/ou d'ions métalliques dans le milieu), mais dans les deux cas, on retrouve au final des complexes caractérisés par des liaisons covalentes entre les protéines et les polyphénols, accompagnés de divers produits secondaires de réaction (Haslam *et al.*, 1992).

I.1.1.2.1. En milieu acide: exemple du trouble des boissons

Le trouble des boissons est un phénomène important pour l'industrie agro-alimentaire. De nombreuses études s'y sont par conséquent intéressées.

A pH ≤ 4, on observe une rupture de la liaison inter-flavanol des proanthocyanidines, ce qui aboutit à la formation de carbocations très électrophiles. Ceux-ci réagissent rapidement avec les groupements nucléophiles se trouvant à proximité. En l'absence de tels groupements, il peut se produire des phénomènes de polymérisation entre les différentes molécules en présence, ce qui conduit à terme à la formation de composés de très hauts poids moléculaires qui précipitent avec le temps : c'est ainsi que l'on peut expliquer la perte d'astringence du vin vieillissant (Haslam et Lilley, 1988).

La formation du trouble permanent de la bière peut également s'expliquer selon le principe décrit ci-dessus. En effet, dans les conditions faiblement acides rencontrées dans la bière lors de sa conservation, il se produit une décomposition des proanthocyanidines (procyanidine B3 et prodelphinidine B3, polymères de (+)-catéchine et/ou de (+)-gallocatéchine) au sein des complexes réversibles protéines - polyphénols existants. Celle-ci génère des carbocations dérivés des flavan-3-ols, captés par les groupements nucléophiles des protéines, notamment les groupements SH (figure 16). Il s'agit ici de protéines issues de l'orge, les prolamines et l'hordéine, protéines qui ont la particularité d'être riches en proline (Siebert, 1999).

Siebert *et al.* (1996) ont mis en évidence le fait que l'intensité du trouble formé dans les complexes gélatine - acide tannique ou gliadines - (+)-catéchine était reliée à la concentration des deux protagonistes de la façon suivante : pour une concentration en protéine donnée, si l'on augmente la concentration en polyphénols, on observe tout d'abord une élévation de l'intensité du trouble qui s'atténue ensuite, passé un certain seuil (figure 17). Ils suggèrent ainsi l'existence d'un système dans lequel chacune des molécules aurait un nombre limité de sites de fixation (2 sont représentés pour le polyphénol et 3 pour la protéine sur la figure 18). Ainsi, lorsque le nombre de sites de fixation en présence est équivalent pour les deux

protagonistes, un réseau de liaisons est à même de s'établir (Charlton *et al.*, 2002), augmentant le trouble contrairement aux situations de déséquilibre où le trouble est de plus faible intensité. L'observation concernant l'importance de la taille des composés phénoliques se retrouve également dans ce cas. Siebert (1999) évoque l'influence du degré de polymérisation de polymères de (+)-catéchine sur l'intensité du trouble détecté en solution dans la bière (figure 19). Il semble en effet que la complexation soit d'autant plus forte que la masse moléculaire des polyphénols et le nombre de groupements OH accessibles dans la molécule sont élevés (Siebert, 1999). Le trouble est maximal lorsque le nombre de sites de fixation des polyphénols équivaut à celui des protéines (même concentration). Dans ce cas, les réseaux protéines / polyphénols sont de grande taille, favorisant une plus grande diffusion de la lumière. Par ailleurs, le trouble croît également avec la concentration de chacun des partenaires du complexe (Siebert *et al.*, 1996).

Dans le cas des jus de fruits, on a pu observer par microscopie electronique à balayage que les complexes protéines-polyphénols s'agrégeaient en une structure secondaire plus ou moins caténaire. Les protéines impliquées sont des glycoprotéines (lectines et protéines estérifiées à des arabinoxylanes) riches en hydroxyproline, provenant de la paroi cellulaire végétale, et dont la concentration peut se trouver augmentée de façon néfaste pour la turbidité du milieu par l'étape de macération du moût de pommes en présences d'enzymes (Beveridge, 1997).

Les problèmes de troubles sont encore renforcés par la contamination des jus par des ions métalliques provenant des tuyaux et cuves utilisés lors du procédé industriel de transformation. En effet, les cations multivalents sont capables de former des complexes avec les composés phénoliques, qui se combinent alors avec les protéines et les sucres présents dans le milieu ; ils peuvent de plus catalyser des phénomènes d'oxydation. Par ailleurs, il pourrait également se former un couplage oxydatif entre les tanins et les acides féruliques pontant les chaînes polysaccharidiques entre elles dans la paroi du fruit (Beveridge, 1997).

Les composés de hautes masses moléculaires ainsi formés sont très stables en milieu acide. Du fait de la présence de liaisons thioéthers, ces complexes acquièrent une certaine hydrophobie de surface et s'agrègent avec le temps pour former un trouble permanent dans la boisson (Haslam et Lilley, 1988). De plus, dans le cas de la bière, il a été montré qu'une quantité non négligeable de composés glucidiques venait s'ajouter aux complexes. Cependant, ils ne semblent pas jouer de rôle structural important dans le trouble car leur élimination n'est pas nécessaire pour stabiliser les boissons (Siebert, 1999).

Enfin, ce phénomène ne semble pas concerner exclusivement les molécules de haute masse moléculaire puisque la (+)-catéchine est également capable de faire précipiter les gliadines en

solution à condition que ce polyphénol soit maintenu en concentration suffisante dans la solution (Siebert *et al.*, 1996).

I.1.1.2.2. En milieu basique ou riche en agents oxydants

Cette seconde voie est due à des réactions d'oxydation. Elle est favorisée en milieu basique (pH>8) : de telles interactions ont notamment été mises en évidence entre des acides phénoliques et des protéines telles que la sérum albumine bovine (Rawel *et al.*, 2002b), le lysozyme (Rawel *et al.*, 2001b), la glycinine (Rawel *et al.*, 2002a) ou encore les protéines du lactosérum (Rawel *et al.*, 2001a).

Suite à l'étude d'un système modèle de complexation acide caféique oxydé - résidus lysine de la caséine, un schéma récapitulatif des réactions susceptibles de se produire dans différentes conditions de pH (figure 20) a été proposé (Hurell *et al.*, 1982). Ces réactions, susceptibles de se produire également avec d'autres acides aminés que la lysine (résidu cystéine en particulier), impliquent dans un premier temps l'oxydation, enzymatique ou non, du composé phénolique en quinone, puis la formation de quinonimines avec les résidus amino-acides (Rawel *et al.*, 2002a). Des phénomènes de polymérisation se produisent ensuite.

La présence d'enzymes telles que les polyphénoloxydases et/ou d'ions métalliques peut également favoriser de telles réactions. Le terme « polyphénoloxydase » recouvre en fait trois familles d'enzymes impliquées entre autres dans le brunissement enzymatique des fruits (Nicolas *et al.*, 1994) (Mustafa, 2005) :

- Les **catéchol oxydase** (aussi appelées parfois monophénol monooxygénases ou tyrosinases), qui catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (activité crésolase), eux-même oxydés en *o*-quinones (activité catécholase) (figure 21.a). Ubiquitaires dans les fruits, elles représentent la majorité de l'activité polyphénoloxydase.
- Les **laccases**, qui sont capables d'oxyder en quinones aussi bien les *o*-diphénols que les *p*-diphénols (figure 21.b). On les trouve surtout chez les champignons et quelques rares plantes supérieures. Les seuls fruits dans lesquels on la rencontre sont la pêche et l'abricot.
- Les **peroxydases** peuvent également être considérées comme participant au brunissement enzymatique. Ces enzymes sont capables d'oxyder les donneurs d'hydrogène (dont les polyphénols) et sont hautement spécifiques du peroxyde d'hydrogène. Elles sont également capables d'oxyder les composés phénoliques en quinones. Cependant, leur rôle dans le brunissement enzymatique reste mineur, en

particulier parce que leur activité est limitée par la concentration de peroxyde d'hydrogène présente dans la plante.

Nécessitant la présence d'oxygène, ces réactions conduisent toutes à la formation d'*o*-quinones plus ou moins colorées selon le di-phénol dont elles dérivent. Ces espèces chimiques extrêmement réactives sont susceptibles de réagir à nouveau avec les polyphénols non oxydés pour donner des dimères du polyphénol original, qui peuvent à leur tour être oxydés et donner des oligomères plus ou moins colorés (figure 21.c). Les *o*-quinones peuvent également réagir avec des espèces non phénoliques présentes dans le milieu (figure 21.d) : leur réaction avec les groupements nucléophiles des protéines donne des complexes à liaison covalente irréversible (Haslam et Lilley, 1988). Les composés phénoliques sont tous susceptibles de subir ces réactions, que leur masse moléculaire soit faible ou importante. Dans la majorité des cas, les produits finaux sont des polymères bruns (Nicolas *et al.*, 1994).

Les *o*-quinones réagissent également avec l'acide ascorbique, ce qui permet de régénérer le polyphénol d'origine en donnant de l'acide déhydroascorbique, ou avec les sulfites pour donner des composés non colorés. En milieu aqueux et acide, des triphénols peuvent se former et être oxydés par la polyphénoloxydase ou par les quinones en excès pour donner des *p*-quinones (figure 21.d) (Nicolas *et al.*, 1994).

Ces enzymes sont normalement localisées dans la paroi des chloroplastes, dans des plastes non chlorophylliens ou encore dans les mitochondries de la cellule végétale, voire libres dans le cytoplasme, et ne sont pas en contact avec les polyphénols, principalement concentrés dans les vacuoles. Cette mise en contact ne se produit donc que lorsque le fruit est lésé ou transformé (pressé, découpé…) (Nicolas *et al.*, 1994).

On retrouve également ce type d'interactions dans le cacao : les quinones formées lors de la fermentation des fèves réagissent avec les protéines présentes dans la graine pour donner des complexes de nature irréversible à l'origine de la faible digestibilité des protéines contenues dans ce produit (Shahkhalili *et al.*, 1990). Par ailleurs, la torréfaction ultérieure des fèves semble encore accentuer ce problème (Redgwell *et al.*, 2003).

I.1.2. Interactions avec les glucides et les fibres

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les composés phénoliques sont localisés dans les plantes, en particulier dans les fruits. De fait, s'agissant de produits relativement riches en glucides, et en particulier en fibres, composantes de la paroi végétale, il est indispensable de s'intéresser à la structure de cette dernière, afin de mieux comprendre le phénomène.

I.1.2.1. Fruits et légumes, matrices naturelles des polyphénols

I.1.2.1.1. Localisation des polyphénols dans les fruits et légumes

La détermination de la localisation des polyphénols dans les fruits peut se faire extrêmement simplement au niveau expérimental : de simples teintures au chlorure de fer permettent de mettre en évidence les zones en contenant, quand ils ne sont pas tout simplement les agents donnant la couleur au fruit. La majorité des polyphénols se trouve ainsi localisée dans la peau et les graines des fruits, ainsi que dans les tiges (figure 22). Cependant, cette distribution est moins nette dans les baies que dans les drupes (fruits à « noyau ») : ainsi la pulpe de tomate contient-elle plus d'acides hydroxycinnamiques que la peau (Macheix et al., 1990).

Dans la cellule végétale, il existe deux sites principaux de localisation des polyphénols : la vacuole et la paroi cellulaire. Cette dernière est plus ou moins riche en polyphénols selon la localisation de la cellule : les parties charnues du fruit en sont pauvres (les polyphénols sont alors principalement contenus dans la vacuole), contrairement aux cellules dont la paroi a atteint le stade supérieur de rigidité (cellules de la peau et des pépins, épicarpes des grains de blé) (Macheix et al., 1990).

I.1.2.1.2. Paroi végétale et fibres alimentaires

La paroi cellulaire des fruits charnus est principalement constituée de trois réseaux de polymères de glucides à l'état de microfibrilles. On y trouve aussi divers autres composés en proportions moindres (tableau IV), en réseaux imbriqués (figure 23). Dans la chair de la plupart des fruits, 50 g/ 100 g de la matière sèche sont composés de cellulose et d'hémicellulose, elles-mêmes imbriquées dans un réseau pectique qui constitue 25 à 40 g/ 100 g de la matière sèche. Le tout est interconnecté grâce à un réseau de glycoprotéines. L'extensine, qui représente 1 g/ 100 g de la matière sèche, est impliquée dans l'expansion des parois cellulaires (Cosgrove, 2000). Ces proportions varient selon la plante ou le tissu impliqué. Par exemple, dans les parties du fruit ou de la graine ayant un rôle de protection ou de soutien, la paroi végétale se lignifie plus (cas du son de blé) ou moins (cas de la peau des fruits), tandis que les parois des cellules composant la chair du fruit ne présenteraient pas cette caractéristique.

On appelle « fibre alimentaire » les parties comestibles des plantes riches en polysaccharides résistantes à la digestion et à l'absorption dans l'intestin humain mais qui sont partiellement ou totalement fermentées dans le côlon. Cette définition, qui varie légèrement d'un pays à l'autre, inclue les polysaccharides, les oligosaccharides, la lignine et les substances végétales associées. On distingue les fibres solubles dans l'eau (les pectines, les mucilages) des fibres insolubles dans l'eau (la cellulose, les hémicelluloses, la lignine) (tableau IV).

D'après ces données, on peut envisager deux types de comportement des polyphénols dans des systèmes riches en glucides :

- dans le cas de végétaux non transformés (fruits, légumes consommés tels quels), les polyphénols peuvent être retenus dans les parois végétales (fibres, cuticules) ou les vacuoles des cellules, sous forme glycosylée ou non (interactions constitutives).
- dans le cas de produits transformés issus de végétaux, les molécules normalement contenues dans les différents compartiments de la plante entrent en contact lors de la transformation, conduisant à des interactions potentielles : polysaccharides des parois cellulaires et polyphénols précédemment contenus dans les vacuoles.

I.1.2.2. Interactions constitutives

Certains acides hydroxycinnamiques (acides *p*-coumarique et férulique) entrent dans la composition des parois végétales et des fibres. C'est notamment le cas dans les téguments de nombreuses céréales (blé, orge…) et plantes monocotylédones (herbe, bambou). Si la couche la plus externe de la graine (péricarpe) est fortement lignifiée et peu fermentescible, en revanche la couche à aleurone, située immédiatement en dessous, est riche en acides hydroxycinnamiques libérables par fermentation (Ferguson *et al.*, 2001). Les chaînes d'arabinoxylanes qui constituent l'hémicellulose sont pontées par des dimères d'acide férulique (son de blé), associés par des liaisons 1→5 aux résidus arabinofuranose (figure 24.a). Chez l'amarante (*Amaranthus caudatus L.*), l'acide férulique serait lié aux arabinanes pectiques et aux galactanes (Bunzel *et al.*, 2005). La réalité de ce pontage a récemment été démontrée par la purification de di-arabinosyl 8-O-4 déhydrodiférulates dans les fibres insolubles du maïs (Allerdings *et al.*, 2005). Dans les téguments de certaines céréales comme le riz sauvage, des pontages d'acide sinapique pourraient également exister, les pontages d'acide férulique restant majoritaires (Bunzel *et al.*, 2002). On considère que ces pontages se forment par interconnexion oxydative de deux acides féruliques, chacun lié à une chaîne polysaccharidique différente, cette réaction étant catalysée par une peroxydase (Beveridge, 1997).

Les formes monomériques et dimériques d'acides férulique et *p*-coumarique pourraient servir de sites de nucléation pour le développement de la lignine dans les stades ultérieurs du développement de la paroi. Par ailleurs, il a été montré dans l'herbe que les férulates et les *p*-coumarates étaient liés à la lignine par des liaisons éther et simultanément aux polysaccharides par des liaisons esters (figure 24.b) (Kroon *et al.*, 2000). Dans les stades ultérieurs du développement, ils feraient partie intégrante des polymères de lignine, ce qui

semble plausible car les mécanismes de dimérisation des acides féruliques (couplage radicalaire) sont proches des réactions de couplage qui interviennent dans les réactions de couplage des monolignols en lignine (Bunzel *et al.*, 2003). Le niveau d'intervention de l'acide férulique et de ses dérivés dans les mécanismes de lignification a d'ailleurs été récemment partiellement élucidé (Bunzel *et al.*, 2004).

L'existence de ces pontages a également été montrée chez certaines dicotylédones (betterave à sucre, épinard, carotte…). Le pontage se fait alors par liaison 1→2 aux résidus arabinofuranoses ou 1→6 aux résidus galactopyranoses des pectines (Kroon *et al.*, 2000). Ces pontages contribuent de manière significative au maintien de l'intégrité des membranes pendant la cuisson et diminuent considérablement la digestibilité de ces fibres alimentaires (Kroon *et al.*, 2000).

De nombreuses formes de ces dimères ont été identifiées dans les végétaux (figure 25). On utilise en général des hydrolyses acides ou enzymatiques plus ou moins sélectives, couplées à des séparations chromatographiques pour les identifier. On trouve notamment certaines de ces formes dimérisées dans les céréales (Bunzel *et al.*, 2002 ; Bunzel *et al.*, 2001a ; Bunzel *et al.*, 2001b), mais aussi dans l'ananas, les betteraves, les épinards (Ferguson *et al.*, 2001), la carotte (Parr *et al.*, 1997), et l'asperge (Rodriguez-Arcos *et al.*, 2002). Dans les céréales, leur présence a été mise en évidence également dans la fraction soluble des fibres, mais en quantité largement moindre que dans la fraction insoluble (8 à 39 fois moins). Dans la fraction insoluble, les acides féruliques sont liés en 8-5 alors que les liaisons 8-8 prédominent dans la partie soluble (Bunzel *et al.*, 2001b).

Chez certains légumes verts, la quantité d'acide diférulique augmente de manière spontanée lors de la conservation : après 3 jours de conservation, l'acide férulique dimérisé de l'épinard passe de 60 g/100g à 70 g/100g en acide férulique total (Rodriguez-Arcos *et al.*, 2002). Cette transformation est due à la sénescence des tissus et est attribuée à la formation de complexes pectine/xylanes/composés phénoliques.

Les plus récentes données font état de déhydrotrimères (Bunzel *et al.*, 2003 ; Funk *et al.*, 2005), isolés des fibres insolubles du maïs. Cette découverte a relancé les conjectures sur la structure des pontages entre chaînes d'arabinoxylanes, qui seront donc plus complexes qu'il n'y paraissait : les acides féruliques déjà dimérisés seraient susceptibles de poursuivre leurs réactions de couplage, en particulier ceux situés en bout de chaînes d'arabinoxylanes. Dans le cas de l'acide 5-5/8-O-4 dihydrotriférulique, des réactions de couplage pourraient tout d'abord se produire entre deux acides féruliques situés sur une même chaîne d'arabinoxylane, en 5-5. Puis il pourrait se produire un pontage en 4-O entre l'atome de carbone 8 libre sur le

dimère d'acide férulique préalablement formé et le carbone 4 d'un acide férulique lié à une autre chaîne d'arabinoxylane. Ceci n'implique toujours qu'un pontage entre deux chaînes (Bunzel *et al.*, 2003). Dans les téguments du maïs, l'existence d'acides 8-O-4/8-O-4 dihydrotriférulique et 8-8/8-O-4 dihydrotriférulique a été mise en évidence, ce qui suggère la possibilité de pontage entre trois chaînes d'arabinoxylanes, chaque monomère étant lié à une chaîne différente (Funk *et al.*, 2005). Cette hypothèse est controversée en raison de la rigidité acquise par les chaînes d'arabinoxylanes une fois pontées par les dimères d'acide férulique. Une troisième hypothèse, le phénomène de « back-crossing », voudrait que deux acides féruliques liés à des chaînes d'arabinoxylanes différentes se couplent dans un premier temps, et qu'un troisième acide férulique se couple à l'un ou l'autre des acides féruliques du dimère. Ainsi la question de savoir si jusqu'à trois chaînes d'arabinoxylane peuvent être impliquées dans le phénomène de pontage reste ouverte (Funk *et al.*, 2005).

I.1.2.3. Interactions formées lors de la transformation des fruits

Les polyphénols se trouvent en grande majorité dans la vacuole des cellules et ne se trouvent donc pas en contact avec la polyphénoloxydase si le fruit n'est pas lésé. En revanche, si tel est le cas, non seulement des phénomènes de brunissement enzymatique peuvent se produire, mais encore les polyphénols ainsi libérés peuvent interagir avec les polysaccharides de la paroi végétale, ce qui diminue leur extractibilité lors du pressurage des fruits destinés à la fabrication de boissons à base de fruits.

Peu d'études se sont intéressées à ces phénomènes. Ils seraient notamment impliqués dans l'atténuation du phénomène d'astringence ressenti lors de la consommation de fruits mûrs par rapport à des fruits plus verts. En effet, la viscosité de l'aliment, souvent déterminée par la quantité de sucres présente dans l'aliment, a une influence indirecte sur l'astringence car elle induit une lubrification orale. Mais par ailleurs, il a été montré que les pectines pouvaient interagir directement avec les polyphénols réduisant ainsi l'efficacité de leurs liens avec les protéines, et donc l'astringence (Macheix *et al.*, 1990). Ce phénomène se produit lors du mûrissement des fruits. En effet, pendant une longue période, on a assimilé cette perte d'astringence aux phénomènes se produisant dans le vin vieillissant, à savoir la polymérisation intense des tanins à l'origine d'une diminution de leur solubilité. Il a ensuite été démontré que le phénomène variait selon le fruit. Ainsi dans le Kaki, cette diminution de l'astringence est en fait due à une réaction avec l'acétaldéhyde, synthétisé par le fruit lors du mûrissement, qui conduit à la gélification de la chair du fruit, par liaisons multiples des oligomères de proanthocyanidines. Leur solubilité est alors diminuée et de fait, l'astringence du fruit diminue. En revanche, dans les framboises et les mûres, le mûrissement provoque la

désestérification et le morcellement des pectines. Il y a alors compétition entre les protéines salivaires et ces morceaux de pectines dans la cavité buccale pour la fixation aux polyphénols, d'où une diminution de la sensation perçue (Macheix *et al.*, 1990).

De même, il a été observé qu'une addition de 12 à 20 g de sucre pour 100mL de vin rouge diminuait sensiblement l'intensité de l'astringence, le temps nécessaire pour atteindre la perception maximale ainsi que la durée totale de la perception. Quelle que soit l'intensité d'astringence d'un vin rouge, une concentration en saccharose supérieure à 50 g/L permet de l'atténuer significativement (Ishikawa et Noble, 1995). Cependant, pour la consommation, 1 à 3 g de sucres résiduels pour 100mL de vin sont habituellement souhaités dans le vin rouge.

D'autres observations permettent de mettre en évidence l'existence de complexes polyphénols/polysaccharides (Renard *et al.*, 2001) :

- Le comportement des tanins en chromatographie : lors de la mise en contact de gels de dextrane (Sephadex) et des tanins, on constate un retard d'élution extrêmement important, qui serait dû à la séquestration des groupements aromatiques, voire de la molécule entière, dans les pores et cavités du gel.
- L'extractibilité des polyphénols par centrifugation diminue lorsqu'on les met en contact avec des matrices de polysaccharides insolubles comme l'amidon, l'acétate de cellulose, la chitine ou les chitosanes.
- Les polyphénols peuvent être extraits de complexes avec les protéines par ajout d'amidon ou de chitosanes.
- La précipitation des complexes protéines/polyphénols en solution peut être inhibée par l'ajout de pectines ou de divers polysaccharides.
- Le spectre RMN ^{1}H des cyclodextrines et des oligodextranes en solution est modifié en présence de polyphénols.

Le modèle d'interaction polyphénol-cyclodextrines est d'ailleurs longtemps resté la seule approche expérimentale du phénomène.

I.1.2.3.1. Le modèle d'interaction polyphénols/cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des molécules en forme d'anneau, produites entre autres par la dégradation de l'amidon par une amylase (cyclodextrinase) de *Bacillus macerans*. Elles sont composées d'unités glucopyranoses, reliées entre elles par des liaisons α-1-4. L'intérieur de l'anneau (tore) forme une cavité hydrophobe tandis que l'extérieur est hydrophile. Cette cavité permet l'inclusion de nombreux composés, dont les polyphénols. L'existence de ces interactions a pu être démontrée par l'inhibition de la polyphénoloxydase : le polyphénol étant

partiellement inclus dans la cyclodextrine, il ne peut plus réagir avec l'enzyme (Fayad *et al.*, 1997 ; Gacche *et al.*, 2003).

La structure des complexes d'inclusion a ensuite été étudiée par spectrophotométrie U.V., R.M.N et cristallographie (Le Bourvellec *et al.*, 2004a ; Malpezzi *et al.*, 2004). Dans une cyclodextrine, les carbones C3 et C5 sont tournés vers l'intérieur de la cavité hydrophobe, tandis que les carbones C2, C4 et C6 sont tournés vers l'extérieur. C2 et C3 sont orientés vers le dessus du cycle, tandis que C5 et C6 sont orientés vers le dessous (figure 26). Les études en R.M.N. ^{1}H montrent que ce sont les hydrogènes en C3 et C5 qui sont les plus affectés par l'interaction (Bianco *et al.*, 1997). L'hydrogène en C3 interagirait avec le groupement hydroxyle du cycle phénolique, tandis que le cycle aromatique entrerait dans l'anneau du côté des carbones C2 et C3 (par le « dessus »), selon un axe parallèle à l'axe de la cavité de la cyclodextrine (figure 26). L'interaction serait due à des liaisons de Van der Waals, des liaisons hydrogène et des effets hydrophobes, l'eau étant éliminée de la cavité durant la complexation (Haslam et Lilley, 1988 ; Malpezzi *et al.*, 2004).

I.1.2.3.2. Interactions polyphénols/polysaccharides

Les interactions entre les procyanidines et les polysaccharides des fibres de la pomme à cidre lors du pressurage des pommes, première étape de fabrication du cidre, ont été étudiées (Le Bourvellec *et al.*, 2004a). Un milieu simplifié, simulant le moût de pommes mais ne contenant pas de polyphénoloxydase , a été utilisé. Pour cela, les fractions polysaccharidiques (pectines hautement méthylées, contenant xylogalacturonanes, galactoxylanes, mannanes, glucose, acide galacturonique) et procyanidiques de pommes (oligomères et polymères) ont été isolées, puis remises en contact en solution à hauteur de 5g/L de fibres et 1g/L de polyphénols, en faisant varier différents paramètres du milieu (pH, force ionique, température, nature des polyphénols ajoutés individuellement ou en mélange). Une séparation sur colonne Sep-Pack a alors été effectuée puis les polyphénols libres dosés par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur U.V.-visible à barette de diodes.

Ces travaux montrent que les mécanismes de complexation en l'absence de polyphénoloxydase seraient similaires à ceux de la complexation protéines-polyphénols réversible en milieu acide. En effet, la nature des liaisons serait essentiellement non ionique, car le pH n'a pas d'effet sur la quantité de polyphénols liée, dans une zone comprise entre 2 et 7 (pKa des groupements OH des procyanidines : entre 9 et 10). De même, augmenter la force ionique du milieu fait augmenter les interactions, ce qui suggère l'existence d'effets hydrophobes. L'existence de liaisons hydrogène est quant à elle fortement suggérée par le fait que les interactions sont éliminées, comme dans le cas des protéines, par l'ajout d'agents

destructeurs de ces liaisons, comme l'urée. Les agents diminuant la polarité du milieu, comme le dioxane, font diminuer les interactions, ce qui confirme la présence d'effets hydrophobes. De même, taille et flexibilité conformationnelle du polyphénol sont impliquées de façon similaire aux phénomènes d'interactions protéine/polyphénol : plus celles-ci sont élevées, plus l'interaction est forte. Le degré de galloylation des procyanidines est lui aussi corrélé positivement à l'augmentation des interactions. Autrement dit, plus il y a de groupements phénoliques disponibles, plus l'interaction augmente, ce qui suggère fortement un mécanisme similaire à l'interaction réversible entre protéines et polyphénols.

Lorsque l'on ajoute de l'urée dans ce même milieu, on constate que le phénomène de désorption (suivi par dosage des polyphénols libres dans le milieu) qui se produit comporte deux étapes : une première, rapide, puis une seconde, plus lente, pendant laquelle le phénomène se poursuit et finit par atteindre un plateau. Ceci pourrait s'expliquer par un phénomène de liaison double aux parois : dans un premier temps, les procyanidines se lieraient effectivement aux parois cellulaires, puis une accumulation de polyphénols par des phénomènes d'empilement de cycles pourrait avoir lieu (Renard *et al.*, 2001).

De plus, la mobilité et la conformation du polysaccharide entrent aussi en ligne de compte dans l'interaction : si les polyphénols se lient facilement aux gels de dextrane, les polysaccharides « filamenteux », ne présentant qu'une seule longue chaîne, lient très peu les polyphénols. Les polysaccharides à structure « secondaire » comme l'amylose, contenant des cavités hydrophobes, ont en revanche une affinité nettement plus importante pour les polyphénols (Haslam et Lilley, 1988). Il n'existe pas d'interaction entre les polyphénols et les oligomères de dextrane ou les petits polymères (Williamson *et al.*, 1995). **Une structure tridimensionnelle, comme celle que l'on trouve dans la paroi végétale, serait donc nécessaire à l'apparition de ces interactions.**

Enfin, lorsque les polyphénols de la paroi sont oxydés par la polyphénoloxydase , comme lors du procédé réel de pressurage des pommes dans la fabrication du cidre, il pourrait également se former des liaisons covalentes entre les quinones ainsi formées et les polymères de la paroi végétale (Renard *et al.*, 2001).

I.1.3. Interactions avec les lipides des fruits

La couche la plus externe de la peau de certains fruits, aussi appelée cuticule, contient également des polyphénols en faible quantité. Ceux-ci permettraient, en synergie avec d'autres antioxydants, de protéger le fruit contre la dégradation de la cuticule survenant quand le fruit est cueilli avant maturité (Ju et Bramlage, 1999). Ces polyphénols (quercétine, acide gallique, naringénine) seraient liés aux cutines dans la pomme et la tomate (Macheix *et al.*, 1990). Malheureusement, la littérature concernant ces interactions est quasi inexistante et le type de liaison mis en jeu ne semble pas avoir été élucidé.

I.2. INTERACTIONS « NON SPECIFIQUES » : EN LIEN AVEC LA SOLUBILITE DES POLYPHENOLS

Nous avons vu que les interactions des composés phénoliques avec les polysaccharides ou les protéines impliquaient la liaison directe, réversible ou non, de ces polyphénols à d'autres molécules. Cependant, il existe un second type d'interaction des polyphénols avec les autres composantes de l'aliment : en effet, la solubilité des composés phénoliques est différente selon la nature du polyphénol, et surtout selon le milieu dans lequel il est présent. Ainsi, cette solubilité variera-t-elle selon que la molécule sera présente dans un milieu aqueux, lipidique ou alcoolique, trois milieux couramment rencontrés dans les aliments. Le comportement des composés phénoliques dans l'aliment ou lors du tractus gastro-intestinal est donc susceptible d'être différent selon le milieu dans lequel il est solubilisé.

I.2.1. Influence des lipides

Peu d'aliments contiennent à la fois des lipides et des composés phénoliques : on peut néanmoins citer l'huile d'olive ou le chocolat, ou encore les boissons au lait entier telles que le café au lait, mais dans ce cas, la proportion de lipides reste faible. En revanche, lors de la prise d'un repas, les polyphénols se trouvent mélangés à des aliments riches en lipides dans le bol alimentaire, dans lesquels ils peuvent être plus, ou, au contraire, moins solubles, selon le degré de polarité du polyphénol concerné. De même, des lipides peuvent être ajoutés lors de la cuisson d'aliments riches en polyphénols (friture des oignons par exemple) ou coexister dans des produits alimentaires complexes (yaourts, gâteaux aux fruits).

Ces phénomènes existent également lors de la fabrication de certains aliments. Par exemple, lors de la fabrication de l'huile d'olive, on assiste à une perte importante des composés phénoliques de l'olive. En effet, les antioxydants de l'olive sont de nature plutôt hydrophile et la grande majorité d'entre eux a plus d'affinité pour les eaux ajoutées lors des procédés d'extraction de l'huile (Mulinacci *et al.*, 2001 ; Rodis *et al.*, 2002) que pour la phase lipidique. Dans des émulsions huile/eau, le coefficient de partage huile/eau des polyphénols

de l'huile d'olive peut être extrêmement faible (tableau V), de 6.10^{-4} pour l'oleuropéïne (exprimé en mg d'oleuropéïne dans l'huile par g d'huile/mg d'oleuropéïne dans l'eau par g d'eau) jusqu'à 1,5 pour l'aglycone correspondant (Rodis *et al.*, 2002). De fait, les polyphénols passent majoritairement dans l'eau. Cependant, théoriquement ces coefficients augmentent lorsque la température est supérieure à 25°C (Rodis *et al.*, 2002).

I.2.2. Influence de l'alcool

Dans le cas de l'interaction procyanidine/fibres de la pomme à cidre, l'ajout d'éthanol à hauteur de 20 à 40 mL pour 100 g de moût de pomme diminue fortement cette interaction : cet agent, en réduisant la polarité du milieu, serait capable de réduire les effets hydrophobes (Le Bourvellec *et al.*, 2004a). Des observations similaires ont été réalisées lors de l'étude du phénomène d'astringence. Des vins ont été désalcoolisés puis ré-enrichis en éthanol à hauteur de 0 à 22 % (mL/100mL), puis une solution de sérum albumine bovine, modélisant les protéines salivaires, a ensuite été ajoutée. Pour chaque pourcentage d'éthanol, les fractions de tanins non liés à la SAB et les fractions liées ont été séparées par centrifugation, puis la quantité de tanins liés a été évaluée par mesure de l'absorbance du culot redispersé par addition d'un détergent : plus celle-ci est faible, plus il y a de tanins qui ont précipité dans le culot. Le pouvoir antioxydant (PAO) de chacune des fractions a été évalué par la méthode TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter). La figure 27 présente les résultats obtenus : plus il y a d'alcool dans le milieu, plus la quantité de tanins liée diminue, et plus le PAO du surnageant (contenant des tanins non liés), augmente (le pouvoir antioxydant dû à l'éthanol lui-même ayant été vérifié comme nul), montrant clairement que l'ajout d'éthanol dissocie les complexes tanins/protéines salivaires (Serafini et al., 1997). La présence d'éthanol dans le vin contribue donc à augmenter son pouvoir antioxydant et la biodisponibilité des polyphénols qu'il contient, d'autant qu'on observe des effets dans cette étude à des doses d'alcool réellement contenues dans certains vins (11 %) et que le modèle de protéine utilisé a une affinité pour les tanins nettement inférieure à celle des protéines salivaires réelles (neuf fois moins importante).

II. INFLUENCE DES INTERACTIONS POLYPHENOLS/MACRONUTRIMENTS SUR LE POUVOIR ANTIOXYDANT DES POLYPHENOLS

Le pouvoir antioxydant des polyphénols peut s'exprimer à deux niveaux :

- soit dans l'aliment, en protégeant les lipides alimentaires de l'oxydation avant leur ingestion,
- soit après ingestion, en protégeant les lipides alimentaires lors du tractus gastro-intestinal, ou en limitant les phénomènes associés au stress oxydatif (oxydation des LDL, des membranes cellulaires….).

Le « pouvoir antioxydant d'un aliment » se caractérise par la nature, la quantité, et l'activité des molécules susceptibles d'avoir une action antioxydante qu'il contient. Cette donnée ne peut etre mesurée en extrayant ces molécules de l'aliment, puisque le mode d'extraction choisi en élimine nécessairement une partie. De plus, si on isole les différents antioxydants du produit, on ne prend pas en compte les antagonismes et les synergies. La mesure de cette donnée permet de déterminer si tel ou tel aliment est plus intéressant potentiellement qu'un autre pour l'organisme. Enfin, il est possible que la forme d'ingestion des polyphénols, libre ou liée, de manière covalente ou non, à des macromolécules, ait une influence sur leur pouvoir antioxydant.

Les différentes méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant et leurs avantages et inconvénients sont synthétisés dans le tableau VI. Il existe deux types de méthodes pour mesurer le pouvoir antioxydant d'un aliment ou d'un fluide biologique : des méthodes qui étudient une action antioxydante vis-à-vis de radicaux libres stables (mesure du pouvoir anti-radicalaire) ou de l'état d'oxydation d'un métal (mesure du pouvoir réducteur), et des méthodes qui vont étudier le comportement antioxydant lors de l'oxydation d'un substrat lipidique. Deux types de stratégies sont envisageables : soit des tests en système modèle, soit des tests évaluant le pouvoir antioxydant dans une matrice complexe. Dans tous les cas, il est important d'envisager l'influence de l'environnement direct de la molécule sur son pouvoir antioxydant.

II.1. INTERACTIONS DANS L'ALIMENT ET POUVOIR ANTIOXYDANT DES POLYPHENOLS

Il n'existe que très peu de données dans la littérature concernant l'effet sur le pouvoir antioxydant des complexes impliquant des polyphénols et formés dans la matrice alimentaire. En effet, l'industrie ayant longtemps considéré les polyphénols comme indésirables (cas du trouble de la bière), beaucoup d'équipes se sont essentiellement concentrées sur la recherche

de moyens visant à les éliminer. De plus, l'analyse du potentiel antioxydant d'un aliment ne peut se faire, sauf dans le cas des boissons, qu'après traitement (broyage ou extraction) de la matrice alimentaire, ce qui a pour conséquence de modifier l'organisation de celle-ci. Les possibilités de mesure directe sur les aliments solides sont considérablement limitées, tout au plus peut-on discuter de la quantité plus ou moins importante de polyphénols extraits de la matrice avant mesure du pouvoir antioxydant.

Pourtant, comme nous l'avons vu précédemment, les interactions entre les différents constituants d'un aliment, et en particulier celles faisant intervenir protéines et polyphénols, sont nombreuses. Elles peuvent se produire pendant la fabrication de l'aliment, pendant sa conservation, ou juste avant sa consommation, lors de sa préparation. Dans tous les cas, les conséquences sur le potentiel antioxydant que présentera l'aliment lors de son ingestion peuvent être notables.

Il est donc capital de déterminer l'influence de ces interactions polyphénols – macronutriments, sur la teneur en polyphénols disponibles de l'aliment : sont-ils libres ou retenus par les macromolécules ? Quelle est l'influence de ces interactions sur leur pouvoir antioxydant dans l'aliment ? Comment la maîtrise des interactions pourrait-elle permettre d'améliorer le pouvoir antioxydant de l'aliment ? …

II.1.1. Interactions se produisant lors de la fabrication ou la conservation de l'aliment

II.1.1.1. Evolution du pouvoir antioxydant des fruits pendant leur conservation

II.1.1.1.1. Conséquences du brunissement enzymatique sur les fruits

L'interaction entre les polyphénols du fruit et la polyphénoloxydase modifie de façon radicale la couleur du fruit, conduisant à des colorations brunes. Ce type d'interaction protéine/polyphénol conduit à une modification du pouvoir antioxydant des polyphénols. En effet, transformés en quinones par l'action de l'enzyme, ceux-ci deviennent extrêmement réactifs et se lient de façon covalente à certains résidus acides aminés des protéines notamment, rendant les groupements phénoliques inaccessibles. Il est donc capital de comprendre le mode d'action de ces enzymes pour pouvoir mieux contrôler les dégâts qu'elles provoquent.

Deux facteurs sont impliqués dans le brunissement enzymatique des fruits : la concentration en polyphénols dans le fruit et l'activité de la polyphénoloxydase. S'il est difficilement possible de maîtriser le premier, sauf en sélectionnant des variétés pauvres en polyphénols, en revanche le second dépend de plusieurs paramètres sur lesquels on peut plus ou moins agir.

Le pH semble avoir une influence assez limitée sur l'activité des polyphénoloxydases. En effet, elles montrent un optimum dans les zones de pH rencontrées dans les fruits et légumes, soit autour de 5 (pomme, aubergine, pomme de terre, poire) mais aussi à pH 7 pour certains fruits (kiwi, cerise, ananas). La polyphénoloxydase de la pomme conserve encore à pH 3 40% de son activité, ce qui sous-entend qu'elle peut être encore active dans les jus si elle n'est pas éliminée (Nicolas *et al.*, 1994).

Elles sont en revanche peu stables aux **températures supérieures à 40°C** (Nicolas *et al.*, 1994), excepté la polyphénoloxydase de tomate, qui présente un optimum à 40°C et pH 4,8, et n'est pas inactivée par le froid, puisqu'elle conserve encore 55% de son activité à 4°C (Spagna *et al.*, 2005).

Il est possible d'envisager de traiter le fruit par **certains acides carboxyliques aromatiques** susceptibles d'inhiber l'enzyme, mais leur action nécessite un abaissement du pH qui n'est pas nécessairement bénéfique à la qualité du produit (Nicolas *et al.*, 1994). Le contrôle de la concentration en oxygène dans le milieu de conservation des fruits peut se révéler une alternative satisfaisante.

On peut également envisager **d'agir sur les quinones elles-mêmes**, par l'ajout d'acide ascorbique, de sulfites ou d'acides aminés capables de réduire les quinones en *o*-diphénols (Nicolas *et al.*, 1994). Ces phénomènes peuvent se produire naturellement dans le fruit : le lycopène, présent dans la tomate, serait capable de contrer les effets négatifs de la polyphénoloxydase en régénérant les polyphénols oxydés par cette enzyme dans le fruit (Spagna *et al.*, 2005). Enfin, certains polyphénols de haute masse moléculaire, comme les procyanidines des pommes, sont capables d'inhiber la polyphénoloxydase (Le Bourvellec *et al.*, 2004b).

II.1.1.1.2. Libération de composés des parois chez les légumes

Si le stockage des fruits peut avoir des effets assez désastreux sur la quantité de polyphénols qu'ils contiennent, en particulier si les tissus sont lésés et par conséquent soumis à l'action de la polyphénoloxydase (Nicolas *et al.*, 1994), en revanche chez certains légumes, la quantité d'acide férulique libre ou extractible des parois augmente de manière spontanée lors de la conservation après 3 jours, comme par exemple chez l'asperge (Rodriguez-Arcos *et al.*, 2002). Cette libération est due à la sénescence des tissus, et fait augmenter le potentiel antioxydant de cette plante. Il a été envisagé d'améliorer le pouvoir antioxydant des jus d'asperges (produit largement consommé en Asie) par un procédé similaire, en ajoutant des enzymes pectolytiques pendant la production du jus (Sun *et al.*, 2005).

II.1.1.2. Pertes de pouvoir antioxydant liées à la transformation des fruits

II.1.1.2.1. Pertes de polyphénols lors du broyage et du pressurage des fruits

⇒ Fabrication de l'huile d'olive

Les polyphénols contenus dans les huiles d'olive ont un rôle majeur dans l'amélioration de la conservation de ces huiles car ils limitent le développement de l'oxydation des lipides qu'elles contiennent, aussi bien lors de la conservation que lors d'un chauffage, par friture ou au micro-ondes (Servili *et al.*, 2004). Pourtant, ils sont présents en faible quantité, puisque 98% des composés phénoliques présents dans l'olive sont perdus lors du procédé de fabrication. 45% de ces 98% perdus restent liés dans les tourteaux, et les 55% restants sont perdus en phase aqueuse lors du procédé de fabrication (Mulinacci *et al.*, 2001). Si l'huile est obtenue par pressurage, il s'agit de l'eau contenue dans l'olive. Si l'huile est obtenue par centrifugation de la pâte d'olive broyée, elle correspond à l'eau ajoutée à la pâte d'olive pour faire diminuer sa viscosité et ainsi améliorer l'extractibilité de l'huile depuis la phase solide. Les pertes en composés phénoliques sont alors beaucoup plus importantes puisque la quantité d'eau utilisée est bien plus élevée que dans le premier procédé (Servili *et al.*, 2004).

Ces pertes en composés phénoliques sont dues d'une part à leur faible affinité pour la fraction lipidique (Rodis *et al.*, 2002), mais aussi aux procédés de blanchiment appliqués aux olives avant le broyage et le pressurage. En effet, des enzymes endogènes à l'olive telles que la β-glucosidase, inactivées par le blanchiment, catalysent l'hydrolyse de l'oleuropéïne et de la déméthyloleuropéïne en leurs aglycones correspondants, moins solubles dans l'eau, durant la phase de broyage. L'inactivation de ces enzymes fait donc augmenter la quantité de polyphénols glycosylés et estérifiés susceptibles d'être perdus dans les eaux ajoutées pendant le procédé d'extraction (Servili *et al.*, 2004). De plus, la polyphénoloxydase est également susceptible d'oxyder les polyphénols en quinones, qui peuvent alors se lier de façon covalente aux parois cellulaires et rester dans les tourteaux d'extraction (Servili *et al.*, 2004).

Dans l'optique d'extraire davantage de polyphénols dans l'huile et d'améliorer ainsi son pouvoir antioxydant, il pourrait donc être intéressant de modifier le procédé d'extraction des huiles, notamment en utilisant moins d'eau dans le procédé et en contrôlant la concentration en oxygène dans le milieu lors du broyage (Rodis *et al.*, 2002). Dénoyauter les olives avant broyage pourrait permettre de diminuer la quantité d'enzymes oxydant les composés phénoliques hydrophiles, puisqu'elles sont majoritairement localisées dans le noyau. On pourrait également ajouter des enzymes susceptibles de dégrader les polysaccharides des parois cellulaires auxquels peuvent se lier les polyphénols oxydés, comme cela se fait lors du

pressurage des pommes, dans le but d'augmenter le rendement en matière sèche (Servili *et al.*, 2004).

⇒ **Pressurage des pommes à cidre**

Les variétés de pommes riches en procyanidines polymérisées donnent des jus qui sont pauvres en polyphénols (Sanoner *et al.*, 1999) car ces procyanidines s'adsorbent sous leur forme native sur les polysaccharides des parois et ne sont pas extraits (Renard *et al.*, 2001). Ainsi, le pouvoir antioxydant du jus de pomme obtenu de la variété Jonagold ne représente-t-il que 10% de celui des pommes d'origine, et cette valeur diminue encore (3%) si l'on ajoute une étape de macération enzymatique (Van Der Sluis *et al.*, 2002). Cependant, les polyphénols apportent tout de même 45 % du pouvoir antioxydant total du jus (Van Der Sluis *et al.*, 2002). De même, seulement 42 % des composés phénoliques de la pomme seraient extraits dans le jus, les acides hydroxycinnamiques et les dihydrochalcones étant les mieux extraits (respectivement 65 % et 80 %), alors que l'extraction des procyanidines, les plus susceptibles de se lier aux polysaccharides pariétaux, n'est que de 32 % (Guyot *et al.*, 2003). Ces pertes importantes lors de la transformation de la pomme relèguent la variété du fruit au second plan dans l'ordre d'importance des facteurs influant sur le pouvoir antioxydant du jus (Boyer et Liu, 2004).

De plus, la présence de polyphénols oxydés par la polyphénoloxydase pose également problème lors de la fabrication du cidre et du jus de pomme : elle fait diminuer la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique des polymères de la paroi (pectines) pendant la macération des moûts et donc leur extraction dans la boisson (Missang *et al.*, 1993 ; Renard *et al.*, 2001). C'est l'adsorption des polyphénols sur la paroi polysaccharidique, par formation de liaisons covalentes suite à l'oxydation des polyphénols de faible masse moléculaire (acide chlorogénique, catéchines) en quinones, qui limiterait l'accès des enzymes aux polysaccharides, voire les inhiberait (Massiot et Renard, 1997). Ce mécanisme pourrait co-exister avec l'adsorption directe des polyphénols sous forme native.

Pour lutter contre ces phénomènes, il a été proposé d'ajouter de l'acide ascorbique pendant l'étape de macération des moûts de pommes précédant le pressurage, de façon à réduire l'oxydation et à améliorer le rendement des enzymes pectolytiques ajoutées (Mihalev *et al.*, 2004). De même, le moût pourrait être chauffé, ce qui résulterait effectivement en l'inactivation de la polyphénoloxydase mais modifierait le goût et la couleur de manière conséquente (Van der Sluis *et al.*, 2004).

Ainsi, une partie du pouvoir antioxydant potentiel de la boisson peut se trouver perdue lors de sa fabrication, puisque les polyphénols resteraient dans la fraction polysaccharidique non extraite lors du pressurage des pommes.

II.1.1.2.2. Trouble des boissons et clarification des jus de fruits

Différents phénomènes peuvent se produire durant la conservation des jus de fruits (en particulier le jus de pommes) et de la bière, donnant des troubles désagréables à l'œil. Ils peuvent être classés en deux groupes :

- troubles d'origine biologique, liés au développement excessif de bactéries ou de levures,
- troubles d'origine chimique : rétrogradation de l'amidon, cristallisation des macromolécules polysaccharidiques extraites des parois cellulaires du fruit, ou encore formation de complexes polyphénols/protéines qui précipitent, oxydation enzymatique des composés phénoliques (Beveridge, 1997)**.** A noter que dans la bière, les troubles peuvent également provenir de la cristallisation de pentosanes, d'une élimination insuffisante d'auxiliaires de fabrication tels que des agents de filtration, ou encore de la formation de complexes protéines – polyphénols (Siebert, 1999).

Ces troubles peuvent apparaître entre quelques jours et quelques mois après la fabrication, entraînant un problème de qualité sérieux lorsqu'il est détecté tardivement. Seuls les problèmes faisant intervenir les polyphénols seront traités dans cette partie.

⇒ La précipitation de complexes protéines-polyphénols dans la boisson

Ce phénomène a été décrit de manière assez précise dans le cas du trouble de la bière. Deux étapes distinctes peuvent être observées dans sa formation (figure 28) :

- Le trouble réversible ("chill haze"), étape initiale durant laquelle les associations protéines polyphénols sont faibles et les complexes plus ou moins solubles. Ce trouble peut être facilement dissipé par un simple chauffage.
- Le trouble irréversible, processus demandant quelques jours et se traduisant par l'apparition d'amas colloïdaux indissociables finissant par sédimenter.

A l'origine d'une diminution de l'acceptabilité du produit par le consommateur, ces troubles sont donc souvent considérés comme un défaut que l'on cherche à éliminer. La solution adoptée est alors assez simple : on élimine le trouble à sa source, en éliminant les polyphénols. Ce procédé, appelé clarification pour les jus de fruits, fait par conséquent nettement diminuer le pouvoir antioxydant, mais est parfois indispensable dans certains jus sinon trop astringents, comme le jus de pamplemousse (Vardin et Fenercioglu, 2003).

La méthode consiste en général à ajouter dans le milieu des protéines (gélatine additionnée de bentonite, qui gonfle fortement au contact de l'eau) ou de la polyvinylpolyrrolidone, qui entrent en compétition avec les protéines endogènes pour la fixation au polyphénol. Une simple filtration permet ensuite d'éliminer les complexes ainsi formés (Vardin et Fenercioglu, 2003). La polyvinylpolyrrolidone est également utilisée lors du procédé de fabrication de la bière (Siebert, 1999).

Toutefois, l'émergence des procédés d'ultrafiltration permet de limiter les pertes en polyphénols : au lieu de tous les éliminer sans distinction, elle permet de retenir sélectivement les polyphénols de plus forte masse moléculaire, à l'origine des précipitations dans le jus (Beveridge, 1997). Ainsi le jus de pomme se trouve-t-il enrichi en composés phénoliques de faible masse moléculaire : des pertes de 34,9% d'acide chlorogénique sont observées en utilisant un procédé classique de clarification, contre seulement 6,7% lors de l'ultrafiltration du même jus ; les pertes en procyanidine B2 quant à elles sont respectivement de 32% et 12,1% (Gokmen *et al.*, 2003). La polyphénoloxydase n'est pas inhibée par ce procédé, mais le procédé d'ultrafiltration étant deux fois plus rapide que la clarification conventionnelle (3h au lieu de 6), elle est moins à même d'agir pendant le procédé de fabrication (Gokmen *et al.*, 2003).

Une meilleure maîtrise de l'étape de macération du moût de pommes en présence d'enzymes pourrait avoir des effets spectaculaires sur la qualité du jus correspondant. En particulier, le choix des enzymes pectolytiques est important : certaines préparations commerciales, présentant des activités protéases secondaires, inhibent les interactions protéines-polyphénols et permettent ainsi l'enrichissement des jus en ces derniers, notamment en acide chlorogénique, tout en évitant la libération d'un excès de glycoprotéines susceptibles de précipiter (Mihalev *et al.*, 2004).

⇒ **Problèmes liés à la polyphénoloxydase dans les jus de fruits non clarifiés**

Le jus de pomme « à l'ancienne », autrement dit n'ayant pas subi le procédé de clarification, est de plus en plus populaire auprès des consommateurs de produits « naturels et authentiques », non pas pour son contenu en polyphénols mais pour ses qualités organoleptiques et sa couleur qui le distinguent des jus de pommes clarifiés. Dans ce jus, une légère opalescence est considérée comme un signe de qualité (Beveridge, 1997). Elle est attribuable à la présence de pulpe en suspension, composée de pectines solubles et/ou particules de protéines chargées positivement, contenant de la cellulose et des pectines partiellement déméthylées, de taille plus ou moins importante, formant un léger trouble assez

stable dans le temps. Le marché étant porteur, les producteurs ont recherché des solutions permettant de conserver les qualités visuelles du jus en luttant notamment contre l'oxydation due à la polyphénoloxydase , susceptible d'être encore active au pH du jus de pomme (Nicolas *et al.*, 1994).

Dans ce type de jus de pomme, on a donc longtemps eu recours à l'ajout de quantités massives d'antioxydants, principalement de la vitamine C ou ses dérivés, couplé à une flash pasteurisation inhibant les enzymes (Beveridge, 1997). Cependant, il s'agit d'additifs coûteux qui, en plus, donnent un goût acide au jus et peuvent occasionner un brunissement non enzymatique lors d'un entreposage prolongé. Certains producteurs ont tenté d'ajouter des produits basiques qui ramènent l'acidité du jus de pomme à son niveau normal de 3,5 à 3,9, mais cette opération entraîne la production de sel, ce qui donne un goût plutôt inattendu au jus de pomme (Tronc *et al.*, 1997).

L'électrodialyse des jus a été proposée comme une alternative intéressante. L'application d'un courant électrique dans un réservoir à plusieurs compartiments contenant du jus de pomme séparé d'une solution de KCl par une membrane bipolaire provoque une acidification du jus. En abaissant le pH à 2,7, on réduit de 81 % l'activité des enzymes responsables du brunissement sans altérer la couleur. Cette technique permet également de faire revenir ensuite le pH du jus à son niveau normal, sans que l'enzyme ne retrouve son activité, ce qui laisse entrevoir des applications industrielles intéressantes (Tronc *et al.*, 1997). Le procédé industriel couramment utilisé reste cependant la centrifugation/décantation (Beveridge, 1997).

Ainsi, en supprimant les troubles sans supprimer les polyphénols, peut-on espérer conserver un pouvoir antioxydant satisfaisant dans ces jus.

II.1.1.2.3. La transformation des fèves de cacao

⇒ La fermentation du cacao

Dans certains aliments tels que le cacao, les interactions protéines-polyphénols peuvent être recherchées. En effet, les interactions entre protéines et leucoanthocyanidines se produisant durant l'étape de fermentation de ce produit seraient à l'origine d'une diminution de son astringence (Lee, 1983). C'est d'ailleurs probablement ce même processus qui conduit les consommateurs à rajouter du lait dans certaines boissons. Si le pouvoir antioxydant potentiel de l'aliment se trouve ainsi amoindri (Sánchez-González *et al.*, 2005), en revanche l'acceptabilité du produit est plus grande.

⇒ **Le chocolat au lait**

Les résultats d'une étude de biodisponibilité de la (-)-épicatéchine du chocolat (Serafini *et al.*, 2003) suggèrent la formation de complexes entre ce polyphénol et les protéines du lait ajoutées pendant le procédé de fabrication du chocolat. Cependant, aucune étude ne s'est directement intéressée à l'effet de l'ajout de lait sur le pouvoir antioxydant du produit fini. Une étude comparant le pouvoir antioxydant de différents échantillons de cacao, chocolat au lait et chocolat noir provenant du commerce, donc non fabriqués à partir du même lot de cacao, montre cependant que l'efficacité antioxydante du chocolat noir vis-à-vis de l'oxydation des LDL *ex-vivo* est équivalente à celle des poudres de cacao malgré un contenu en polyphénols supérieur dans ces dernières, mais que le chocolat au lait est moins efficace par rapport aux deux précédents (Vinson *et al.*, 1999). Ce résultat n'est pas dû à son contenu moindre en polyphénols, puisque les quantités de chaque chocolat utilisé pour le test ont été choisies de façon à contenir 100µM de polyphénols en équivalents catéchine (tableau VII). On peut donc penser qu'il se forme des complexes protéine-polyphénol dans cet aliment, à l'origine du pouvoir antioxydant moindre observé. Cependant, il serait nécessaire de mener ce type de test sur des chocolats fabriqués à partir du même lot de cacao et dont la composition serait entièrement connue.

II.1.1.3. Valorisation de sous produits alimentaires : vers une amélioration du pouvoir antioxydant des aliments ?

II.1.1.3.1. Valorisation des sous-produits riches en fibres

Le moût de pomme, sous-produit de la fabrication du jus de pomme et du cidre, est riche en composés phénoliques (phloridzine, acide chlorogénique, (-)-épicatéchine, quercétine glycosylée, procyanidines) qui ne sont pas extraits dans le jus suite aux interactions avec les polysaccharides pariétaux. Il en est de même pour les pelures de pommes, sous-produits de la fabrication des pommes pelées en boite. On recherche donc activement des moyens d'exploiter le fort potentiel antioxydant que ces sous-produits représentent, en tant que compléments alimentaires ou comme extraits antioxydants. Les résultats les plus probants ont été obtenus par lyophilisation (Boyer et Liu, 2004) ou par extraction éthanolique (Van der Sluis *et al.*, 2004). Il pourrait être intéressant de ré-enrichir les jus de pomme avec ces extraits, si la législation le permettait (Van Der Sluis *et al.*, 2002), d'autant plus qu'il a été montré que les polyphénols de plus haut poids moléculaire contenus dans la pomme, les procyanidines, étaient capables d'inhiber la polyphénoloxydase. Le taux d'inhibition croît avec le degré de polymérisation des procyanidines : 50% de l'activité de la

polyphénoloxydase est perdue par ajout de 0,026g/L de la fraction de procyanidines de degré de polymérisation 80, alors qu'il faut 0,17g/L de la fraction 10,5 ou encore 1g/L de la fraction 4, pour obtenir le même résultat (Le Bourvellec *et al.*, 2004b).

Le ré-enrichissement du jus de pomme par les composés phénoliques extraits des moûts par l'éthanol permet d'obtenir des jus de pomme ayant une activité antioxydante 5 fois supérieure à celle des jus obtenus par le procédé classique, ce qui représente alors 52 % du pouvoir antioxydant de la pomme d'origine (Van der Sluis *et al.*, 2004). La valorisation des sous-produits de l'industrie de la transformation de la pomme pourrait donc permettre de restaurer le pouvoir antioxydant perdu lors de la transformation de ce fruit en jus ou en cidre.

De même, les fibres des parties non comestibles de l'ananas sont très riches en polyphénols, qui sont de plus beaucoup plus diversifiés que ceux des fibres du son de blé et peuvent représenter jusqu'à 35 % du fruit. On a notamment mis en évidence la présence de myricétine, d'acide salicylique, d'acide tannique et d'acide *p*-coumarique (Larrauri *et al.*, 1997). Elles présentent un pouvoir antioxydant supérieur à d'autres extraits commerciaux de fibres et n'ont pas de goût particulier, contrairement aux extraits de fibres d'agrumes (Larrauri *et al.*, 1997). Cependant, s'il est évoqué par les auteurs de les ajouter dans des aliments comme extrait antioxydant à la fois riche en fibres et en polyphénols, la création de nouvelles interactions dues au fait que ces polyphénols ne sont pas ajoutés sous forme purifiée et peuvent donc être ajoutés sous forme liée à d'autres macronutriments, ce qui pourrait engendrer des pertes considérables de pouvoir antioxydant voire des qualités nutritionnelles de l'aliment (complexation avec les protéines), n'est pas envisagée.

II.1.1.3.2. Valorisation des eaux perdues lors de la fabrication de l'huile d'olive

L'utilisation des polyphénols perdus lors de la fabrication de l'huile d'olive, comme antioxydants naturels à ajouter aux aliments ou à inclure dans des compléments alimentaires, est fortement envisagée (Mulinacci *et al.*, 2001 ; Visioli *et al.*, 1999). En effet, 98 % des polyphénols de l'olive sont retrouvés dans les phases aqueuses lors de la fabrication de l'huile. Il s'agit de plus de polyphénols ayant montré un pouvoir antioxydant intéressant *in vitro* (Vissers *et al.*, 2004) et *ex-vivo*, agissant principalement par chélation des ions, mais aussi en captant les radicaux libres: tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropéine (figure 29).

La concentration de ces polyphénols à partir d'une phase aqueuse est difficile. L'extraction par chromatographie sur Sephadex LH-20 semble donner les résultats les plus intéressants, comparée aux résines échangeuses d'ions ou aux extractions liquide-liquide à l'acétate d'éthyle (Visioli *et al.*, 1999). Si des extraits suffisamment purs et exempts de contaminations chimiques étaient obtenus, la fabrication d'huile d'olive « à teneur garantie » en composés

phénoliques pourrait être alors envisagée. Le pouvoir antioxydant mais aussi la conservation de l'huile obtenue en seraient probablement améliorés.

II.1.2. Interactions se produisant lors de la consommation de l'aliment

II.1.2.1. Effets de la préparation domestique des aliments

S'il est facile de visualiser l'impact du brunissement enzymatique provoqué par le découpage des fruits et légumes, en revanche peu d'études ont cherché à quantifier les effets de ce type de préparation domestique sur le pouvoir antioxydant des aliments à la consommation. Chez l'asperge, des pertes de 18,5 % en flavonols, ainsi que de pouvoir antioxydant, sont observées une heure après la découpe, alors que le même traitement ne semble pas avoir d'effet sur le pouvoir antioxydant des oignons (Makris et Rossiter, 2001).

De même, l'extraction des polyphénols des jus d'agrumes est meilleure par le procédé industriel que par le pressage domestique : un gain de 22 % dans le jus d'orange est observé, notamment dû à des polyphénols contenus dans les peaux (hespéridine, naringine), très peu extraits par le pressage domestique. De même, dans le jus de pamplemousse, le procédé industriel extrait la punicalagine (ellagitanin) à hauteur de 1,5 à 1,9 g/L, ce qui résulte en une augmentation de 30 % du pouvoir antioxydant des jus industriels par rapport aux jus domestiques (figure 30, tableau VIII) (Gil *et al.*, 2000). Cependant, ces résultats sont à pondérer dans le cas du jus d'orange car des pertes en polyphénols de 47 % sont observées dans la pulpe du fruit, qui est rajoutée après pasteurisation au jus à la fin du procédé industriel (Gil-Izquierdo *et al.*, 2002a). Dans le cas de ce procédé, le gain de pouvoir antioxydant est donc amoindri par ces pertes.

II.1.2.2. Effets de la cuisson domestique des aliments

Les procédés de cuisson domestique trop drastiques, comme le fait de faire bouillir les légumes, sont capables de détruire certains polyphénols, faisant diminuer d'autant le pouvoir antioxydant de ces aliments : faire bouillir des asperges ou des oignons pendant 60 minutes détruit par exemple respectivement 43,9 % et 20,6 % des flavonols qu'ils contiennent (Makris et Rossiter, 2001). De même, de légères diminutions en polyphénols, corrélées de manière significative à une diminution du pouvoir antioxydant, sont observées lors de la cuisson des épinards (Kuti et Konuru, 2004).

En revanche, dans certains cas, l'inverse se produit : la cuisson peut permettre la libération de polyphénols auparavant emprisonnés dans la matrice végétale. La cuisson de la tomate ne modifie en rien son contenu en composés phénoliques, mais permet la libération d'autres composés antioxydants non phénoliques comme le lycopène (Dewanto *et al.*, 2002). Le

pouvoir antioxydant de la fraction hydrophile de différents végétaux ainsi que le contenu en composés phénoliques a été mesuré avant et après cuisson (4 minutes à l'eau bouillante, sauf pommes de terres, cuites au four à 218°C). Les résultats montrent que le contenu en polyphénols est affecté de manière différente selon le produit (tableau IX) : on observe une diminution du contenu en composés phénoliques et du pouvoir antioxydant après cuisson chez l'asperge, les brocolis et les carottes. La cuisson n'affecte pas ces paramètres chez la pomme de terre blanche ou la patate douce, en revanche elle fait augmenter le contenu en polyphénols totaux et le pouvoir antioxydant des tomates, du chou rouge, des oignons, des pommes de terre rouges et « reinette grise » (Wu *et al.*, 2004).

II.1.2.3. Préparation domestique des boissons au lait

Les boissons riches en polyphénols, telles que le thé, le café ou le chocolat, sont souvent consommées avec du lait.

Dans une étude datant de 1963, Brown et Wright, utilisant la migration des protéines en électrophorèse, suggéraient que les protéines du lait étaient susceptibles d'interagir avec les polyphénols du thé. Les tanins du thé noir, notamment, interagiraient avec les caséines et les lactoglobulines, l'α-lactalbumine ne pouvant interagir avec les polyphénols du thé que si la caséine n'est pas présente dans le milieu (Brown et Wright, 1963).

L'impact des interactions flavonoïdes-protéines sur la capacité antioxydante totale des polyphénols, a été étudié par le test TEAC (Arts *et al.*, 2002, cf. tableau VI). Les auteurs ont ainsi constaté que le pouvoir antioxydant de mélanges de flavonoïdes du thé vert ou noir et de protéines telles que la caséine ou encore l'albumine, était masqué en partie par les interactions polyphénols-protéines et qu'il dépendait de la matrice (thé ou milieux aqueux) ainsi que du type de flavonoïdes (Figure 31) et de protéines employé (Figure 32). Ainsi, la caséine β couplée à la (-)-épigallocatéchine ou à l'acide gallique, masque nettement le pouvoir antioxydant de ces composés. L'efficacité des caséines dans ce processus semble suivre leur richesse en proline. Des effets similaires de masquage du pouvoir antioxydant sont observés dans cette étude avec le thé, noir ou vert (Arts *et al.*, 2002) . Cependant, une autre étude (Serafini *et al.*, 1996) montre des résultats contradictoires : il ne semble pas exister de différence entre le pouvoir antioxydant (test FRAP, cf. tableau VI) de solutions de thé, vert ou noir, auxquelles sont ajoutés ou non 25 % de lait (figure 33). De même, une étude *in vitro* de l'oxydation des LDL ne fait apparaître aucune différence dans les cinétiques d'oxydation de ces LDL incubées avec du thé noir, en absence ou en présence de 10 % de lait (Richelle *et al.*, 2001).

Des résultats comparables ont été observés avec une boisson au chocolat contenant 66 % de lait (Richelle *et al.*, 2001). Pourtant, il a été montré (figure 34) que l'interaction de procyanidines extraites du sorgho avec de la gélatine faisait légèrement diminuer leur pouvoir antioxydant dans le test TEAC (Riedl et Hagerman, 2001). Le chocolat contenant également des procyanidines, on peut imaginer une complexation des protéines du lait avec les procyanidines du cacao dans une préparation de chocolat au lait à boire.

En revanche, certains travaux (Sánchez-González *et al.*, 2005) suggèrent que le pouvoir antioxydant du café expresso, mesuré par les tests FRAP et ABTS, diminue lorsque l'on ajoute du lait dans le milieu. Aucun résultat chiffré n'est cependant fourni dans cette étude.

Les résultats expérimentaux concernant les boissons au lait sont donc contradictoires et semblent dépendre au moins des tests de mesure du pouvoir antioxydant utilisés.

Dans l'aliment, les interactions polyphénols/macronutriment ont donc comme conséquence :

- *d'éliminer ou de rendre inactive une partie des polyphénols contenus dans le fruit d'origine, notamment par oxydation enzymatique.*
- *de limiter l'extraction des composés phénoliques dans le produit fini lors de la fabrication.*
- *Probablement de limiter le pouvoir antioxydant potentiel d'un aliment vis-à-vis de l'organisme en bloquant une ou plusieurs fonctions phénoliques.*

II.2. INTERACTIONS DANS L'ORGANISME ET POUVOIR ANTIOXYDANT DES POLYPHENOLS

Lorsque l'aliment est ingéré, on peut se demander si les composés phénoliques liés aux macromolécules sont susceptibles d'être libérés lors de la digestion, ou au contraire, si la complexation peut s'en trouver renforcée. De même, lorsqu'ils sont ingérés, les polyphénols liés aux macronutriments peuvent avoir un pouvoir antioxydant différent vis-à-vis des lipides des parois du tube digestif ou de ceux du bol alimentaire que leurs équivalents libres. Enfin, la question du devenir du pouvoir antioxydant de tels polyphénols, une fois absorbés, se pose également.

De plus, dans l'organisme, de nombreuses interactions, qui n'existaient pas dans l'aliment seul, peuvent se produire lorsque celui-ci se trouve mélangé aux autres composants du bol alimentaire ou en interaction avec les protéines du milieu digestif. Ont-elles une influence sur le pouvoir antioxydant des polyphénols ?

Dans tous les cas, il est important de déterminer les conséquences sur le pouvoir antioxydant des polyphénols :

- vis-à-vis des lipides de l'aliment lors de la digestion
- vis-à-vis des lipides de la paroi du système digestif
- vis-à-vis des lipides et des protéines du milieu intérieur.

II.2.1. Interactions se formant lors de la digestion des composés phénoliques

II.2.1.1. Interactions au niveau buccal : l'astringence

Les interactions intervenant dans le phénomène d'astringence, que ce soit avec les protéines salivaires ou les polysaccharides alimentaires, peuvent bloquer les fonctions phénoliques (Spencer *et al.*, 1988). On peut donc supposer qu'elles font diminuer le pouvoir antioxydant que les polyphénols pourraient exercer vis-à-vis des muqueuses buccales.

II.2.1.2.Interactions au niveau gastro-intestinal

II.2.1.2.1. Digestion des fibres

Les pontages d'acide férulique dans les fibres ne sont que très peu altérés par la digestion. L'incubation de son de blé avec des enzymes gastriques et intestinales ne libère que 2,6% de l'acide férulique (Kroon *et al.*, 1997). Les acides phénoliques ne pourraient donc être que très peu absorbés à ce niveau du tractus digestif.

En revanche, même si aucune étude ne s'est jamais intéressée au sujet, on peut parfaitement imaginer, au vu des conditions de pH du système digestif (estomac : 1,5 à jeun, intestin : de 5,5 à 7,7 selon le segment (Ekmekcioglu, 2002)), qu'il se forme des interactions entre les polysaccharides des parois végétales et les polyphénols ingérés simultanément, par des phénomènes similaires à ceux décrits lors du pressurage des pommes (Le Bourvellec *et al.*, 2004a). Ces polysaccharides n'étant pas ou peu digérés au niveau gastro-intestinal, et si la liaison se fait réellement au niveau de la fonction phénolique (Le Bourvellec *et al.*, 2004a) et inactive son effet antioxydant, ces polyphénols pourraient arriver directement au niveau du côlon, où la digestion des fibres pourrait les libérer. Ils pourraient alors être absorbés ou exercer leur effet antioxydant sur la paroi du côlon.

II.2.1.2.2. Conséquences des interactions protéines/polyphénols sur le pouvoir antioxydant des polyphénols lors du tractus gastro-intestinal

⇒ Digestion des complexes protéines/polyphénols de nature covalente

Les parties brunies des fruits et légumes ou les boissons dont la couleur est altérée ne sont en général pas consommées dans les pays industrialisés. En revanche, dans les pays en voie de développement où la nourriture est moins abondante et les conditions de conservation plus difficiles, des aliments contenant ce type de complexes sont susceptibles d'être ingérés. De même, des complexes polyphénols/protéines animales à liaisons convalentes sont susceptibles de se former dans les aliments complexes. On peut donc se demander ce qu'il advient de ces complexes polyphénols/protéines à liaison covalente après ingestion, et s'ils ont une influence sur la qualité nutritionnelle des protéines et sur le pouvoir antioxydant des polyphénols.

L'étude de la susceptibilité à la digestion protéolytique *in vitro* d'un système modèle (figure 35), le complexe myoglobine - acide phénolique (acide caféique, chlorogénique et quinones correspondantes), a montré que la digestibilité de la myoglobine était moins bonne, mais pas annulée, lorsque celle-ci était complexée avec un acide phénolique, en particulier pour les résidus lysine et arginine (Kroll *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont été obtenus avec les protéines du lactosérum (Rawel *et al.*, 2001a) et les protéines de soja (Rawel *et al.*, 2002a) : leur digestibilité est altérée lorsqu'elles sont ingérées sous forme de complexes covalents formés à pH basique (pH 9) avec des acides phénoliques tels que l'acide caféique ou l'acide férulique.

Les complexes à liaison covalente diminueraient donc la qualité nutritionnelle des protéines, mais on peut également émettre l'hypothèse d'une digestion partielle des protéines, donnant des peptides auxquels les polyphénols seraient toujours complexés. Ces complexes pourraient alors éventuellement être absorbés tels quels, mais feraient diminuer le potentiel antioxydant des composés phénoliques vis-à-vis des lipides lors du tractus gastro-intestinal si les groupements phénoliques sont bloqués par l'interaction.

⇒ Complexes formés dans l'organisme pendant la digestion

Peu d'études se sont intéressées aux conséquences de la formation de complexes protéines/polyphénols lors du tractus gastro-intestinal, sur le pouvoir antioxydant des polyphénols pendant celui-ci ; ce phénomène est en revanche souvent évoqué en hypothèse dans les discussions des études concernant les effets "anti-nutritionnels" des tanins (diminution de l'efficacité alimentaire des protéines suite à la co-ingestion de tanins).

Ces études suggèrent qu'une grande partie des polyphénols qui précipitent avec les protéines dans l'organisme se retrouvent directement dans les fèces, si aucun système enzymatique ou bactérien ne les dissocie par la suite. Certains auteurs (Shahkhalili *et al.*, 1990) expliquent par exemple de cette manière la faible digestibilité des protéines du cacao (complexes formés lors de la fermentation des fèves de cacao). Il est cependant vraisemblable au vu de leur taille, que de tels complexes ne soient pas ou très peu absorbés s'ils sont indissociables dans les conditions de la digestion.

Ces effets « anti-nutritionnels » pourraient donc également être considérés comme des effets "anti-polyphénols" et semblent être suffisants pour faire diminuer de façon importante le pouvoir antioxydant que les composés phénoliques non absorbés peuvent exercer vis-à-vis de la muqueuse gastro-intestinale.

II.2.1.3. Devenir des complexes polyphénol / macromolécules au niveau du côlon

Les complexes protéines/polyphénols ne seraient pas dissociés au niveau du côlon. En revanche, la digestion des fibres par les bactéries du côlon est susceptible de libérer les composés phénoliques constitutifs de la paroi cellulaire. 20 % des acides hydroxycinnamiques liés pourraient être libérés (Andreasen *et al.*, 2001a).

Il a été montré que l'incubation de son de blé avec un inoculum de flore fécale humaine provoquait une hydrolyse des fibres en deux étapes (Kroon *et al.*, 1997). La première consiste en une coupure des chaînes de xylopyranose (activité xylanase), libérant ainsi des féruloyl-oligosaccharides. Les bactéries probiotiques sont également capables de réaliser ces hydrolyses (Crittenden *et al.*, 2002). Dans un second temps, ces résidus peuvent être hydrolysés par des estérases (cinnamoyl estérases (Kroll *et al.*, 2000)) qui libèrent des monomères ou des dimères d'acide férulique (figure 36). Cette activité varie d'un acide hydroxycinnamique à l'autre : en prenant comme modèle des acides hydroxycinnamiques estérifiés par une fonction méthyle, il a été montré que l'activité de l'estérase décroissait selon l'ordre suivant : méthyl-*p*-coumarate > méthylférulate = méthylcaféate > méthylsinapate (Andreasen *et al.*, 2001b). L'ensemble de ces métabolites peut être ensuite réabsorbé au niveau du côlon et métabolisé dans l'organisme.

Ce phénomène n'a pas uniquement lieu dans le gros intestin puisque l'activité estérase est retrouvée tout au long du tube digestif chez l'homme, même si son origine est probablement bactérienne. Lorsque l'on donne à des rats des acides hydroxycinnamiques marqués au ^{14}C intégrés dans les parois cellulaires d'épinards, 25 % de la radioactivité sont retrouvés dans l'organisme deux heures seulement après ingestion, donc avant que le bol

alimentaire n'ait atteint le côlon, ce qui suggère qu'une hydrolyse partielle a bien lieu dans le système gastro-intestinal (Buchanan *et al.*, 1996).

Le pouvoir antioxydant des produits de la digestion des fibres serait légèrement supérieur à celui de l'acide férulique lui-même : cela a été notamment montré pour le 5-O-féruloyle arabinofuranose, et le (5-O-féruloyl-α-L-arabinofuranosyle)-(1→3)-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose vis-à-vis de l'oxydation de lipides de microsomes de rats (Ohta *et al.*, 1994). Ces composés pourraient donc avoir une activité antioxydante intéressante vis-à-vis des lipides membranaires du côlon et participer à l'activité anti-cancer des fibres alimentaires. La lignine, bien que phénolique, ne constitue pas *a priori* un composé intéressant pour le pouvoir antioxydant : les parois qui en contiennent de grandes concentrations sont peu fermentescibles (Ferguson *et al.*, 2001).

La part d'acide férulique non absorbé est métabolisée par les bactéries coliques : des réductions, déméthylations et déhydroxylations en C4 ou en C3 se produisent, donnant par exemple de l'acide 3-hydroxyphénylpropionique. Les dimères d'acide férulique peuvent aussi être dégradés (Chesson *et al.*, 1999). On peut donc supposer que les effets antioxydants sur les lipides de la paroi colique peuvent être améliorés ou diminués, selon le produit obtenu.

II.2.2. Interactions après absorption

Un dernier niveau peut encore être envisagé, comme le suggèrent plusieurs études *in vitro* récentes : une complexation au niveau sanguin qui diminuerait le pouvoir antioxydant des polyphénols absorbés.

Des chercheurs ont ajouté à concentration physiologique des polyphénols (quercétine, rutine, (+)-catéchine, 7-mono-éthyle rutoside) à du plasma ou à une solution d'albumine dans les mêmes conditions de pH (Arts *et al.*, 2001d).. Le pouvoir antioxydant a ensuite été mesuré par le test TEAC. La diminution du pouvoir antioxydant a ensuite été calculée comme étant la différence entre la capacité antioxydante que l'on devrait obtenir théoriquement et ce que l'on obtient expérimentalement. Les résultats montrent qu'en présence de plasma, des pertes de 40 % sont observées par rapport aux valeurs théoriques (figure 37). Les auteurs attribuent ces valeurs à une liaison des polyphénols à l'albumine dans le plasma, qui masquerait le pouvoir antioxydant (Arts *et al.*, 2001d). Il a également été montré que des glycoprotéines riches en histidine et le fibrinogène contenus dans le plasma présentaient une forte affinité pour la (-)-épigallocatéchine gallate (Sazuka *et al.*, 1996).

Cependant, certains composés phénoliques ne se lient pas à l'albumine et sont par conséquent plus efficaces dans la protection des dommages oxydatifs causés aux protéines plasmatiques par la présence de radicaux libres, que d'autres composés, plus intéressants en théorie, mais

dont la liaison à l'albumine fait diminuer le potentiel antioxydant. Ce serait notamment le cas pour l'acide chlorogénique, plus efficace que la quercétine (Salvi *et al.*, 2001).

Afin de déterminer si les flavonols se trouvaient dans la fraction lipidique (HDL-LDL-VLDL), dans la fraction aqueuse ou liés aux protéines, le spectre d'absorption UV-Visible du plasma de rats nourris avec un régime contenant 0,5 % (p/p) de quercétine a été comparé à celui de rats recevant un régime non supplémenté (Manach *et al.*, 1995). Le plasma des rats supplémentés présente une absorbance à 411 nm qui ne correspond pas à la λ_{max} de la quercétine (375 nm) dans du tampon phosphate pH 7,4. L'effet bathochrome est également observé après incubation de quercétine avec de l'albumine (1/5, mol/mol), ce qui suggère un transport des flavonols par l'albumine. Plus de 90 % de la quercétine seraient liés à l'albumine (Manach *et al.*, 1995). Cette hypothèse a pu être confirmée par d'autres techniques : ultracentrifugation d'une solution de [4-^{14}C]-quercétine dans du plasma (Mullen *et al.*, 2002) ou utilisation de la fluorescence (Dangles *et al.*, 2001 ; Dufour et Dangles, 2005). Cette dernière technique a de plus permis de mieux caractériser la nature du complexe albumine/quercétine : stoechiométrie 1/1, maintenu par des liaisons faibles de type Van der Waals avec une constante de liaison moyenne de 6.10^4 M^{-1} à 25°C.

Ces liaisons pourraient aussi être de nature covalente. Rohn *et al.* (2004) ont formé, par oxydation, des dérivés sérum albumine bovine (SAB)/quercétine à liaison covalente, et évalué les pertes de pouvoir antioxydant consécutives. Ils observent que plus le taux de quercétine liée à la SAB est élevé, plus son pouvoir antioxydant, mesuré par le test TEAC, diminue. Avec le ratio maximal utilisé (SAB/quercétine 1/99 mol/mol), 15,5 % de la quercétine sont liés de façon covalente à la SAB, et le pouvoir antioxydant de la molécule ne représente que 79 % de celui que l'on obtient pour la molécule libre (Rohn *et al.*, 2004).

Cependant, le pourcentage de liaison dépend de deux paramètres : il augmente fortement avec l'augmentation du rapport albumine/quercétine et dépend de la structure chimique de la molécule (Dangles *et al.*, 2001 ; Manach *et al.*, 1999). En effet, le kaempférol, qui ne diffère de la quercétine que par l'absence d'un groupement hydroxyle en position 3', présente une capacité de liaison environ 10 fois plus faible que la quercétine. La glycosylation des flavonols en position 3 réduit également la formation de complexes flavonol/sérum albumine bovine. A l'inverse, la fisétine, qui ne possède pas de groupement hydroxyle en position 5, a une capacité de liaison deux fois plus forte que la quercétine. Par ailleurs, le dosage de la quercétine (aglycone + conjuguée) contenue dans les LDL de sujets ayant consommé des oignons a été réalisé (Moon *et al.*, 2000). La concentration de quercétine incorporée (et de ses métabolites conjugués) est très faible : 0,03 nmol/mg de LDL. De même, par

ultracentrifugation, il est possible de déterminer la fraction plasmatique contenant le plus de resvératrol. La fraction protéique en contient la plus grande partie ($76,4 \pm 13,2$ %) (Belgendouz, 1997), tandis que seuls $3,72 \pm 0,47$ % du resvératrol sont retrouvés dans les lipoprotéines plasmatiques.

Les flavonols, dont la quercétine, ainsi que des polyphénols comme le resvératrol, semblent donc très largement liés à l'albumine. Ceci constitue un paramètre important du point de vue de l'action antioxydante potentielle de ces composés dans l'organisme. Cependant, la liaison de ces molécules à l'albumine présente un avantage certain pour l'organisme, au niveau de leur distribution : elle retarde leur élimination par voie urinaire. En effet, la vitesse d'élimination peut être caractérisée d'un point de vue pharmacocinétique par le $t_{1/2}$, temps au bout duquel la concentration plasmatique maximale du composé est divisée par deux. Calculé après injection intraveineuse de quercétine, ce $t_{1/2}$ est de $17,2 \pm 3,7$ heures chez l'homme (Ader *et al.*, 2000). Ainsi, la vitesse d'excrétion, qui comparativement aux autres polyphénols est faible, peut s'expliquer par deux mécanismes : le premier est la liaison de la quercétine et de ses métabolites à l'albumine, ce qui augmente les délais d'élimination par le rein (Graefe *et al.*, 1999 ; Manach *et al.*, 1995) ; le second est l'élimination préférentielle de la quercétine par voie biliaire.

Après ingestion, le pouvoir antioxydant potentiel des polyphénols vis-à-vis des lipides et des protéines du système digestif est donc susceptible d'être limité par la formation de nouvelles interactions avec les protéines et les fibres de la matrice alimentaire, au niveau buccal et gastro-intestinal, si les fonctions phénoliques sont bloquées par l'interaction et si cela neutralise leur effet antioxydant. La majorité de ces complexes se retrouverait ainsi dans les fèces, comme suggéré par l'augmentation de leur masse azotée lors de la consommation simultanée de protéines et de tanins. Les complexes ainsi formés pourraient donc n'avoir pas ou peu d'effets bénéfiques vis-à-vis du tractus gastro-intestinal.

Cependant, la digestion par la flore bactérienne du côlon permet de libérer des composés phénoliques de petite taille, susceptibles d'être absorbés. De plus, l'ingestion d'un repas contenant à la fois des aliments riches en polyphénols, avec de l'alcool ou des lipides, peut modifier la formation des interactions buccales ou gastro-intestinales, par dissociation des complexes ou modification de la polarité du milieu. Les données générées sur le pouvoir antioxydant des polyphénols dans le tractus digestif sont donc à replacer dans le contexte d'un repas complet.

III. INFLUENCE DES INTERACTIONS POLYPHENOLS/MACRONUTRIMENTS SUR LA BIODISPONIBILITE DES POLYPHENOLS

La biodisponibilité des polyphénols est un domaine de recherche en perpétuelle évolution. Les travaux sont très nombreux et pour la plupart très récents. Les doses utilisées, le modèle animal choisi et l'influence de la forme d'administration sont autant de variables expérimentales dont l'importance est encore mal connue.

Tous les polyphénols sont susceptibles de participer à la protection contre les maladies cardiovasculaires, certains cancers… Néanmoins, l'absorption, la métabolisation et l'excrétion de ces molécules sont très dépendantes de leurs structures chimiques (squelette carboné, position et nombre de groupements phénoliques, présence d'une charge…). Quelques éléments ressortent des travaux publiés (Rondini, 2002) :

L'absorption est d'autant plus forte que la solubilité dans le tractus digestif ou que l'affinité pour la membrane intestinale est grande. La forme ingérée (simple, glycosylée ou estérifiée) joue un rôle considérable dans la biodisponibilité des polyphénols : les formes glycosylées sont préalablement hydrolysées par la microflore interstinale et leur apparition dans le plasma est de ce fait retardée. Les formes glycosylées pourraient aussi être absorbées telles quelles par transport actif, vraisemblablement au niveau du récepteur glucose/sodium dépendant. Cependant, le mécanisme réel d'absorption des polyphénols reste inconnu. On peut en effet se demander si leur faible masse molaire, leur faible charge ionique et leur polarité conduisent à une diffusion passive ou si le passage de la barrière intestinale est plutôt réalisé *via* une diffusion facilitée ou un transport actif (cas des formes glucosylées).

La métabolisation des polyphénols est très importante. Quelle que soit la classe de polyphénols considérée, la proportion de forme native dans le plasma ou l'urine est faible, et les métabolites conjugués (formes sulfatées et/ou glucuronidées) sont largement majoritaires (> 75 %). Par ailleurs, un certain nombre de flavonoïdes et d'acides phénoliques sont méthylés au niveau du noyau catéchol. Enfin, la métabolisation par la flore intestinale est intense et serait à l'origine d'un grand nombre de dérivés. Or, à de rares exceptions près, la biodisponibilité de ces métabolites n'est pas prise en compte dans la biodisponibilité totale du composé ingéré.

Le transport des polyphénols et de leurs métabolites dans le sang est assez peu étudié bien que les conséquences en terme d'effet protecteur soit important : la liaison avec une protéine de transport réduit fortement la vitesse d'élimination du composé mais sa distribution dans les

tissus est probablement plus faible. Une association avec la fraction lipoprotéique du sang permettrait une action *in situ* des polyphénols.

La distribution dans les tissus reste le point le plus méconnu. De rares études font état de la présence de polyphénols et de leurs métabolites dans de nombreux tissus (foie, reins, cerveau, poumons…) mais leur concentration extravasculaire reste faible.

L'élimination est dépendante de la polarité du composé : les composés les moins polaires ainsi que les métabolites méthylés sont préférentiellement excrétés par voie biliaire tandis que les autres formes sont éliminées par voie urinaire. Cependant, aucune « exclusivité » n'a été mise en évidence. Enfin, certains flavonoïdes pourraient être directement relargués au niveau des entérocytes après métabolisation (Rondini *et al.*, 2003 ; Scalbert et Williamson, 2000).

Si la biodisponibilité des polyphénols ingérés sous forme purifiée, à dose alimentaire ou à dose pharmacologique, commence à être bien connue, en revanche on dispose encore de peu de données concernant leur biodisponibilité lorsqu'ils sont ingérés au sein d'une matrice alimentaire. Pourtant, certaines interactions, évoquées dans la partie précédente, se produisent dans la matrice et ont un effet sur le pouvoir antioxydant du produit. Elles ont également un rôle dans la biodisponibilité. Cette dernière peut être évaluée de deux manières :

- De manière « indirecte » : par mesure du pouvoir antioxydant du plasma, lié à la consommation des polyphénols ;
- De manière « directe » : par dosage des polyphénols plasmatiques ou urinaires.

III.1. EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA MATRICE ALIMENTAIRE SUR LA BIODISPONIBILITE DES POLYPHENOLS DE MANIERE « INDIRECTE »

Diverses études se sont intéressées à l'effet de l'ajout de protéines laitières dans des boissons ou des aliments riches en polyphénols sur le pouvoir antioxydant du plasma acquis suite à la consommation de ceux-ci.

Ainsi, Serafini *et al.* (1996) montrent que l'addition de 25 % de lait à une infusion de thé vert ou noir annule totalement le pouvoir antioxydant acquis par le plasma après ingestion de la même quantité de thé pur chez l'homme (figure 38). Des résultats similaires ont été trouvés par le test FRAP pour une consommation de 6 tasses de thé noir tout au long d'une matinée, avec ou sans lait, (Langley-Evans, 2000). Dans les deux cas, les auteurs attribuent ce phénomène à la formation de complexes polyphénols/protéines laitières, non dissociés au pH gastrique, entraînant la non absorption des polyphénols et donc la disparition du pouvoir antioxydant. Cette hypothèse est corroborée par les travaux d'autres auteurs, qui montrent que l'incubation *in vitro* d'extraits de thé vert ou noir avec différentes protéines laitières (caséines

et albumine) se traduit par un masquage partiel du pouvoir antioxydant des polyphénols du thé (Arts *et al.*, 2002).

L'annulation du pouvoir antioxydant acquis par le plasma suite à l'ajout de lait dans le thé ingéré par les sujets pourrait donc être due dans un premier temps à une complexation d'une partie des composés actifs du thé dans la tasse elle-même avant ingestion. Les composés restants pourraient ensuite se complexer avec des protéines salivaires et/ou intestinales, voire des protéines plasmatiques. Des résultats obtenus *in vitro* dans un système dynamique d'absorption, en présence de lait plus ou moins appauvri en matières grasses, vont dans le sens de cette hypothèse (Krul *et al.*, 2001): le pouvoir antimutagène (test de Ames) acquis par le dialysat après digestion de thé est partiellement supprimé après ajout de lait. Par exemple, dans la fraction recueillie 2 heures après le début de la digestion (la plus antimutagène), l'effet antimutagène du thé noir est diminué de 22 % en présence de lait entier, de 42 % en présence de lait demi-écrémé et de 78 % avec du lait écrémé. Avec le thé vert, la suppression de l'effet antimutagène induit par la présence de lait est encore plus marquée puisqu'elle varie entre 60 et 90 % pour ces trois types de lait. Les auteurs ont confirmé que la perte d'effet antimutagène provenait bien d'une diminution de la quantité de (-)-épicatéchine et de (+)-catéchine dans les fractions dialysées.

Il est cependant à noter que des études de biodisponibilité, réalisées sur ce même thème, montrent des résultats différents : d'autres équipes (Hollman *et al.*, 2000 ; Van Het Hof *et al.*, 1998)**,** travaillant uniquement avec du thé noir et des quantités de lait inférieures à celles utilisées par Serafini *et al.* (respectivement 16 % et 10 % contre 25 % dans l'étude de Serafini *et al.* (1996)**),** ne trouvent en effet pas de différence dans les concentrations en composés phénoliques du thé ((+)-catéchine et quercétine) retrouvées dans le sang suite à l'ingestion de thé noir avec ou sans lait (figures 39 et 40). Les résultats de ces études semblent donc plus ou moins dépendre des méthodes de mesure employées (mode de préparation des échantillons, quantités ingérées…) et sont donc à manipuler avec précaution.

La différence de composition des thés vert et noir peut toutefois expliquer ces contradictions. Le thé noir, résultat de la fermentation du thé vert, contient en effet essentiellement des théaflavines et des théarubigines, molécules de plus haut poids moléculaire que leur monomère, la (+)-catéchine, contenue en abondance dans le thé vert (Graham, 1992). Les auteurs trouvant des résultats contredisant ceux de Serafini *et al***.** (1996) n'ont utilisé que du thé noir et des quantités moindres de lait. En l'absence de données concernant les quantités de théaflavines présentes dans le thé noir utilisé, on peut penser que, dans leur expérience, la totalité du lait ajouté au thé noir (en plus faible quantité que dans l'expérience de Serafini *et*

al., 1996), a pu être complexée par les théaflavines de plus haut poids moléculaire que les catéchines, laissant ces dernières libres d'être absorbées. La différence avec l'étude de Serafini *et al***.** proviendrait donc de la quantité de lait ajoutée.

De même, très récemment, Serafini *et al.* (2003) ont mis en évidence *in vivo* une diminution de la capacité antioxydante du plasma humain si le chocolat (solide) était consommé en présence de lait ou sous forme de chocolat au lait (Figure 41). Le pouvoir antioxydant du plasma humain a été mesuré par le test FRAP après la consommation de 100 g de chocolat noir, avec ou sans 200 mL de lait, et de 200 g de chocolat au lait. Les doses consommées lors de cette étude reposent sur le fait que l'extrait de polyphénols de chocolat au lait était *in vitro* deux fois moins antioxydant que l'extrait de chocolat noir (chocolat provenant d'un même batch, délipidation à l'hexane, extraction par un mélange acétone / eau / acide +acétique (70/29,8/0,2, v/v/v). Les résultats montrent que le pouvoir antioxydant plasmatique acquis par les sujets suite à l'ingestion de chocolat noir seul est significativement plus important une heure après ingestion que celui des sujets ayant ingéré des préparations contenant également du lait. Ce pouvoir antioxydant moindre est associé à une absorption plus faible de la (+)-catéchine, qui est retrouvée en concentration significativement inférieure dans le plasma des sujets ayant consommé le chocolat en présence de lait. Cependant, une autre équipe a trouvé des résultats différents, mais en utilisant une boisson au cacao à l'eau ou au lait : aucune différence significative n'a été retrouvée dans la composition plasmatique en (-)-épicatéchine ou dans le pouvoir antioxydant des plasmas des différents sujets ayant consommé l'une ou l'autre des boissons (Schroeter *et al.*, 2003). Toutefois, là encore, la quantité de lait utilisée est moins importante (facteur 10) que dans l'étude de Serafini *et al* (2003).

Les résultats concernant le pouvoir antioxydant du plasma suite à l'ingestion de produits alimentaires solides ou liquides contenant à la fois des polyphénols et du lait sont donc contradictoires. On peut également envisager que le pouvoir antioxydant plasmatique déterminé dans ces études ne provenait pas exclusivement des composés phénoliques. Cette hypothèse a d'ailleurs été avancée pour remettre en question les résultats de l'étude de Serafini *et al.* concernant le chocolat (Serafini *et al.*, 2003), l'augmentation de pouvoir antioxydant observé pouvant être due à l'urée, également présente dans le plasma et dont le pouvoir réducteur est également pris en compte dans la méthode de mesure utilisée, le test FRAP (Halliwell, 2003).

Il est donc indispensable, pour connaître le pouvoir antioxydant potentiel total du plasma, de mener de front les deux types d'étude, à savoir l'analyse du pouvoir antioxydant du plasma,

ce qui donne une information sur l'effet santé « réel » de la consommation de polyphénols dans une matrice alimentaire, et l'analyse de la teneur plasmatique en composés phénoliques. En effet, comme le suggèrent quelques études, il n'est pas impossible que les formes liées par exemple à des protéines dans le plasma, ne soient pas libérées avant action sur les tissus cibles.

III.2. EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA MATRICE ALIMENTAIRE SUR LA BIODISPONIBILITE DES POLYPHENOLS DE MANIERE « DIRECTE »

III.2.1. Difficultés couramment rencontrées lors de l'étude de l'influence de la matrice alimentaire sur la biodisponiblité des polyphénols

Il existe différentes manières d'évaluer la biodisponibilité d'un composé de manière directe. Il est possible de marquer les molécules radioactivement puis de suivre leur devenir dans l'organisme en mesurant la radioactivité au niveau des organes. Cependant, cette méthode nécessite des équipements lourds et ne donne pas nécessairement l'information recherchée, de la radioactivité étant retrouvée, dans certaines études, jusque dans le CO_2 expiré (Mullen *et al.*, 2002). Une méthode plus simple à mettre en oeuvre consiste à récupérer les urines du sujet pendant 24 heures, puis à doser les composés phénoliques, présents en général en concentration plus importante que dans le plasma. L'information obtenue est assez fiable, mais ne permet pas de connaître la cinétique d'absorption dans l'organisme. Pour obtenir cette information, on peut avoir recours aux techniques de canulation sur des rats (ou récupérer les poches d'humains iléostomisés) et à des études d'absorption *in vitro*, par exemple par la technique de l'intestin éversé. Cependant, avec ces méthodes, on perd l'information sur la digestion colique, importante dans le cas des composés phénoliques retenus dans les fibres. De plus, cette technique peut induire un certain stress des tissus et ne pas refléter l'absorption réelle du composé.

Le gain de précision des méthodes de mesure (détection électrochimique et spectrométrie de masse ont remplacé la détection en spectrophotométrie UV) permet à présent de doser les composés phénoliques présents dans le plasma, à des doses de l'ordre du micromolaire. Il est ainsi possible de connaître à la fois les cinétiques d'absorption et les quantités de polyphénols potentiellement distribuées aux tissus (on sait encore mal analyser le contenu en polyphénols des organes cibles). Dans toutes les méthodes, excepté celles mettant en oeuvre des composés marqués, il est cependant indispensable d'utiliser des enzymes qui effectuent une hydrolyse des formes conjuguées circulantes afin de déterminer la concentration totale en polyphénols puisque les formes conjuguées ne sont pas détectées telles quelles par les méthodes d'analyse, sauf dans le cas des analyses par CLHP couplée à une détection en spectrométrie de masse,

dont l'utilisation dans les études de biodisponibilité est cependant encore peu répandue. Les composés phénoliques pourraient de plus soit être naturellement déconjugués lorsqu'ils atteignent les tissus cibles, soit encore conserver un certain pouvoir antioxydant sous forme conjuguée (Rondini, 2002).

Cependant, il est difficile de tirer des conclusions sur l'influence de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité des polyphénols en se basant uniquement sur des comparaisons de biodisponibilité des polyphénols dans différents aliments, et ce pour plusieurs raisons.

D'une part, parce que les conditions et les méthodes d'analyse sont rarement comparables d'une étude à l'autre (méthode d'analyse différente, modèle animal différent), ce qui amène souvent à remettre en cause des résultats que l'on considérait comme acquis. On a par exemple très longtemps cru que l'acide chlorogénique n'était pas absorbé. De même, l'absorption des formes glycosylées a longtemps été contestée : alors que certaines équipes retrouvaient des flavonols encore glycosylés dans le plasma, d'autres ne les détectaient que sous formes métabolisées et aglycones. En fait, cette controverse est née en raison des techniques d'analyse utilisées, trop peu spécifiques pour distinguer les métabolites conjugués des formes glycosylées ; les auteurs pratiquaient en effet l'hydrolyse acide des échantillons, ce qui entraînait à la fois l'hydrolyse des métabolites conjugués et la libération des parties aglycones des flavonols glycosylés éventuellement présents (Hollman *et al.*, 1997b). En analysant le plasma ainsi obtenu par couplage CLHP-UV (barrettes de diodes) (Olthof *et al.*, 2000 ; Paganga et Rice-Evans, 1997), il n'était donc pas possible de distinguer formes glycosylées et métabolites puisque seules des formes aglycones sont détectées. De plus, même si une hydrolyse acide préalable n'est pas pratiquée, les temps de rétention des flavonols glycosylés et des métabolites glucuronidés sont très proches (Manach *et al.*, 1995 ; Sesink *et al.*, 2001), ce qui semble normal au vu de la similitude de leurs structures chimiques. Cette similitude a donc probablement été à l'origine d'une erreur d'interprétation. L'absence de flavonols glycosylés dans le plasma après administration orale est maintenant unanimement admise.

D'autre part, les polyphénols ne sont pas nécessairement sous la même forme dans les différents aliments. Par exemple, la nature et la position du sucre influencent fortement l'absorption des flavonols glycosylés, ce qui peut expliquer les différences de biodisponibilité observées d'un aliment à l'autre. La quercétine des oignons est ainsi mieux absorbée que celle du vin ou du thé, probablement parce que ces deux dernières sources contiennent principalement de la quercétine glycosylée par un rutinoside (de Vries *et al.*, 2001). De même, les flavonols des oignons sont mieux absorbés que ceux des pommes ou que la quercétine

aglycone (Hollman *et al.*, 1997a). Ainsi, l'absorption est-elle favorisée lorsque le substituant est un glucose ou dans une moindre mesure un galactose, alors que les formes glycosylées par un diglycoside comme le rutinose sont moins bien absorbées.

L'influence de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité des polyphénols ne peut donc être déterminée de manière précise qu'en utilisant les études faisant intervenir le même polyphénol, dans différentes matrices, ne différant que par une seule composante et à dose vraisemblablement rencontrée dans le milieu alimentaire, et ce dans les mêmes conditions d'étude. Malheureusement, de telles études sont encore rares.

III.2.2. Données disponibles

III.2.2.1. Etudes de biodisponibilité faisant intervenir des matrices contenant des protéines

III.2.2.1.1. Interactions de faible énergie

Dans le cas des matrices alimentaires contenant à la fois polyphénols et protéines, la majorité des travaux concerne les boissons ou aliments au lait. Comme le montrent les données présentées dans le III.1., les résultats sont largement contradictoires d'une étude à l'autre. Les cinétiques d'absorption des composés phénoliques ne semblent en revanche pas modifiées par l'ajout de lait.

Le reste des travaux existants porte sur la complexation des protéines avec les tanins, et montre globalement une baisse de la qualité nutritionnelle des aliments protéiques due aux composés phénoliques. La majorité des études concernant les effets "anti-nutritionnels" des tanins suggèrent qu'une grande partie des polyphénols qui précipitent avec les protéines dans l'organisme se retrouvent directement dans les fèces, si aucun système enzymatique ou bactérien ne les dissocie par la suite. De fait, les tanins n'ont jamais été retrouvés sous forme native dans le plasma, ce qui est aussi dû à leur taille (Bravo, 1998 ; Scalbert et Williamson, 2000). La complexation aux protéines dans ce cas ne fait qu'amplifier le phénomène et limite probablement la dissociation des tanins par la microflore en molécules de plus faible poids moléculaire susceptibles d'être absorbées.

III.2.2.1.2. Interactions à liaisons covalentes

Les complexes à liaisons covalentes faisant intervenir des molécules de taille relativement faible telles que des acides phénoliques et de très petits peptides, sont susceptibles d'être absorbés tels quels comme le suggèrent certains travaux (Hurell *et al.*, 1982). Dans leur étude, ces auteurs ont formé des complexes à liaison covalente entre les résidus lysine de la caséine marqués radioactivement et de l'acide caféique oxydé qu'ils ont administrés à des rats durant

10 jours. Les contenus en lysine marquée de divers organes, des urines, du sang et des fèces des sujets ont été analysés après 72 heures.

Les résultats (tableau X) montrent qu'une grande partie de la radioactivité est retrouvée dans les fèces, et qu'également une partie non négligeable a été incorporée dans les organes. Cette quantité est moindre lorsque la caséine est couplée à des composés phénoliques mais ne diminue que de 25 % environ comparée à la caséine seule. Ainsi, si les complexes alimentaires de forte masse moléculaire sont considérés comme peu voire non absorbables, il n'en irait pas de même pour les complexes de taille plus modeste. On peut supposer qu'ils seraient susceptibles d'être partiellement décomposés, au moins au niveau de la protéine avant une absorption éventuelle.

De même, la digestibilité de la myoglobine est moins bonne lorsque celle-ci est complexée avec un acide phénolique, mais elle n'est pas annulée par le couplage (Kroll *et al.*, 2000). De là, on peut imaginer une hydrolyse partielle de la protéine complexée au polyphénol suivie d'une éventuelle absorption. On peut ainsi penser que des complexes peptides - polyphénols provenant d'associations plus grosses hydrolysées dans le tractus digestif puissent se retrouver dans le sang. Il est important de savoir si le pouvoir antioxydant des polyphénols subsiste, ou si les effets antioxydants potentiellement bénéfiques pour l'organisme sont moindres que ce que l'on pouvait espérer en se basant sur les quantités apportées par l'alimentation. Il n’existe pas d’étude montrant le dosage de tels complexes dans le plasma, mais les résultats obtenus pour la complexation de la quercétine à l’albumine plasmatique (cf. II.2), suggèrent tout au plus qu’ils pourraient ne pas être aussi efficaces que la molécule pure, à concentration égale.

III.2.2.2. Etudes de biodisponibilité faisant intervenir des matrices contenant des fibres alimentaires, des polysaccharides

Comme pour le thé, les effets de la consommation de fruits et légumes, comme les pommes ou les oignons, vont dans le sens d’une corrélation inverse à l’apparition de maladies cardio-vasculaires ou de cancers, mais celle-ci n’est pas souvent significative. La consommation de pommes est cependant significativement et inversement corrélée au cancer du poumon (Knekt *et al.*, 1997). L’apparition de cancers épithéliaux est quant à elle légèrement corrélée à l’ingestion de flavan-3-ols provenant d’autres sources que le thé (risque relatif de 0,66 : intervalle de confiance 0,42-1,05) (Arts *et al.*, 2001a). Ces résultats suggèrent que les polyphénols sont susceptibles d’être absorbés lorsqu’ils sont ingérés au sein d’une telle matrice.

III.2.2.2.1. Dans les matrices végétales peu transformées

Les interactions constitutives retenant les acides hydroxycinnamiques comme l'acide férulique dans les fibres, peuvent avoir pour effet de considérablement modifier leur biodisponibilité, comparée à celle du composé ingéré pur.

En effet, la digestion des fibres est effectuée principalement au niveau du côlon (cf II.2.1.3.). Par conséquent, la cinétique d'absorption et d'apparition dans le plasma de l'acide férulique, lorsqu'il est ingéré lié au sein d'une matrice végétale, est totalement différente de celle du composé pur, qui lui peut être absorbé au niveau intestinal de manière nettement plus importante.

Lorsque l'on nourrit des rats avec un aliment au son (26 % de son) ou avec de l'acide férulique libre en concentration équivalente à celle se trouvant dans ces 26 % de son (Rondini *et al.*, 2004), on obtient ainsi des cinétiques très différentes (figure 42). En effet, dans le cas du son, si la concentration augmente rapidement après le repas pour atteindre une valeur de $1,27 \pm 0,10$ µmol/L 30 minutes après ingestion du repas, elle reste ensuite quasiment constante. Au bout de 24 heures, l'acide férulique est encore présent dans le plasma à une concentration de $1,20 \pm 0,23$ µmol/L, alors que lorsque l'acide férulique est ingéré libre, la concentration plasmatique en acide férulique augmente rapidement et atteint un maximum ($5,280 \pm 0,829$ µmol/L) 30 minutes après ingestion, décroît rapidement entre 30 min et 1,5 h et plus lentement entre 1,5 h et 4,5 h, et devient inférieure à 0,2 µmol/L au bout de 4,5 h.

Dans le cas du son, la concentration plasmatique reste donc constante (1 µM) au cours des 24 heures qui suivent la prise alimentaire. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une lente libération de l'acide férulique dans le tractus digestif sous action de la flore intestinale. Ainsi libéré, l'acide férulique serait progressivement absorbé et participerait au maintien de la concentration plasmatique. Par ailleurs, l'élimination et la distribution du composé seraient également modifiées puisque la quantité d'acide férulique excrétée par voie urinaire est presque 20 fois plus faible après ingestion de son qu'après consommation d'acide férulique libre, et ce en dépit d'une présence d'acide férulique plus importante sur 24 heures dans le plasma, si on cumule les quantités retrouvées, après consommation de son (Rondini *et al.*, 2002 ; Rondini *et al.*, 2004). De plus, l'ingestion de farines complètes pourrait être encore plus efficace que l'ingestion de son seul, car dans ce cas l'endosperme du grain, aussi riche en acide férulique que le péricarpe mais moins lignifié et beaucoup plus facilement dégradable par les bactéries du côlon, est lui aussi inclus dans l'aliment (Adam *et al.*, 2002).

Ce résultat est encourageant du point de vue de l'action de l'acide férulique dans l'organisme. En effet, en utilisant le son comme source d'acide férulique, on augmente le temps de séjour

dans le compartiment plasmatique et la distribution dans les tissus, ce qui pourrait présager d'un potentiel protecteur plus important.

Toutefois, l'acide férulique provenant du son est significativement plus métabolisé (conjugaison) dans le plasma (91 % ; 0-7 heures), qu'après supplémentation par de l'acide férulique libre (76 % ; 0 - 2,5 heures). La détermination de l'activité antioxydante des métabolites conjugués est indispensable avant de pouvoir conclure sur le bénéfice que pourrait apporter l'utilisation de son de blé comme source d'acide férulique. En effet, la consommation de 250 g / jour de pain riche en son de seigle pendant 6 semaines par des femmes ménopausées induit une augmentation de l'excrétion urinaire de l'acide férulique, qui passe de 1,9 mg/jour avant intervention à 4,8 mg/jour, mais ne modifie pas la susceptibilité des LDL à l'oxydation *ex vivo* (Harder *et al.*, 2004).

Dans le côlon, l'hydrolyse des formes estérifiées par des polysaccharides dépendrait de plus de la nature de la molécule estérifiée, puisque 54 % de la dose ingérée de 5-O-féruloyl-L-arabinofuranose sont retrouvés dans l'urine sous formes métabolisées ou non de l'acide férulique alors qu'on n'en retrouve que 20 % après ingestion de féruloyl-arabinoxylane chez le rat (Zhao *et al.*, 2003). En revanche, le fait de consommer de manière chronique des fibres riches en acide férulique (10 jours d'un régime contenant 5 g / 100 g de son de mais) n'induit pas d'amélioration de l'absorption des acides phénoliques chez le rat (Zhao *et al.*, 2005).

Les dimères d'acide férulique peuvent également être absorbés chez le rat**.** En effet, suite à l'administration d'acides diféruliques dissous dans de l'huile de tournesol, la présence de certains d'entre eux (acides 5-5-diférulique, 8-5-diférulique, 8-O-4-diférulique et 8-5-benzofurane-diférulique) a été détectée dans le plasma par spectrométrie de masse (Andreasen *et al.*, 2001b). Ce résultat est le premier qui met en évidence l'absorption des acides diféruliques. Les concentrations plasmatiques sont de l'ordre du micromolaire, 1 heure après ingestion de 4,4 mg d'acide diférulique (toutes formes confondues).

Cependant, chez l'homme, une seule étude a été réalisée et montre des résultats légèrement différents de ce qui a été trouvé pour le rat : après consommation de 100 g de céréales pour petit-déjeuner riches en fibres (apportant 130 mg d'acides phénoliques) avec du lait écrémé, les maxima d'absorption sont détectés entre 1 et 3 heures après ingestion (0,2 µmol/L d'acide férulique et 40 nmol/L d'acide sinapique, toutes formes confondues). La concentration plasmatique décroît ensuite rapidement entre t = 3h et t = 6h après ingestion du repas, puis plus lentement jusqu'à 24 heures après ingestion. De plus, les formes diféruliques n'ont pas été détectées dans l'organisme alors qu'elles avaient pu être dosées dans l'aliment. Ainsi, l'absorption des acides phénoliques se ferait majoritairement au niveau intestinal, à

partir de la fraction d'acide férulique des fibres solubles dans l'eau, la partie due à la dégradation colique des fibres étant nettement plus faible que chez le rat. Les concentrations retrouvées dans le plasma après consommation de doses de l'alimentation quotidienne seraient très faibles comparées à celles utilisées dans les test d'oxydation des LDL, ce qui laisse supposer la piste de la régulation de l'expression génétique par les acides phénoliques comme étant nettement plus plausible que l'effet antiradicalaire direct chez l'être humain (Kern *et al.*, 2003).

Chez les fruits charnus, comme la tomate, il semble que la cuisson fasse légèrement augmenter la biodisponibilité de la naringénine et de l'acide chlorogénique (figure 43) : chez l'homme, après consommation de 500 g de tomates cerise crues ou cuites (15 minutes dans l'eau bouillante) dans le cadre d'un repas à base de pâtes, les quantités retrouvées dans le plasma, au pic, sont légèrement plus importantes dans le cas des tomates cuites que des tomates crues (Bugianesi *et al.*, 2004).

III.2.2.2.2. Cas des produits transformés

Si les procédés de fabrication des jus de fruits font de manière générale diminuer le pouvoir antioxydant potentiel des jus comparé au fruit équivalent par élimination d'une partie des polyphénols, en revanche, ces derniers, une fois extraits dans le jus, seraient davantage biodisponibles.

Ainsi chez l'homme, l'excrétion urinaire de naringénine et d'hespérétine après ingestion orale de 500 mg de leur équivalent glycosylé est respectivement de 4,89 et 2,97 % de la dose de polyphénols ingérée (résultats prenant en compte les formes aglycones et les métabolites glucuronidés) (Ameer *et al.*, 1996). Or, ces quantités augmentent fortement lorsque la source est du jus d'orange ou de pamplemousse : l'excrétion urinaire est respectivement de $4{,}1 \pm 1{,}2$ % et $7{,}9 \pm 1{,}7$ % (Manach *et al.*, 2003) ou de 6,81 % pour la naringénine et de 24,43 % pour l'hespérétine (Ameer *et al.*, 1996), ces valeurs ne semblant pas dépendre de la quantité ingérée (Manach *et al.*, 2003). Ainsi, la biodisponibilité des flavanones pourrait être meilleure dans les jus d'agrumes, d'une part suite à leur extraction de la matrice fruit par le procédé industriel de fabrication du jus, d'autre part parce que d'autres composés contenus dans le jus pourraient éventuellement modifier leur absorption.

De même, on ne retrouve que 0,004 % de la dose ingérée d'anthocyanes de myrtille dans les urines (Wu *et al.*, 2002), alors que les anthocyanes du jus de cassis (delphinidine-3-glucoside, delphinidine-3-rutinoside, Cyanidine-3-glucoside, Cyanidine-3-rutinoside) sont également excrétées dans l'urine humaine telles qu'ingérées mais dans des quantités très faibles allant de 0,021 % à 0,05 % de la dose ingérée en environ 100 minutes (Netzel *et al.*, 2000). Enfin, dans

une autre étude réalisée chez l'homme, l'analyse de l'urine après consommation de vin rouge apportant 218 mg d'anthocyanes, a montré que 1,5 à 5,1 % des anthocyanes ingérées étaient retrouvés inchangés dans l'urine (Lapidot *et al.*, 1998), ce qui pose également la question de l'influence de la présence d'alcool dans le milieu sur les quantités absorbées.

III.2.2.2.3. Cas de polyphénols ingérés dans le cadre d'un repas riche en fibres

La consommation simultanée de céréales pour petit-déjeuner et de pain complet, apportant au total 40 g de fibres de blé, associée à du tofu, fait diminuer de 13 % l'excrétion urinaire globale de la génistéine par rapport aux quantités excrétées lors de la consommation du même repas ne contenant que 15 g de fibres (Tew *et al.*, 1996). Cette diminution est due, selon les auteurs, à une complexation des isoflavones du repas par les fibres pendant la digestion (des résultats similaires ont été montrés pour les oestrogènes), mais également au fait que les fibres gonflent en absorbant de l'eau dans le tractus gastro-intestinal, ce qui pourrait gêner l'absorption des isoflavones à cause de l'encombrement stérique dû aux fibres. De plus, cet encombrement gênerait l'hydrolyse colique des isoflavones glycosylées. L'ingestion simultanée de fructooligosaccharides (FOS), sucres non digestibles connus pour leurs propriétés de stimulation de la croissance des bifidobactéries, et de génistéine, serait à l'origine d'une augmentation de l'absorption de cette dernière, grâce à la stimulation de l'activité β-glucosidase dans l'intestin provoquée par les fructooligosaccharides (Uehara *et al.*, 2001). De même, l'ingestion simultanée d'inuline et d'isoflavones de soja modifierait la fermentation bactérienne colique, diminuant la production d'équol consécutive à l'ingestion des isoflavones (Zafar *et al.*, 2004). En revanche, l'intégration de lait de soja dans un repas complet, non enrichi en fibres, n'entraîne pas de différence de biodisponibilité des isoflavones du lait de soja (Hendrich, 2002).

III.2.2.3. Etudes de biodisponibilité faisant intervenir des matrices lipidiques

A priori, les lipides des aliments solides ne semblent pas jouer un rôle déterminant dans l'absorption des polyphénols puisque les flavan-3-ols du chocolat ou de la poudre de cacao ont le même taux d'absorption (Baba *et al.*, 2000) : les cinétiques plasmatiques de la (-)-épicatéchine et de la (+)-catéchine ne sont pas significativement différentes après consommation de l'un ou l'autre de ces aliments.

En revanche, lorsque la quercétine-3-O-glucoside est ingérée au cours d'un repas contenant des lipides, sa biodisponibilité est améliorée (Cermak *et al.*, 2003) : l'ingestion simultanée de quercétine-3-O-glucoside (10 mg/kg de masse corporelle) et d'un repas contenant 15 g de viande de bœuf hachée à 9,5 g/100 g de matière grasse, fait considérablement augmenter la quantité de quercétine retrouvée dans le plasma (+40 %) chez le porc (figure 44), comparée au

même repas ne contenant pas la viande. Le maximum d'absorption est atteint plus rapidement en présence de matière grasse dans cette expérience et a conduit les auteurs à réitérer cette expérience avec uniquement de la quercétine-3-O-glucoside ou de la quercétine aglycone dans une matrice contenant de la matière grasse à différentes concentrations.

En effet, l'absorption de quercétine aglycone chez le rat provoque un pic plasmatique 30 minutes seulement après absorption lorsqu'elle est dissoute dans du propylène glycol, alors qu'en solution dans l'eau, dans laquelle elle est 5 fois moins soluble, la concentration plasmatique continue à augmenter 8 heures après le début de l'expérience (Piskula et Terao, 1998b). Cependant, si la cinétique d'absorption est modifiée, la quantité totale absorbée ne semble pas être affectée par le changement de milieu. Pour la quercétine aglycone, plus lipophile que son équivalent glycosylé, la vitesse d'absorption semble également être dépendante de la solubilité dans la matrice alimentaire.

Lesser *et al.* (2004) ont donc comparé la biodisponibilité des deux formes, ingérées dans des matrices alimentaires contenant plus ou moins de matière grasse, chez le porc (tableau XI). Pour les deux molécules, les quantités absorbées totales sont nettement supérieures en présence de 17 % de matière grasse. La cinétique d'absorption et les quantités totales absorbées sont modifiées dans les deux cas, de manière plus nette dans le cas de l'aglycone (concentration maximale atteinte au bout de 70 minutes au lieu de 120, contre 50 au lieu de 70 dans le cas de la forme glycosylée). Cependant, quand la concentration en matière grasse est de 32 %, l'absorption n'est pas améliorée (Lesser *et al.*, 2004).

Azuma *et al.* (2002) ont observé que la co-administration de lipides (huile de soja) ou d'émulsifiants comme le taurocholate (composé de la bile) ou la lécithine, faisait augmenter et accélérait l'absorption intestinale de la quercétine aglycone chez le rat. On peut par conséquent supposer que la présence de matière grasse faciliterait l'incorporation de la quercétine dans les micelles de sels biliaires dans le duodénum, ce qui faciliterait son passage à travers la couche aqueuse non agitée et lui permettrait de rejoindre plus facilement la bordure en brosse, où elle serait absorbée par diffusion passive (Azuma *et al.*, 2002).

Cependant, cette hypothèse est moins plausible dans le cas de la quercétine-3-O-glucoside, qui est plus hydrophile, et doit être déglycosylée par la lactase-phlorizine hydrolase à proximité de la bordure en brosse avant d'être absorbée. Son absorption est toutefois également améliorée par l'ajout de matière grasse dans le milieu (Lesser *et al.*, 2004). Cet effet pourrait être en fait dû à une réabsorption de la quercétine aglycone et glucuronidée au niveau du cycle entéro-hépatique, les formes glucuronidées relarguées dans la lumière intestinale pouvant être déglucuronidées, avant réabsorption, par les bactéries du côlon. Ceci

expliquerait également la persistance de la quercétine dans le plasma à des concentrations plus importantes dans le cas du régime enrichi en matière grasse (Lesser *et al.*, 2004).

Il semble de plus que consommer simultanément de manière chronique des oignons et au moins 4,6 % de matière grasse, induise une amélioration de la biodisponibilité de la quercétine au fil du temps (figure 45), qu'il s'agisse d'huile de soja, de poisson ou de graisse de bœuf (Azuma *et al.*, 2003).

La plus faible affinité des composés de l'huile d'olive pour l'huile que pour l'eau ne semble de même pas entraver leur biodisponibilité ; celle-ci serait même meilleure dans l'huile que dans l'eau. Par radiomarquage chez le rat, 94,1 ± 2,6 % de la radioactivité fixée sur de l'hydroxytyrosol sont retrouvés dans l'urine 24 heures après administration orale du composé dissous dans de l'huile (Tuck *et al.*, 2001) contre 70,9 ± 2,1 % dans de l'eau ; quant au tyrosol, seuls 72,9 ± 6,3 % de la radioactivité y sont retrouvés lorsqu'il est dissous dans l'huile et 53,2 ± 5,4 % après dissolution dans l'eau.

III.2.2.4. Etudes de biodisponibilité faisant intervenir des matrices contenant de l'alcool

Le vin fait partie des aliments considérés depuis longtemps comme ayant un effet protecteur sur les maladies cardio-vasculaires. L'étude MONICA a permis de mettre en évidence un « paradoxe français » : les habitants de la région de Toulouse, bien qu'ayant une consommation en graisses saturées et une cholestérolémie comparable à celles de pays industrialisés tels que les Etats-Unis ou le Royaume Uni, ont une mortalité par accidents cardiaques 3 à 5 fois plus faible (Renaud et de Lorgeril, 1992).

En l'absence d'études d'interventions, seules des hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette corrélation. La consommation régulière de vin rouge a largement été évoquée. Si la plupart des études ont montré une relation inverse entre l'ingestion modérée d'alcool (20-30 g d'éthanol/jour) et la survenue d'accidents vasculaires ou de décès (Léger *et al.*, 2000), une seule étude de cohorte a clairement mis en évidence l'effet protecteur d'une consommation régulière de vin indépendamment de l'ingestion d'alcool (Formica et Regelson, 1995).

La présence de nombreux composés phénoliques dans cette boisson constituerait alors une bonne hypothèse pour expliquer ces effets. Il a été avancé que l'alcool pourrait avoir un effet positif sur l'absorption de ces derniers, cependant ceci n'a pas pu être clairement démontré pour tous les composés phénoliques du vin.

L'absorption de la catéchine (Donovan *et al.*, 1999), de la malvidine-3-O-glycoside (Bub *et al.*, 2001), de la quercétine ou du resvératrol (Goldberg *et al.*, 2003) du vin ne semblent pas

dépendre de manière significative de la présence d'alcool. Cependant, la présence d'alcool accélère la disparition de la (+)-catéchine du compartiment plasmatique lorsqu'elle est ingérée dans des vins reconstitués, chez l'homme (Bell *et al.*, 2000), ce qui pourrait être en partie dû à une augmentation de son excrétion urinaire consécutive à la consommation d'alcool (Goldberg *et al.*, 2003). L'alcool modifierait également la conjugaison réalisée dans les cellules épithéliales intestinales (Goldberg *et al.*, 2003).

En revanche, la consommation d'alcool, contenu par exemple dans le vin, au cours d'un repas, est susceptible de modifier l'absorption des polyphénols du bol alimentaire. En faisant diminuer la polarité du milieu, l'alcool est en effet capable de faire diminuer les effets hydrophobes (Le Bourvellec *et al.*, 2004a). On peut donc émettre l'hypothèse que consommer simultanément de l'alcool et des produits alimentaires dans lesquels protéines, polysaccharides et polyphénols sont susceptibles de se complexer, aussi bien au niveau des protéines du produit que des protéines salivaires, pourrait libérer des polyphénols et augmenter leur biodisponibilité.

Conclusion

Il existe donc deux grands types d'interactions susceptibles de se produire entre les polyphénols et les macronutriments : des interactions spécifiques, de nature réversible ou covalente, qui concernent plutôt les protéines et les polysaccharides, et des interactions non spécifiques, en lien avec la solubilité des polyphénols dans les matrices qui les contiennent, et qui concernent plutôt les lipides et l'alcool.

Dans l'aliment, ces interactions pourraient éliminer ou rendre inactifs une partie des polyphénols contenus dans les fruits, notamment en modifiant leur structure chimique par oxydation enzymatique, limiter l'extraction des composés phénoliques dans le produit fini lors de la transformation des fruits (en jus par exemple), et pourraient finalement limiter le pouvoir antioxydant potentiel d'un aliment vis-à-vis de l'organisme en bloquant une ou plusieurs fonctions phénoliques.

Après ingestion, le pouvoir antioxydant potentiel des polyphénols vis-à-vis des lipides et des protéines du système digestif peut se trouver limité par la formation de nouvelles interactions avec les protéines et les fibres de la matrice alimentaire ou avec des protéines endogènes, au niveau buccal et gastro-intestinal. La majorité de ces complexes se retrouverait ainsi dans les fèces. Cependant, peu d'études s'intéressent pour le moment à ces questions.

Les complexes ainsi formés n'auraient donc pas ou peu d'effets bénéfiques vis-à-vis du tractus gastro-intestinal. Cependant, la digestion par la flore bactérienne du côlon permet de libérer des composés phénoliques de petite taille, susceptibles d'être absorbés. De plus, l'ingestion d'un repas contenant à la fois des aliments riches en polyphénols, de l'alcool ou des lipides, peut modifier la formation des interactions buccales ou gastro-intestinales.

L'influence de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité des polyphénols est un domaine encore mal connu. Les résultats concernant les interactions avec les protéines sont contradictoires mais vont globalement dans le sens d'une modulation de la biodisponibilité ; les fibres, quant à elles, auraient des effets beaucoup plus significatifs en ce qui concerne les cinétiques d'absorption, mais leur lente dégradation induirait un relargage continu sur 24 heures dans la circulation sanguine.

En revanche, les procédés de transformation des fruits seraient à l'origine d'une amélioration de la biodisponibilité des polyphénols, en les libérant de la matrice cellulaire. De même, la présence de lipides ou d'éthanol dans le bol alimentaire semble améliorer la biodisponibilité de ces composés.

Plusieurs moyens, utilisant les propriétés d'interaction polyphénols/macronutriments, ont déjà été envisagés dans le but d'améliorer la biodisponibilité et les effets santé bénéfiques des polyphénols dans l'organisme.

Il a tout d'abord été envisagé de les encapsuler dans des cyclodextrines, comme cela se fait pour les principes actifs de certains médicaments. En effet, cela permettrait de protéger le polyphénol de la dégradation lors de la digestion (dégradation par la microflore, ou même simplement par l'acidité gastrique pour certains polyphénols, comme ceux des fraises (Gil-Izquierdo *et al.*, 2002b)). Si la cyclodextrine est dégradée pendant la digestion, une quantité plus importante de polyphénols pourrait alors atteindre les muqueuses digestives pour y être absorbée. De plus, la complexation des dihydrochalcones à des cyclodextrines réduit leur astringence. Or, l'astringence est justement l'un des problèmes majeurs qui amène à éliminer des polyphénols lors de la fabrication de certains jus d'agrumes comme le pamplemousse. L'incorporation de cyclodextrines dans ces jus pourrait être une alternative intéressante, si toutefois elle n'est pas trop coûteuse et si la législation le permet (Caccia *et al.*, 1998). Enfin, il a été montré que l'incorporation de cyclodextrines dans les boissons contenant des flavonoïdes limitait la précipitation de ces derniers (Szente et Szejtli, 2004).

Le greffage de lipides sur les acides phénoliques a également été envisagé. Cela permettrait notamment d'augmenter leur solubilité dans les solutions lipidiques, et pourrait dans certaines cas améliorer d'autant leur potentiel en tant qu'antioxydants, aussi bien dans l'aliment que dans l'organisme (Figueroa-Espinoza et Villeneuve, 2005).

Il est cependant clair que le manque de données concernant l'influence de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité et le pouvoir antioxydant des polyphénols, risque de conduire à des erreurs potentiellement dangereuses pour la santé humaine, dans ces tentatives d'amélioration de la biodisponibilité. Les méthodes retenues visent en effet à contourner les mécanismes de défense naturels de l'organisme, tels que l'astringence. Il est donc indispensable de chercher à mieux appréhender l'influence de la matrice alimentaire avant d'essayer de la modifier pour améliorer la biodisponibilité et/ou le pouvoir antioxydant des polyphénols au sein d'un régime alimentaire.

MATERIEL ET METHODES

I. REACTIFS ET SOLVANTS UTILISES

Les produits alimentaires, solvants et réactifs utilisés lors de cette étude sont répertoriés dans les tableaux XII et XIII.

II. ECHANTILLONS DE CAFE

Différents types de cafés ont été utilisés : du café lyophilisé du commerce (Carte Noire), et du café en grain, torréfié ou non. Le premier a été utilisé pour les préparations extemporanées et atomisées, en présence de lait ou non ; ces différentes préparations seront désignées sous le terme « cafés expérimentaux ». Le second type de café, en grains, a été uniquement utilisé à titre de comparaison avec les cafés expérimentaux. Le café soluble a été choisi décaféiné afin de pouvoir être administré aux animaux sans biais dus à la caféine. Toutes les solutions ont été préparées à 20°C (sauf indication contraire), et placées sous agitation modérée pendant 5 minutes.

II.1. PREPARATION DES CAFES EXTEMPORANES

Deux solutions contenant 50 g/L de café lyophilisé Carte Noire ont été préparées. Dans la première, le café était solubilisé dans de l'eau ultrapure sous agitation modérée à 20°C pendant 5 minutes. Dans la seconde, une partie de l'eau a été remplacée par du lait demi-écrémé à hauteur de 250 g/L dans la solution finale.

II.2. PREPARATION DES CAFES ATOMISES

Deux solutions contenant 50 g/L de café lyophilisé Carte Noire ont été préparées, avec ou sans ajout de lait, dans les mêmes proportions que les cafés extemporanés. Ces deux solutions (environ 12 L de chaque) ont ensuite été atomisées dans un atomiseur pilote Minor Lab (capacité 3 kg/h, Niro Atomizer, St Quentin en Yvelines, France). La température d'entrée était de 175°C, celle de sortie 90°C et le débit de 56 g/heure. La poudre recueillie lors du premier quart d'heure a été éliminée. Environ 400 g de poudre ont été récupérés pour chaque liquide atomisé, puis conservés dans un emballage sous vide à -18°C.

Pour les analyses, les poudres ont été remises en suspension en tenant compte de leurs matières sèches, à hauteur de 50 g/L de poudre pour le café atomisé et de 76,025 g/L de poudre pour le café au lait atomisé.

II.3. PREPARATION DES CAFES A BASE DE CAFE EN GRAINS (VERT ET TORREFIE)

Deux solutions de café ont été préparées à partir de grains de café, verts ou torréfiés. Ces deux échantillons de café sont tous deux des arabicas mais le café torréfié n'a pas la même origine

que le café vert. Les solutions ont été préparées à 100°C pendant 10 minutes dans 100 mL d'eau, 6 g de grains de café moulus puis tamisés sur un tamis n°31, puis en filtrant le mélange sur filtre n°2 (Melitta, Chézy sur Marne, France).

II.4. DETERMINATION DES MATIERES SECHES

Les matières sèches des poudres et des filtrats obtenus ont été déterminées par pesée avant et après séchage à l'étuve (Thermosi SR3000, Osi, France) pendant 24 heures à 103°C (tableau XIV). Ces matières sèches ont ensuite été utilisées pour déterminer les quantités de poudre de café atomisé à utiliser dans les régimes des rats et dans les tests de mesure du pouvoir antioxydant. Les résultats présentés sont la moyenne de trois répétitions.

III. DOSAGE DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES DANS LES SOLUTIONS DE CAFE ET CAFE AU LAIT PAR CLHP-DEC

Les composés phénoliques présents dans les boissons préparées à base de café et/ou de lait ont été analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur électrochimique de type coulométrique (CLHP-DEC). Ils ont été dosés soit directement après extraction, soit après hydrolyse basique de façon à prendre en compte l'ensemble des dérivés hydroxycinnamiques.

III.1. MISE AU POINT DES CONDITIONS D'ANALYSE PAR CLHP-DEC

III.1.1. Système chromatographique

Le système chromatographique se compose d'une pompe quaternaire Waters 600E couplée à un détecteur électrochimique ESA Coulochem II. Le détecteur est équipé de deux électrodes de travail (modèle 5010). Le potentiel de la première électrode est fixé à 300 mV, avec une sensibilité de 10 µA. Le potentiel de la seconde électrode est de 600 mV, avec une sensibilité de 10 µA. Le logiciel d'intégration est Azur ECW 2000 (Datalys, France).

20 µL d'échantillon sont injectés à l'aide d'une vanne rhéodyne sur une colonne C18 Interchrom (250 × 4,6 mm d.i.; taille des particules : 10 µm) (Interchim). La phase mobile est composée d'un mélange [acétonitrile / NaH_2PO_4 25 mmol/L pH 2,4] [15/85] (v/v) délivré à un débit de 1 mL/min.

III.1.2. Etablissement des voltamogrammes des acides hydroxycinnamiques et dérivés

Afin de déterminer les conditions de détection optimales en coulométrie, les voltamogrammes des principaux acides hydroxycinnamiques susceptibles d'être retrouvés dans le café ont été établis, à partir de solutions étalon préparées dans un mélange [acétonitrile / NaH_2PO_4

25 mmol/L pH 2,4] [15/85] (v/v) , à une concentration de 15 mg/L : acides chlorogénique, caféique, *p*-coumarique, et férulique. La sensibilité utilisée variait de 5 à 20 µA. Les résultats sont exprimés pour une sensibilité de 10 µA.

III.1.3. Etablissement de gammes d'étalonnage pour l'analyse des acides phénoliques

Des gammes étalon des quatre acides phénoliques analysés ont été établies dans la phase mobile utilisée en CLHP pour des concentrations comprises entre 0 et 25 mg/L, à partir de trois solutions mères différentes. Les équations des droites de régression sont respectivement, pour la sensibilité 10 µA :

- acide chlorogénique (ACQ) : $y = 12{,}5.10^3 x$ ($R^2 = 0{,}995$)
- acide caféique (AC) : $y = 26{,}7.10^3 x$ ($R^2 = 0{,}980$)
- acide *p*-coumarique (A*p*C) : $y = 58{,}2.10^3 x$ ($R^2 = 0{,}995$)
- acide férulique (AF) : $y = 41{,}4.10^3 x$ ($R^2 = 0{,}997$)

y correspondant à l'aire du pic chromatographique et x à la concentration en acide hydroxycinnamique exprimée en mg/L.

III.2. EXTRACTION DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES ET DERIVES DU CAFE

III.2.1. Extraction directe des acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques contenus dans les différentes solutions de café ont été analysés selon une méthode publiée (Nardini *et al.*, 2002), légèrement modifiée.

Les solutions de café sont diluées au 1/5^e dans de l'eau ultrapure, avant extraction. 250 µL de ces solutions diluées sont mélangés avec 150 µL d'une solution d'acide dihydrocaféique à 200 mg/L (standard interne). Le mélange est complété à 500 µL avec de l'eau ultrapure. Ce mélange est ensuite acidifié à pH 3 avec de l'acide chlorhydrique à 1 mol/L, de façon à assurer la stabilité des acides phénoliques pendant l'extraction. 300 mg de chlorure de sodium sont ajoutés, puis les échantillons sont extraits trois fois avec 4 volumes d'acétate d'éthyle ; les tubes sont agités au vortex pendant 5 minutes, puis centrifugés 10 minutes à 3000 g et 4°C. Les surnageants sont ensuite mélangés et la phase organique est séchée sous flux d'azote. Le résidu est ensuite repris dans 5 mL de mélange acétonitrile / tampon phosphate 25 mmol/L pH 2,4 15/85 (v/v). Les extraits resuspendus sont ensuite filtrés sur des filtres seringue nylon 0,22 µm, et les acides phénoliques sont analysés par CLHP-DEC. Trois répétitions (extractions) sont réalisées par échantillon.

III.2.2. Hydrolyse basique et extraction des dérivés hydroxycinnamiques

Les acides phénoliques présents dans le café sous forme estérifiée (par l'acide quinique) n'existent pas en standards commerciaux, excepté l'acide chlorogénique. Pour les quantifier, il est donc nécessaire de recourir à une hydrolyse alcaline. Les acides phénoliques libérés peuvent alors être quantifiés par la méthode décrite ci-dessus.

0,5 mL de solution de café diluée au 1/5^{e} sont mélangés à 4,5 mL d'hydroxyde de sodium 1,8 mol/L, contenant 10 mmol/L d'EDTA et 1 % d'acide ascorbique, puis incubés pendant 30 minutes à 30°C sous agitation. Après refroidissement, les échantillons sont extraits et analysés comme décrit ci-dessus. Trois répétitions sont réalisées par échantillon.

III.2.3. Détermination des taux de récupération

Afin de déterminer les taux de récupération des différents acides hydroxycinnamiques après extraction et analyse par ces méthodes, des solutions de café préparées à partir de café lyophilisé Carte Noire ont été enrichies par des quantités connues en chacun des acides hydroxycinnamiques, puis extraites et analysées dans les mêmes conditions. Les quantités supplémentaires détectées ont alors été soustraites aux quantités déterminées dans la même solution de café non enrichie. Pour toutes les manipulations, la validité de l'extraction a été vérifiée à l'aide du standard interne. Trois répétitions sont réalisées par échantillon.

Les taux de récupération obtenus avec cette méthode d'extraction sont de 95 ± 1 % pour l'acide chlorogénique, 95 ± 1 % pour l'acide caféique, 91 ± 3 % pour l'acide *p*-coumarique, et 81 ± 7 % pour l'acide férulique, sans hydrolyse alcaline.

Avec hydrolyse alcaline, on obtient des taux de récupération de 86 ± 2 % pour l'acide chlorogénique (retrouvé alors exclusivement sous forme d'acide caféique), de 72 ± 7 % pour l'acide caféique, de 86 ± 7 % pour l'acide *p*-coumarique, et de 84 ± 3 % pour l'acide férulique.

IV. SEPARATION DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES ET DES PRODUITS DE LA REACTION DE MAILLARD PRESENTS DANS LES SOLUTIONS DE CAFE

IV.1. SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE SUR COLONNE LH-20

Les polyphénols et les produits de la réaction de Maillard (PRM) du café ont été séparés sur gel de Sephadex LH-20 (gel de dextrane hydroxypropylé), selon un protocole adapté de Maillard (1996).

500 µL d'une solution de café lyophilisé Carte Noire à 50 g/L sont déposés sur une colonne de Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, longueur : 7 cm ; diamètre intérieur : 5 mm). L'élution est réalisée par deux fois le volume de la colonne en eau acidifiée à pH 3 par de l'acide chlorhydrique à 37 % puis par deux volumes de méthanol pour analyses (Maillard, 1996). Deux fractions de 7 mL sont ainsi récupérées et appelées « fraction HCl » et « fraction méthanolique ».

Ces fractions ont été analysées par spectrophotométrie entre 200 et 450 nm dans des cuves en quartz (spectrophotomètre UV-VIS Perkin Elmer équipé du logiciel d'acquisition Lambda 9 (Shelton, USA)) et leur pouvoir antioxydant a été déterminé par les tests DPPH, AAPH et TAC, qui seront décrits dans le paragraphe 2.5.

La colonne a été étalonnée par passage de solutions d'acide chlorogénique, isomérisé ou non (24 heures sous U.V. en milieu méthanolique) et d'une solution de PRM préparée par incubation d'un mélange de glucose 0,5 mol/L et de lysine 0,8 mol/L pendant 92 h à 103°C. De même, il a été vérifié que la concentration du café n'entravait pas la séparation, ceci en appliquant sur la colonne une solution de café 10 fois moins concentrée. Des gammes étalon d'acide chlorogénique dans chaque solvant ont été établies afin de le quantifier dans les fractions « HCl » et « méthanolique ».

IV.2. SEPARATION PAR ULTRAFILTRATION

Les produits de la réaction de Maillard, présents dans la « fraction HCl » issue de la chromatographie LH-20, ont été fractionnés par ultrafiltration sur deux types de concentrateurs Vivaspin 20 (Vivascience, Allemagne), différant par leur seuil de coupure : 3 kDa et 5 kDa. Ces concentrateurs sont formés de deux compartiments séparés par une membrane de dialyse en polyethersulfone (figure 46). Leur centrifugation permet de réaliser la séparation d'un mélange, les composés ayant une masse moléculaire inférieure au seuil de coupure de la membrane étant récupérés dans le compartiment inférieur.

Le protocole suivant a été mis en place : 5 mL d'échantillon dilués au 1/10^{e} ont été introduits dans des concentrateurs Vivaspin 20 (Vivascience, Allemagne) et centrifugés pendant deux heures à 6000 g et à 4°C. Après détermination des fractions résiduelles dans chaque compartiment par pesée, les rétentats et perméats ont été analysés par spectrophotométrie entre 200 et 450 nm dans des cuves en quartz (spectrophotomètre UV-VIS Perkin Elmer équipé du logiciel d'acquisition Lambda 9 (Shelton, USA)) et leur pouvoir antioxydant a été déterminé par le test TAC. L'analyse des rétentats a été réalisée après passage des concentrateurs dans un bain à ultrasons, afin de récupérer les PRM éventuellement liés à la membrane de dialyse.

V. MESURE DU POUVOIR ANTIOXYDANT DES SOLUTIONS DE CAFE ET DE CAFE AU LAIT

Le pouvoir antioxydant des différentes solutions de café a été déterminé selon trois méthodes :

- le test DPPH, qui évalue le potentiel antiradicalaire des antioxydants en milieu méthanolique ;
- le test AAPH, qui mesure le pouvoir antiradicalaire des antioxydants en milieu émulsionné contenant de l'acide linoléique ;
- le test TAC, qui détermine le pouvoir antiradicalaire des antioxydants en milieu émulsionné contenant de la crocine.

Tous les tests n'ont pas été réalisés sur l'ensemble des solutions dont nous disposions. Les expériences effectuées sont donc résumées dans le tableau XV. La signification des paramètres sera détaillée pour chaque test.

V.1. TEST DPPH

V.1.1. Principe

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir antiradicalaire d'un antioxydant pur ou d'un extrait antioxydant. Il met en jeu le radical stable 2,2-diphényl 1-pycrilhydrazyl (DPPH°, figure 47). Le DPPH° absorbe à 515 nm. Sous l'action d'un antioxydant AOH qui le réduit en DPPHH, cette absorbance diminue jusqu'à atteindre un plateau, cette cinétique variant selon l'antioxydant utilisé.

$$DPPH° \text{ (violet)} + AOH \rightarrow DPPHH \text{ (jaune)} + AO° \text{ (a)}$$

Le suivi de l'absorbance du mélange en fonction du temps permet de déterminer le pourcentage de DPPH° résiduel à l'équilibre. Cette opération est répétée pour différentes concentrations d'antioxydant et les résultats obtenus sont reportés sur un graphique représentant le pourcentage de DPPH° restant à l'équilibre en fonction de la concentration en antioxydant [AOH]. L'équation de la courbe effet-dose ainsi obtenue permet de calculer la **CE_{50}**, concentration en AOH nécessaire pour réduire de moitié la quantité de DPPH° initialement présente dans le milieu. L'inverse de la CE_{50} donne le pouvoir anti radicalaire (PAR). Plus la valeur du PAR est élevée, plus l'antioxydant est efficace.

V.1.2. Protocole expérimental

Une solution de DPPH° à 6.10^{-5} mol/L dans du méthanol est préparée quotidiennement à partir d'une solution mère à 6.10^{-3} mol/L, qui, elle, peut être conservée pendant une semaine à -18°C. 77 µL de solution de café préparée dans de l'eau (8 dilutions différentes de la solution initiale, entre $1/200^{e}$ et $1/20^{e}$) sont incubés avec 3 mL de solution de DPPH° pendant 500 minutes, temps nécessaire pour atteindre le plateau avec ce type d'échantillons. L'absorbance des mélanges est ensuite lue à 515 nm sur un spectrophotomètre Perkin Elmer UV-VIS équipé du logiciel Lambda 9 (Shelton, USA), contre un blanc contenant la solution de DPPH° et de l'eau, la valeur de ce blanc ayant été également mesurée au temps 0. Lors de cette mesure, les cuves sont en fait inversées, ce qui permet d'obtenir directement une valeur positive pour la différence entre l'absorbance de la solution de DPPH° ne contenant pas d'antioxydant et celle en contenant. En calculant à chaque instant la différence entre l'aborbance de la solution initiale et cette valeur, on obtient la cinétique de diminution du DPPH° dans le milieu (figure 48).

V.1.3. Calculs et expression des résultats

Le rapport entre la valeur lue à 500 minutes et le blanc au temps initial est calculé pour chaque concentration, ce qui donne le pourcentage de DPPH° résiduel dans le milieu. Cette valeur est ensuite portée en ordonnée d'un graphique indiquant en abscisse la valeur de la concentration en café, de manière à déterminer la concentration qui permet de n'avoir que 50 % de DPPH° résiduel dans la cuve (CE_{50}, figure 49), en utilisant l'équation de la courbe de régression de la partie linéaire du graphique, tracée à l'aide de Microsoft Excel.

V.2. TEST AAPH

V.2.1. Principe

Ce test met en jeu le dichlorure de 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (APPH, figure 50). Ce dernier, en solution à 37°C et en présence d'oxygène, forme un radical AzOO°, capable de réagir avec les acides gras. L'acide linoléique (LH), acide gras polyinsaturé utilisé dans le test, lui cède en effet un hydrogène, donnant ainsi un radical lipidique L° qui absorbe à 234 nm :

$$2\ Az\text{-}N{=}N\text{-}Az \rightarrow Az\text{-}Az + 2\ Az^{\circ} + 2\ N_2 \quad (b)$$

$$Az^{\circ} + O_2 \rightarrow AzOO^{\circ} \quad (c)$$

$$AzOO^{\circ} + LH \rightarrow AzOOH + L^{\circ} \quad (d)$$

En présence d'antioxydants (AOH), les radicaux L° sont réduits en LH. De ce fait, la cinétique d'apparition des dienes conjugués à 234 nm est ralentie :

$$L° + AOH \rightarrow LH + AO°(e)$$

En fonction de la dose d'antioxydant, un retard plus ou moins prolongé (phase de latence) de l'apparition des dienes conjugués est donc observé.

V.2.2. Protocole expérimental

Le substrat est une dispersion d'acide linoléique en milieu aqueux obtenu par mélange de 0,2245 g d'acide linoléique (pureté de 98 %) dans 4,5 mL de tampon phosphate de sodium 50 mmol/L pH 7,4 et de 0,30 g de tween 20. L'émulsion formée est ensuite cassée par ajout de 1 mL de soude à 1 mol/L et le mélange est tamponné par 50 mL de tampon borate de sodium à 50 mmol/L pH 9,0. La concentration finale en acide linoléique est de 16 mmol/L. Le substrat est conservé dans un flacon fermé sous azote, à 4°C pendant une semaine maximum. Une solution à 40 mmol/L d'AAPH est préparée dans du tampon phosphate de sodium à 50 mmol/L pH 7,4. Cette solution peut être conservée pendant une semaine à 4°C.

La détermination de l'efficacité d'un antioxydant se fait en deux étapes : tout d'abord, la cinétique d'oxydation de l'acide linoléique est établie en l'absence d'antioxydant, puis des cinétiques sont enregistrées en présence d'antioxydant à différentes concentrations.

La cinétique sans antioxydant est établie en mélangeant, dans une cuve spectrophotométrique bouchée, 2,82 mL de tampon phosphate de sodium 0,05 mol/L pH 7,4 préalablement incubé à 37°C, avec 10 µL d'eau ultrapure, 30 µL de substrat et 150 µL de solution d'AAPH à 40 mmol/L. Après agitation, l'absorbance à 234 nm est lue toutes les 5 minutes pendant 300 minutes sur un spectrophotomètre Kontron Uvikon 941 UV-VIS, avec passeur d'échantillons thermostaté à 37°C, contre une cuve ne contenant pas de substrat.

La cinétique en présence d'antioxydant est réalisée après mélange de 2,81 mL de tampon phosphate de sodium 0,05 mol/L pH 7,4 pré-incubé à 37°C avec 30 µL de substrat et 10 µL de la solution d'antioxydant (solutions de café ou d'ACQ dans de l'eau, diluées entre 1/200^{e} et 1/20^{e}). Après addition de 150 µL d'AAPH et agitation, l'absorbance à 234 nm est lue toutes les 5 minutes pendant 300 minutes sur un spectrophotomètre Kontron Uvikon 941 UV-VIS contre une cuve ne contenant pas de substrat (Liegeois *et al.*, 2000 ; Peyrat-Maillard *et al.*, 2003). L'absorbance des antioxydants testés a été verifiée comme étant négligeable pour chaque concentration utilisée.

V.2.3. Calculs et expression des résultats

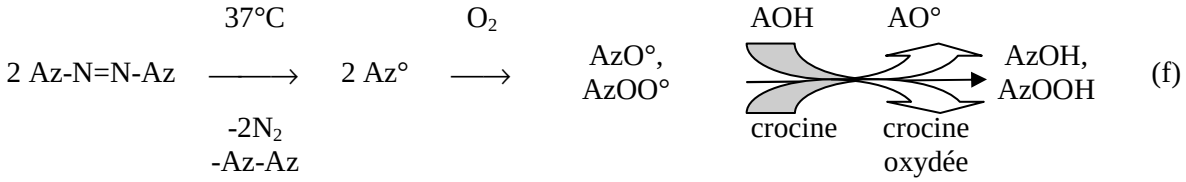
On mesure les temps d'inhibition (durée de la phase de latence) à partir des cinétiques d'apparition des dienes conjugués, à l'intersection des tangentes (figure 51). Les valeurs ainsi

obtenues sont utilisées pour tracer la courbe effet-dose (figure 52), soit le temps d'inhibition en minutes en fonction de la concentration en AOH. On peut alors comparer différents antioxydants selon la pente des droites obtenues. Plus la valeur de la pente est élevée, plus le produit testé est antioxydant.

V.3. TEST TAC

V.3.1. Principe

Le pouvoir antioxydant des différentes solutions de café a été déterminé selon un protocole adapté d'un test mesurant la Capacité Antioxydante Totale (TAC) (Kampa *et al.*, 2002 ; Lussignoli *et al.*, 1999). Ce test repose sur la capacité que possède une solution antioxydante à ralentir l'oxydation, accélérée à 37°C, d'un substrat caroténoïde, la crocine. La capacité antioxydante totale de molécules pures ou de mélanges est déterminée en milieu tamponné à pH 7,4. A 37°C, l'AAPH génère des radicaux libres qui vont oxyder la crocine, pigment caroténoïde extrait du safran. Celle-ci va subir une décoloration, ce qui se traduit par une perte d'absorbance (A) à sa longueur d'onde maximale (λ_{max}) qui pourra ainsi être suivie par spectrophotométrie. En présence de molécules antioxydantes (AOH), les formes radicalaires issues de l'oxydation de l'AAPH seront réduites sous forme AzOH et AzOOH, limitant ainsi l'oxydation de la crocine et ralentissant sa décoloration (Lussignoli *et al.*, 1999).



(f)

V.3.2. Protocole expérimental

V.3.2.1. Extraction et analyse du substrat d'oxydation : la crocine

La crocine (figure 53) n'existant pas sous forme purifiée dans le commerce, elle a été extraite du safran (Lussignoli *et al.*, 1999). L'ensemble des étapes se déroule à l'abri de la lumière afin de limiter la photo-dégradation de la crocine.

500 mg de safran sont lavés à trois reprises par 20 mL d'éther éthylique, sous agitation pendant deux minutes (300 rotations/min). Afin d'éliminer toute trace résiduelle d'éther éthylique, le safran est ensuite séché sous un flux d'air, puis extrait par 15 mL d'un mélange méthanol/eau 30/70 (v/v), sous agitation (300 rotations/min) pendant 5 minutes à température ambiante. La solution obtenue est filtrée sur filtre 0,45 µm dans une fiole de 50 mL. Le volume est alors complété par du tampon phosphate de sodium 10 mmol/L pH 7,4. L'extrait de crocine ainsi obtenu est aliquoté et peut être conservé à -20°C pendant deux mois.

Un spectre de l'extrait de crocine dilué au 1/10ème a été réalisé entre 380 et 580 nm sur un spectrophotomètre KONTRON UVIKON 941 afin de déterminer sa longeur d'onde d'absorbance maximale (λ_{max}). L'allure du spectre obtenu confirme bien celle de la littérature (Lussignoli *et al.*, 1999), avec une λ_{max} à 438 nm et deux épaulements, à 414 nm et 465 nm (figure 54). Bien que Lussignoli *et al.* (1999) aient choisi de travailler à une longueur d'onde de 450 nm, différente de la λ_{max}, le test TAC a été réalisé à 438 nm, après avoir vérifié qu'il n'y avait aucune interférence des réactifs à cette longueur d'onde.

La concentration de l'extrait de crocine a été calculée à 443 nm, à partir de son coefficient d'extinction molaire (ε) fourni dans la littérature à cette longueur d'onde (Lussignoli *et al.*, 1999) : $\varepsilon_{443\ nm}$ = 89000 L/mol/cm. Selon la loi de Beer Lambert :

$$[\text{crocine}] = \frac{A_{443\ nm}}{\varepsilon_{443\ nm} * \text{trajet optique (cm)}} \quad (1)$$

Une gamme étalon de la crocine a été établie entre 0 et 20 µmol/L par des dilutions de l'extrait de crocine dans du tampon phosphate de sodium 10 mmol/L pH 7,4. Le seuil de linéarité de la crocine a ainsi été fixé à 14 µmol/L.

V.3.2.2. Protocole du test TAC

Dans des microcuves, des aliquotes de 200 µL contenant des concentrations croissantes de solution de café (diluées entre 1/2000^{e} et 1/200^{e}) sont ajoutés à 400 µL de crocine diluée (volume final 600 µL). Les cuves sont maintenues à 37°C pendant 10 minutes. La réaction d'oxydation est ensuite initiée par l'addition de 400 µL d'AAPH à 18,4 mmol/L dans du tampon phosphate, à 37°C, puis l'absorbance à 438 nm est lue toutes les 2 minutes contre 600 µL de tampon phosphate mélangé à 400 µL d'AAPH, pendant environ 160 minutes, sur un spectrophotomètre Kontron Uvikon 941 UV-VIS équipé d'un passeur d'échantillons thermostaté.

V.3.3.Calculs et expression des résultats

L'exploitation des résultats a été adaptée de la méthode de Lussignoli *et al.* (1999) par Claire Ordonaud lors de son stage d'ingénieur C.N.A.M. au sein du laboratoire. À partir des données brutes d'absorbance, le pourcentage de crocine résiduelle dans le milieu réactionnel a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Crocine résiduelle au temps t (\%)} = \frac{A_{\text{au temps t}} - \Delta A_{\text{parasite}}}{A_{\text{au temps 0}}} * 100 \quad (2)$$

$\Delta A_{parasite}$ correspondant à l'absorbance due à la solution antioxydante ajoutée dans le milieu réactionnel (A échantillon initiale – A témoin initiale).

A partir de ce calcul, les cinétiques indiquant le pourcentage de crocine résiduelle en fonction du temps ont été établies (figure 55). Le temps correspondant à un pourcentage de crocine résiduelle de 50 % (T_{50}) a ainsi été déterminé, et a permis de calculer un taux d'inhibition de l'oxydation de la crocine.

$$\text{Taux d'inhibition} = \frac{T_{50\ \text{Témoin}} - T_{50\ \text{échantillon}}}{T_{50\ \text{Témoin}}} \quad (3)$$

Une courbe effet-dose donnant ce taux d'inhibition en fonction de la concentration d'échantillon antioxydant dans le milieu réactionnel a ensuite été établie. La capacité antioxydante est représentée par la pente de cette droite effet-dose. Plus la valeur de la pente est élevée, plus le produit testé est antioxydant.

La capacité antioxydante est exprimée en taux d'inhibition par g de café introduit dans le milieu réactionnel, par mL de boisson ou par g de matière sèche suivant le cas.

VI. MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES / PROTEINES DANS LE CAFE AU LAIT

Différentes méthodes ont été utilisées pour tenter de mettre en évidence l'existence d'interactions entre les acides hydroxycinnamiques et les protéines dans le café au lait : l'ultrafiltration, la dialyse à l'équilibre et la spectrofluorimétrie. Ces expériences ont été menées sur des systèmes simplifiés partiellement représentatifs de la boisson considérée : acide chlorogénique-lait, acide chlorogénique-caséines et acide chlorogénique-β-lactoglobuline, en conservant dans tous les cas les proportions relatives des différents intervenants du café au lait. L'ultrafiltration ayant donné les résultats les plus probants, seule cette méthode sera dévelopée.

VI.1. MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS PAR ULTRAFILTRATION

Des concentrateurs de type Vivaspin 20 (Vivascience, Allemagne) ont été utilisés. Dans le compartiment supérieur du concentrateur est introduit soit un mélange macromolécule/ligand, soit le ligand seul dissous dans le même milieu. La masse moléculaire de la macromolécule (ici la ou les protéines laitières) doit être au moins égale au double du seuil de coupure de la membrane du concentrateur (5000 Da). L'ensemble est centrifugé et l'on obtient dans le

compartiment inférieur le ligand libre, que l'on peut alors doser. On calcule alors le ratio (exprimé en %) de ligand lié selon la formule suivante (Pedone *et al.*, 1995) :

% ligand lié = ((ligand total – ligand libre) / ligand total) x 100 (4)

avec :

- ligand total = nombre de moles de ligand recueilli dans le filtrat de la manipulation utilisant le ligand seul
- ligand libre = nombre de moles de ligand recueilli dans le filtrat de la manipulation utilisant le ligand en présence de macromolécule

VI.1.1. Validation de la méthode

L'utilisation de cette méthode a été validée de la manière suivante : différentes quantités d'acide chlorogénique (ACQ) ont été mélangées à une quantité fixe de sérum albumine bovine (SAB) (12 g/L dans le mélange final), afin d'établir le graphique « nombre de moles d'acide chlorogénique liées par mol de SAB » en fonction du rapport SAB/ACQ (mole/mole) introduit dans le milieu (résultats obtenus par dialyse à l'équilibre par (Prigent *et al.*, 2003)). 5 rapports molaires ACQ/SAB ont été testés : 1,5 ; 3 ; 6 ; 15 et 21. Afin d'évaluer la répétabilité de la séparation par ultrafiltration, le rapport 3 a été répété trois fois avec des solutions mères différentes.

Toutes les solutions ont été préparées dans du tampon phosphate de sodium à 0,02 mol/L pH 7 contenant 0,02 mol/L de NaCl. Elles ont été incubées pendant 15 minutes à 20°C dans un bain marie à agitation orbitale (100 rpm), puis diluées au 1/10^{e} dans du tampon phosphate pour se placer dans la gamme de concentration en protéine préconisée par Vivascience pour l'ultrafiltration. Il a été vérifié que des dilutions supérieures donnaient le même résultat. 10 mL de mélange ont été introduits dans les tubes pesés au préalable, puis le tout a été centrifugé (centrifugeuse Sorvall ST 21, (Dupont, Les Ulis, France)) pendant 30 minutes à 6000 g et à 20°C. Les volumes recueillis dans le compartiment inférieur ont été évalués par pesée différentielle et l'ACQ a été dosé par spectrophotométrie à 324 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer lambda 9 UV-VIS, Shelton, USA), après tracé du spectre correspondant entre 200 et 450 nm. Le pourcentage d'ACQ lié a ensuite été calculé, puis utilisé pour calculer le nombre de moles d'ACQ liées par molécule de SAB.

VI.1.2. Etude des interactions dans le café au lait

Les interactions pouvant se produire entre l'ACQ du café et les protéines du lait ont été étudiées par ultrafiltration. Deux types de protéines ont fait l'objet d'études complémentaires

en système modèle : la β-lactoglobuline et un mélange commercial de caséines extraites du lait de vache.

Des solutions de lait écrémé ou demi-écrémé à 250 g/L ont été préparées, de même que des solutions modèle contenant 6,625 g/L de caséines ou 408,2 mg/L de β-lactoglobuline (concentrations équivalentes à celles contenues dans le lait dilué au ¼, c'est-à-dire à 250 g/L).

Toutes ces solutions ont été préparées dans du tampon acétate de sodium 0,1 mol/L pH 5,5 pH correspondant au pH du café au lait. Cependant, les caséines étant peu solubles à ce pH, elles ont d'abord été dissoutes dans du tampon phosphate de sodium 0,04 mol/L pH 7 à 37°C sous agitation pendant 2 heures ; puis le pH de la solution a été ramené à 5,5 (pH du café au lait), en diluant la solution de caséines dans le tampon acétate.

Les solutions de protéines étaient préparées à des concentrations doubles des concentrations désirées, c'est-à-dire celles présentes dans les préparations de café au lait. Elles ont ensuite été mélangées à du tampon acétate pH 5,5 ou à des solutions d'acide chlorogénique dans du tampon acétate à 1,421 g/L, dans une proportion 1 : 1 (v/v), de manière à obtenir des mélanges dans les proportions du café au lait et à pouvoir réaliser des témoins d'ultrafiltration avec la même solution d'acide chlorogénique, diluée au demi dans du tampon acétate.

Les solutions d'acide chlorogénique contenant ou non des protéines ont ensuite été incubées pendant 5 minutes au bain-marie sous agitation modérée par barreau aimanté, à 20°C ou à 85°C. Dans le second cas, les flacons étaient refroidis sous un courant d'eau froide avant ultrafiltration (les concentrateurs ne sont en effet pas utilisables avec des liquides excédant une température de 60°C).

Une dilution dans du tampon acétate était ensuite effectuée, de manière à se ramener à une concentration en protéines inférieure à 1 g/L, conformément aux instructions du fabricant. Ensuite, 10 mL d'échantillon dilué étaient introduits dans les concentrateurs Vivaspin et centrifugés pendant 30 minutes à 6000 g et à 20°C. Après détermination des volumes résiduelles dans chaque compartiment par pesée, les perméats ont été analysés par spectrophotométrie. Les spectres des perméats ont été tracés et l'absorbance mesurée à 324 nm.

Enfin, dans le cas de la β-lactoglobuline, une dernière solution, contenant un rapport ACQ/β-lactoglobuline égal à 3, mais la même quantité d'ACQ que les autres solutions testées, a également été analysée par la même méthode.

VI.2. MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS PAR MESURE DU POUVOIR ANTIOXYDANT DES COMPLEXES COVALENTS ACIDE CHLOROGENIQUE-PROTEINES

Des solutions à 10,5 g/L de SAB (Rawel *et al.*, 2002b), à 39,7 g/L de β-lactoglobuline, et à 48,9 g/L de caséines (Rawel *et al.*, 2001a), dans de l'eau, contenant suffisamment d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/L pour obtenir un pH final de 9, ont été préparées, ainsi qu'une solution d'acide chlorogénique à 100 g/L dans de l'éthanol .

Les deux solutions (protéines et ACQ) ont ensuite été mélangées dans un rapport 19 : 1 (v/v), et le pH réajusté à 9 si nécessaire, soit un rapport molaire protéine/ACQ de 1/9 pour la SAB, et de 1/7 pour la β-lactoglobuline et les caséines.

Des témoins ne contenant pas d'acide chlorogénique ont été réalisés en remplaçant la proportion d'ACQ ajoutée par de l'éthanol. De même, des témoins ne contenant que de l'ACQ ont été réalisés, en ajoutant 19 volumes d'eau à pH 9 à un volume d'ACQ dans de l'éthanol. Dans chaque cas, les pH étaient également réajustés à 9 avec NaOH 0,5 mol/L si nécessaire.

Ces mélanges ont ensuite été mis à incuber pendant 24 heures à 24°C en enceinte climatique, sous agitation par barreau aimanté. L'acide chlorogénique libre au terme de cette incubation a été éliminé par dialyse en boudin (Seuil de coupure 8 kDA, Spectrapor, Etats-Unis) 20 heures à 24°C, de 2 mL de mélange ACQ/protéines contre 200 mL d'eau ultrapure.

Les spectres d'absorbance des mélanges ont été enregistrés après dilution dans du tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7, avant (dilution $1/200^{e}$) et après incubation (dilution $1/10^{e}$ à l'intérieur du boudin, pas de dilution de l'extérieur). Les quantités d'acide chlorogénique retrouvées dans les eaux de dialyse ont été quantifiées par à l'aide des gammes étalon établies dans de l'eau à 329 nm en utilisant des concentrations allant de 0 à 0,1 mmol/L ($y = 16721\ x$; $R^2=0,9952$), et les quantités restant à l'intérieur des boudins de dialyse en ont été déduites par différence avec la quantité initialement introduite.

L'intérieur des boudins de dialyse a ensuite été dilué au $1/10^{e}$ dans du tampon phosphate de sodium pH 7,4 0,1 M et le test TAC a été appliqué à ces dilutions, en rapportant le taux d'inhibition à la quantité d'acide chlorogénique calculée dans les boudins de dialyse.

VII. SUIVI DU DEVENIR DES INTERACTIONS ACIDE CHLOROGENIQUE-PROTEINES AU COURS DE LA DIGESTION : MODELE *IN VITRO*

Afin d'obtenir des indications sur le devenir de la matrice café au lait une fois ingérée, des solutions modélisant le café au lait ont été soumises à une digestion *in vitro*, et le pourcentage

d'acide chlorogénique lié de nouveau calculé en répétant les manipulations en ultrafiltration décrites précédemment.

VII.1. PREPARATION DES SOLUTIONS A « DIGERER »

Toutes les solutions modèles ont été préparées dans du tampon acétate de sodium 0,1 mol/L pH 5,5 (pH du café au lait, tampon de force ionique proche de celle calculée pour le café au lait).

VII.1.1. Modèles acide chlorogénique et protéines laitières

Deux solutions modèles ont été préparées : ACQ / β-lactoglobuline : 2,74 g/L (7,73 mmol/L) / 1,02 g/L et ACQ / Caséines : 2,74 g/L / 25,50 g/L. Un témoin d'acide chlorogénique sans protéines a également été préparé. Afin de pouvoir utiliser la même solution d'ACQ dans toutes les digestions, les solutions d'ACQ et de protéines ont été préparées au double de la concentration nécessaire et mélangées dans un rapport 1 : 1, la solution témoin d'ACQ étant mélangée à un volume de tampon. Les solutions ont été homogénéisées pendant 5 minutes sous agitation modérée à 20°C.

Les caséines n'étant que très peu solubles dans cette zone de pH, la solution de caséines a tout d'abord été préparée dans une solution d'hydroxyde de sodium, conformément aux instructions du fabricant. La poudre est lentement ajoutée en pluie dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/L sous agitation dans un bain-marie à 24°C. Le tout est laissé sous agitation pendant une nuit, puis dilué dans du tampon acétate de sodium 0,1 mol/L pH 5,5 et homogénéisé par sonification (2 minutes 40 secondes, période homogénéisation/repos 10 secondes/ 10 secondes, amplitude 100 %, sonificateur 130 W, autotune 75186, Bioblock , Illkirch, France). La solution obtenue restait stable plusieurs heures avant de commencer à sédimenter.

VII.1.2. Modèle acide chlorogénique et lait

Un modèle acide chlorogénique / lait écrémé a également été étudié. La solution initiale contenait 2,74 g/L (soit 7,73 mmol/L) d'ACQ, et 96,62 g / 100 g de lait écrémé.

VII.1.3. Modèle acide chlorogénique / produits de la réaction de Maillard

Les produits de la réaction de Maillard (PRM) ont été préparés par incubation pendant 92 h à 103°C d'un mélange aqueux de glucose 0,8 mol/L et de lysine 0,5 mol/L à l'obscurité. Pour calculer la dilution à appliquer pour obtenir une concentration en PRM proche de celle contenue dans un café qui contiendrait 7,73 mmol/L d'acide chlorogénique, nous nous sommes basés sur les maxima d'absorbance du café et de la solution de PRM, dilués dans du

tampon acétate de sodium pH 5,5 0,1 mol/L. Il apparaît qu'une dilution au 1/3 de la solution de PRM de synthèse donne un contenu équivalent à une telle solution de café.

VII.2. DEROULEMENT DE LA DIGESTION *IN VITRO* ET DETERMINATION DES RATIOS D'ACQ LIES AUX PROTEINES

La digestion (Glahn *et al.*, 1996) de chacune des solutions (ACQ seul, ACQ+lait écrémé, ACQ+caséines, ACQ+β-lactoglobuline, ACQ+PRM) a été répétée 3 fois. La solution d'acide chlorogénique témoin a également été incubée trois fois en absence d'enzymes digestives, afin de pouvoir déterminer par ultrafiltration le ratio lié aux enzymes digestives lors de la digestion. A l'issue de chaque étape, l'ACQ libre a été séparé de l'ACQ lié aux enzymes digestives et/ou aux protéines laitières par ultrafiltration, afin de pouvoir quantifier le ratio lié.

VII.2.1. Digestion gastrique

Avant la digestion, les solutions modèles à digérer sont mises à incuber 5 minutes sous agitation modérée à 20°C. 20 mL sont ensuite prélevés et placés à 37°C, dans un bain-marie avec agitation orbitale (55 oscillations par minute). Le milieu est ensuite acidifié jusqu'à pH 2 par une solution d'acide chlorhydrique 5 mol/L. 2,5 mL d'une solution de pepsine dans de l'acide chlorhydrique 0,1 mol/L (rapport enzyme/substrat : 1/20) sont ajoutés et le volume est ajusté à 25 mL avec de l'eau ultrapure et de l'acide chlorhydrique 0,1 mol/L. Après une heure d'incubation à 37°C, sous agitation orbitale, l'enzyme est inactivée par refroidissement des échantillons, plongés 10 minutes dans la glace.

2,5 mL de digestat sont alors prélevés et dilués au 1/250^{e} dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol/L (pH 2). 10 mL de l'échantillon dilué sont ensuite introduits dans des concentrateurs Vivaspin (seuil de coupure 5000 Da) puis centrifugés pendant 30 minutes à 6000 g et à 20°C. Après détermination des volumes résiduels dans chaque compartiment par pesée, les perméats sont analysés par spectrophotométrie à 324 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer lambda 9 UV-VIS, Shelton, USA), après tracé du spectre correspondant entre 200 et 450 nm.

VII.2.2. Digestion intestinale

Le reste des digestats est soumis à la simulation de la digestion intestinale. Le pH est ajusté à 6 à l'aide d'hydroxyde de sodium 0,1 mol/L, et 0,5 mL d'un mélange contenant un extrait de bile et de la pancréatine (rapports massiques enzyme/substrat respectivement de 1/13 et de 1/20) dans une solution de $NaHCO_3$ 0,1 mol/L sont ajoutés. Le volume est ajusté à 25 mL. Après deux heures d'incubation à 37°C, sous agitation orbitale, les enzymes sont inactivées par refroidissement des échantillons, qui sont plongés 10 minutes dans la glace.

2,5 mL de digestat sont alors prélevés et le ratio d'acide chlorogénique lié est déterminé en répétant les manipulations en ultrafiltration, comme décrit précédemment pour le digestat gastrique, après dilution au 1/250^{e} dans du tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L (pH 7). Les spectres des perméats sont analysés par spectrophotométrie à 324 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer lambda 9 UV-VIS, Shelton, USA), après tracé du spectre correspondant entre 200 et 450 nm.

VIII. DETERMINATION DE LA BIODISPONIBILITE DE L'ACQ SUR MODELE CELLULAIRE DE TYPE CACO-2

L'absorption de l'ACQ sur le modèle cellulaire Caco-2 a été étudiée dans différents milieux : en présence de lait, de protéines ou encore de produits de la réaction de Maillard. Chacune de ces solutions a subi au préalable les étapes de digestion *in vitro* décrites au paragraphe 2.9.

VIII.1. CULTURES CELLULAIRES

La culture des cellules Caco-2 a été menée au sein du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire du Pr. Daniel Tomé, à l'I.N.A.-P.G. (Paris). Les cellules proviennent de l'American Type Culture collection (Rockville, Etats-Unis.), et ont été utilisées après confluence. Pour les manipulations, des filtres en polyéthylène téréphtalate ont été ensemencés à une densité de 40000 cellules/cm². Ces filtres sont insérés dans des puits (figure 56) rassemblés par plaques de 12. La croissance des cellules s'est effectuée dans du milieu Dulbecco Eagle modifié (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), contenant 15 % (v/v) de sérum fœtal de veau, 25 mmol/L de glucose, 1 % d'acides aminés non essentiels, 6 mmol/L de glutamine et 50 µg/mL de streptomycine. Les cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur avec une atmosphère contenant 5 % de CO_2 et 95 % d'air ambiant, sous une humidité constante. Le milieu de culture est changé tous les deux jours, puis chaque jour une fois que les cellules sont à confluence.

VIII.2. ETAPE PREALABLE INDISPENSABLE A L'APPLICATION DES DIGESTATS OBTENUS *IN VITRO* SUR LES CULTURES CELLULAIRES : INACTIVATION DEFINITIVE DES ENZYMES DIGESTIVES

Afin de pouvoir appliquer les solutions d'ACQ préalablement digérées sur les cellules Caco-2, il est indispensable d'inactiver les enzymes digestives encore présentes dans le milieu. Pour cela, on procède généralement à un autoclavage suivi d'une précipitation, ce qui est indispensable pour éviter un décollement des cellules Caco-2 (Rubio et Seiquer, 2002).

Le protocole retenu est un autoclavage en cocotte minute de 4 minutes à 100°C, suivi d'une centrifugation à 3900 g pendant 30 minutes.

Il a été vérifié que les enzymes étaient effectivement inactivées par ce protocole en mesurant l'activité trypsique dans le digestat autoclavé (Rondini, 2002). Ce dosage repose sur le principe suivant : la caséine, utilisée comme substrat de la réaction, est hydrolysée par la pancréatine, et les produits d'hydrolyse formés sont suivis à 280 nm.

Une solution de caséines à 0,3 % (p/v) est donc préparée dans un mélange tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7,6 / eau distillée (1/2, v/v), incubé sous agitation modérée pendant 1 h 30 à 37°C, afin de dissoudre les caséines. Le surnageant est ajouté à ce substrat dans une proportion 1/1 (v/v). Le mélange est incubé pendant 20 minutes sous agitation dans un bain-marie thermostaté à 37°C. Les échantillons sont précipités par 3 volumes d'acide trichloracétique à 5 % (m/v). Les tubes sont ensuite laissés au minimum 30 minutes à température ambiante puis centrifugés 20 min à 3000 g (centrifugeuse Sorvall ST 21, Dupont, Les Ulis, France). L'absorbance de chaque échantillon est alors lue à 280 nm contre le blanc (spectrophotomètre Perkin Elmer lambda 9 UV-VIS, Shelton, USA). Pour la réalisation du blanc, le mélange est ajouté au substrat en même temps que le surnageant, puis le mélange subit les mêmes étapes que les échantillons.

Si la différence d'absorbance entre l'échantillon et le blanc est significative ($p<0,05$), l'inactivation de la trypsine n'est pas complète.

VIII.3. APPLICATION DES SURNAGEANTS DE DIGESTION *IN VITRO* SUR LES CELLULES CACO-2

Avant d'appliquer les surnageants (digestats obtenus *in vitro*, ayant subi le protocole d'inactivation des enzymes digestives) sur les cultures cellulaires, le pH de ces derniers a été ajusté à 6 avec de l'acide chlorhydrique à 1 mol/L ou de l'hydroxyde de sodium à 1 mol/L. L'osmolarité des solutions a également été ajustée de manière à être comprise entre 290 et 330 mOsm/kg. Après ces ajustements, le contenu final en acide chlorogénique des solutions a de nouveau été déterminé par mesure de l'absorbance à 324 nm.

Juste avant l'application des surnageants sur les cellules, le milieu de culture a été éliminé par aspiration dans chaque puits, puis la couche de cellules a été rincée deux fois avec du tampon MES à pH 6. 1,5 mL de tampon HEPES pH 7,4 a alors été placé dans le milieu basolatéral tandis que la face apicale recevait 0,5 mL de surnageant des digestats. Pendant une heure, toutes les 10 minutes, 150 µL de solution ont été prélevés dans la phase basolatérale et remplacés par le même volume de tampon HEPES. Trois répétions ont été réalisées pour chaque surnageant et les prélèvements ont été congelés à -21°C jusqu'à analyse (sous une semaine).

VIII.4. ANALYSE DES PERMEATS CELLULAIRES

Les échantillons collectés dans la phase basolatérale ont été analysés par CLHP/DEC, dans les mêmes conditions que les solutions de café, à l'exception de la sensibilité des électrodes (1 µA au lieu de 10 µA). Le facteur de dilution dû au mode de prélèvement (remplacement du liquide basolatéral prélevé par du tampon) a été appliqué et les quantités retrouvées dans les perméats ont été rapportées aux quantités d'acide chlorogénique mesurées dans les surnageants après ajustement du pH et de l'osmolarité. La cinétique de perméation dans les différentes conditions a ainsi pu être établie.

IX. DETERMINATION DE LA BIODISPONIBILITE DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE SUR MODELE ANIMAL (RAT)

IX.1. EXPERIMENTATION ANIMALE EN CHRONIQUE

IX.1.1. Animaux

30 rats Wistar mâles pesant en moyenne 202 ± 3 g ont été répartis en 5 groupes de 6 rats, respectivement nommés «témoin» (rats 1 à 6), « café » (rats 7 à 12), « café au lait » (rats 13 à 18), « café atomisé » (rats 19 à 24) et « café au lait atomisé » (rats 25 à 30). L'expérimentation a été réalisée à l'animalerie de l'Institut National de Recherche Agronomique de Jouy-en-Josas, en collaboration avec l'équipe du Professeur Daniel Tomé. Les animaux ont été placés dans des cages individuelles, dans une pièce thermostatée à 22 ± 2°C, en cycle jour/nuit inversé avec une période de jour comprise entre 21 h et 9 h. Leur poids a été mesuré quotidiennement.

IX.1.2. Régimes

Pendant trois jours, les rats ont consommé *ad libitum*, entre 13 heures et 18 heures, un régime standard semi-liquide contenant 14 % de protéines totales (régime P14, tableau XVI), réhydraté avant utilisation dans des proportions 50 /50 (p/p). Parallèlement, de l'eau était fournie à volonté aux animaux.

A partir du quatrième jour, les différentes boissons expérimentales ont été proposées aux animaux entre 9 h et 10 h : eau, café, café au lait demi-écrémé, café atomisé réhydraté et café au lait atomisé réhydraté. La trop faible acceptabilité du café par les animaux nous a conduits à ajouter du sucre aux régimes expérimentaux. Au bout d'une semaine d'adaptation aux régimes, qui nous a notamment permis de répartir les rats en fonction de leur prise alimentaire de café, l'expérimentation a réellement commencé.

La composition définitive des boissons expérimentales est présentée dans le tableau XVII. 12,5 g de ces boissons ont été proposés aux rats chaque jour entre 9 h et 10 h pendant 22 jours.

Les masses d'aliments consommés (café et P14) ont été évaluées par pesée différentielle. Le coefficient d'efficacité alimentaire apparent (CEA) a été déterminé selon la formule suivante :

$$CEA = \text{Prise de poids quotidienne} / \text{Prise alimentaire quotidienne} \qquad (26)$$

Il a été calculé sur les deux dernières semaines de régime, lorsque la prise alimentaire et l'évolution pondérale des animaux étaient devenues stables.

IX.1.3. Sacrifice des animaux

A l'issue des 22 jours du régime expérimental, les animaux ont été sacrifiés quatre heures après consommation de la boisson expérimentale, par injection de pentobarbital sodique (1,6 mg/kg de poids corporel), puis exsanguinés après injection d'héparine par section de l'aorte abdominale et de la veine cave. Le sang a alors été récupéré et centrifugé à 3000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les plasmas ainsi récupérés ont été acidifiés à pH 3 (acide chlorhydrique à 3 mol/L), aliquotés puis congelés à -21°C. Différents organes, susceptibles de servir de lieu de stockage de polyphénols (cœur, foie, poumons) ont également été récupérés et pesés afin de rechercher d'éventuelles hypertrophies.

IX.2. DETERMINATION DE QUELQUES PARAMETRES SANGUINS

Le taux de triglycérides plasmatiques a été déterminé à l'aide du kit enzymatique TG PAP 150 (BioMérieux, France). Les taux de cholesterol/HDL cholesterol ont été déterminés à l'aide du kit enzymatique Cholesterol RTU (BioMérieux, France).

Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un automate Mascott plus (Lisabio, France).

IX.3. DETERMINATION DU STATUT ANTIOXYDANT PLASMATIQUE

Le pouvoir antioxydant des plasmas des rats ayant consommé les différents régimes a été déterminé par le test TAC (cf. paragraphe V). Il a été mesuré soit directement sur les plasmas, soit après une étape d'hydrolyse enzymatique des plasmas destinée à libérer les formes métabolisées des acides hydroxycinnamiques.

IX.3.1. Protocole d'analyse :

IX.3.1.1. Sans hydrolyse enzymatique

L'analyse des plasmas a été réalisée après décongélation de 30 minutes à température ambiante et éventuellement centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes lorsque la présence de fibrinogène était détectée. Le surnageant a alors été récupéré pour l'analyse.

Le plasma est introduit dans des microcuves à hauteur de 0 à 40 µL. Le volume est alors complété à 200 µL par du tampon phosphate de sodium 10 mmol/L pH 7,4. 400 µL de crocine diluée sont ensuite introduits. Les cuves sont maintenues à 37°C pendant 10 minutes. La réaction d'oxydation est ensuite initiée par l'addition de 400 µL d'AAPH à 18,4 mmol/L dans du tampon phosphate, à 37°C, puis l'absorbance à 438 nm est lue toutes les 2 minutes contre 600 µL de tampon phosphate mélangé à 400 µL d'AAPH, pendant environ 160 minutes, sur un spectrophotomètre Kontron Uvikon 941 UV-VIS équipé d'un passeur d'échantillons thermostaté à 37°C.

IX.3.1.2. Avec hydrolyse enzymatique

Les protocoles d'hydrolyse enzymatique et d'extraction des plasmas décrits ultérieurement (2.9.4.1.2.) ont été appliqués aux plasmas des rats du groupe « café au lait », avec et sans enzyme, de manière à déterminer le rôle potentiel des formes métabolisées dans le pouvoir antioxydant total du plasma. Les mêmes volumes de plasma que dans le test sans hydrolyse ont été utilisées pour le test TAC.

IX.3.2. Calculs et expression des résultats

Le taux d'inhibition a été calculé de la façon décrite dans le paragraphe 2.5.3.3. Les cinétiques indiquant le pourcentage de crocine résiduelle en fonction du temps ont été établies. Le temps correspondant à un pourcentage de crocine résiduelle de 50 % (T_{50}) a ainsi été déterminé, et a permis de calculer un taux d'inhibition de l'oxydation de la crocine. La capacité antioxydante est représentée par la pente de la droite effet-dose (taux d'inhibition en fonction de la concentration en échantillon antioxydant dans le milieu réactionnel).

Dans le cas des plasmas, le statut antioxydant plasmatique a été pondéré par la masse journalière moyenne de boisson consommée par chaque rat lors de l'expérimentation *in vivo*.

On a donc :

$$\textit{Statut antioxydant plasmatique} = \frac{\textit{Taux d'inhibition / µL de plasma}}{\textit{Masse journalière moyenne de boisson consommée}} \quad (27)$$

IX.4. DETERMINATION DES TENEURS PLASMATIQUES EN ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES

Dans chaque plasma collecté, un dosage des principaux antioxydants phénoliques issus du café (acides hydroxycinnamiques et dérivés) a été réalisé. Les formes natives et métabolisées (sulfatées, sulfo-glucuronidées et glucuronidées) ont été analysées après extraction du plasma, précédée ou non d'une étape d'hydrolyse enzymatique. Les échantillons ont ensuite été analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur électrochimique (CLHP-DEC).

IX.4.1. Préparation des échantillons pour l'analyse par CLHP-DEC

IX.4.1.1. Hydrolyse enzymatique et extraction des composés phénoliques

L'hydrolyse enzymatique a été réalisée par une sulfatase extraite *d'Helix Pomatia*, à 258 µkat/g, possédant également une activité glucuronidase de 7750 µkat/g. A 100 µL de plasma sont ajoutés 20 µL de tampon acétate de sodium 1 mol/L pH 4,9, contenant ou non 0,01 mg de sulfatase. Le mélange est homogénéisé au vortex pendant 10 secondes, puis incubé à 37°C, sous agitation, pendant une heure. Les échantillons non hydrolysés sont incubés de la même manière, en remplaçant la solution d'enzyme par un volume équivalente de tampon acétate de sodium 1 mol/L pH 4,9. Il a été vérifié que l'étape de chauffage n'induisait pas de perte d'acide chlorogénique.

IX.4.1.2. Précipitation des protéines plasmatiques

Après l'incubation à 37°C, 250 µL d'acétone sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 30 secondes d'homogénéisation au vortex, l'échantillon est centrifugé 10 minutes à 16000 g et à 4°C (centrifugeuse Biofuge Fresco, Kendro, Allemagne). Le surnageant est récupéré, et 150 µL d'acétone sont ajoutés au culot. Le tout est homogénéisé pendant 30 secondes au vortex, 10 secondes dans un bain à ultrasons, 30 secondes au vortex, puis de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Les deux surnageants sont ensuite combinés, et le solvant est évaporé à sec sous flux d'azote. Le résidu est alors repris dans 150 µL de phase mobile utilisée en CLHP (mélange eau / méthanol / acide acétique 88/10 /2 (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium), et homogénéisé aux ultrasons pendant

10 secondes, puis au vortex pendant 30 secondes, filtré sur filtre seringue nylon 0,22 µm et injecté en CLHP/DEC.

IX.4.2. Détermination du taux de récupération de l'acide chlorogénique

Le taux de récupération des acides hydroxycinnamiques plasmatiques a été déterminé à partir d'acide chlorogénique, composé majoritaire du café, sur un plasma témoin, après avoir vérifié que ce dernier présentait un profil chromatographique exempt d'acides hydroxycinnamiques. Il a été réalisé avec et sans hydrolyse enzymatique.

L'acide chlorogénique a été introduit dès le début du protocole d'extraction, dans le tampon ajouté au plasma. La concentration choisie était de l'ordre de 1 µmol/L, correspondant à une concentration plasmatique susceptible d'être retrouvée après consommation du régime donné aux animaux.

Par ailleurs, l'ACQ, naturellement sous forme *trans*, pouvant être isomérisé au cours du protocole d'extraction, les formes *cis* et *trans* ont été prises en compte dans le calcul.

$$\text{Taux de récupération} = \frac{([ACQ_{trans}] + [ACQ_{cis}])_{\text{récupérés après extraction du plasma témoin}}}{([ACQ_{trans}] + [ACQ_{cis}])_{\text{initiale}}} \quad (28)$$

Les taux de récupération en acide chlorogénique obtenus avec cette méthode d'extraction sont de 71 ± 4 % sans enzyme et de 64 ± 10 % avec enzyme.

IX.4.3. Analyse par CLHP-DEC

IX.4.3.1. Conditions d'analyse en CLHP-DEC

Les antioxydants phénoliques issus du plasma ont été séparés par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur électrochimique (CLHP-DEC) de type Coulochem II (ESA), décrit en 2.3.1.1. L'élution est réalisée à un débit de 1 mL/min à l'aide d'un mélange [eau / méthanol / acide acétique] [88/10/2] (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium.

Les voltamogrammes d'un plasma témoin et d'un mélange contenant les acides chlorogénique, caféique et férulique à 0,1 mg/L dissous dans la phase mobile utilisée en CLHP, ont été réalisés. Le plasma témoin a été extrait et dilué au $1/10^{e}$ dans la phase mobile de CLHP. Le potentiel de E1 a été fixé à 300 mV (sensibilité de 1 µA), celui de E2 variant entre 300 et 1000 mV (sensibilité de 1 µA).

Les potentiels retenus pour l'analyse des plasmas sont E1 = 300 mV (1 µA), E2 = 400 mV (1 µA).

Enfin, la limite de sensibilité de la méthode a été déterminée : elle est de 14 nmol/L pour les acides chlorogénique et caféique et de 50 nmol/L pour l'acide férulique (soit des quantités injectées respectivement de 0,28 pmol et de 1 pmol).

IX.4.3.2. Identification des isomères de l'acide chlorogénique

Afin de déterminer le temps de rétention de l'acide *cis*-chlorogénique, une solution méthanolique d'acide *trans*-chlorogénique a été placée sous UV à 254 nm pendant 144 heures (Maillard et Berset, 1995). Des prélèvements ont été effectués régulièrement et les solutions ont été injectées dans le système chromatographique. Le temps de rétention de l'acide *cis*-chlorogénique a ainsi été établi à 32 minutes dans ces conditions.

IX.4.3.3. Etalonnage des acides chlorogénique, caféique et férulique

Les gammes d'étalonnage des antioxydants phénoliques ont été effectuées dans la phase mobile de CLHP. Les concentrations en acide chlorogénique, acide caféique et acide férulique varient de 0 à 1 µmol/L. Les gammes d'étalonnage ont été réalisées à partir d'un minimum de trois solutions mères différentes.

Les équations des droites de régression sont respectivement, pour la sensibilité 1 µA :

- acide chlorogénique : $y = 68970\ x$ ($R^2 = 0,9645$) ;
- acide caféique : $y = 71768\ x$ ($R^2 = 0,9783$) ;
- acide férulique : $y = 58983\ x$ ($R^2 = 0,9651$) ;

Par ailleurs, la réponse des isomères *cis* et *trans* a été considérée comme similaire en électrochimie, comme cela avait été montré avec l'acide férulique par Rondini (2002). La quantification de ces composés a donc été réalisée en prenant en compte la somme des deux isomères.

X. ANALYSES STATISTIQUES

Pour toutes les expériences sur l'aliment, sauf indication particulière, trois répétitions ont été effectuées. Les résultats sont exprimés sous forme moyenne ± écart-type. Dans tous les cas, des analyses de variance ont été effectuées et la Plus Petite Différence Significative (PPDS) a été calculée, afin de déterminer si les échantillons étaient significativement différents ou non.

Pour les expérimentations animales, lorsque cela était pertinent (écart-types faibles), des moyennes ± écart-types ont été calculées et comparées par ANOVA et PPDS. Sinon, les résultats sont présentés rat par rat, avec les écart-types dus à l'analyse.

Tous les calculs ont été effectués sous Microsoft Excel avec $p < 0,05$ significatif.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le café a été retenu comme système d'étude, à la fois car il présente un profil phénolique simple (acide chlorogénique majoritaire), et car il est fréquemment consommé en présence de lait, ce qui permet de disposer d'un « aliment modèle » pour étudier l'influence des protéines laitières sur la biodisponibilité des acides phénoliques.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au pouvoir antioxydant de la boisson elle-même, dans les différentes conditions de préparation (ajout de lait, atomisation, chauffage…), puis des interactions éventuelles entre les acides phénoliques du café et les protéines laitières ont été recherchées.

Le devenir de ces interactions lorsque l'aliment est ingéré a ensuite été étudié *in vitro*, puis *in vivo*, par une étude de biodisponibilité de l'acide chlorogénique du café dans différentes conditions de préparation.

I. ETUDE DE LA MATRICE ALIMENTAIRE : LE CAFE AU LAIT

I.1. CHOIX DE LA DOSE DE CAFE

Dans la seconde partie de l'étude, nous nous sommes intéressés au devenir des acides phénoliques dans l'organisme, par une étude de supplémentation chronique *in vivo*. Pour cela, nous avons préparé différentes solutions à base de café soluble décaféiné Carte Noire (20 g/L, 30 g/L, 50 g/L et 60 g/L), en partant des recommandations du fabricant (20 g/L). Cinq personnes appartenant au personnel de l'ENSIA, et buvant du café de manière régulière, ont désigné la boisson à 50 g/L comme étant acceptable et proche d'un café préparé en cafetière, la boisson à 60 g/L étant jugée trop « forte » et les autres trop diluées. Cette dose a donc été retenue pour la suite de l'étude. Le café soluble a été choisi préférentiellement à une préparation par filtration en cafetière pour des raisons de répétabilité de préparation d'un jour sur l'autre, l'étude en chronique sur animaux ayant été planifiée sur une durée de trois semaines. Le même lot de café soluble a été utilisé pour toutes les études, et a été conservé en bocal hermétique à 4°C pendant toute la durée de l'étude.

I.2. ANALYSE DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES DANS LES CAFES

L'analyse des acides phénoliques du café a été réalisée par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur électrochimique (CLHP/DEC), après extraction des

composés phénoliques à l'acétate d'éthyle, le café étant au préalable solubilisé dans de l'eau ultrapure et acidifié à pH = 3.

I.2.1. Mise au point de la méthode d'analyse

L'établissement des voltamogrammes des différents acides phénoliques susceptibles d'être retrouvés dans le café a permis de déterminer un potentiel maximal de réponse en électrochimie : il est de 600 mV sur E2 (figure 57) lorsque l'élution est réalisée par le mélange acétonitrile / NaH_2PO_4 25 mM pH 2,4 15/85 (v/v) et l'électrode 1 réglée sur 300 mV. Les temps de rétention sur la colonne C_{18}, dans ces conditions, sont de l'ordre de 9,4 minutes pour l'acide chlorogénique (ACQ), de 15,1 minutes pour l'acide caféique (AC), de 30,3 minutes pour l'acide *p*-coumarique (A*p*C) et de 38,5 minutes pour l'acide férulique (AF). L'acide dihydrocaféique a été choisi comme standard interne pour vérifier la fiabilité de l'extraction, aucun composé du café n'étant élué à son temps de rétention (11,2 minutes).

I.2.2. Dosage des acides hydroxycinnamiques

I.2.2.1. Concentrations en acides hydroxycinnamiques dans les cafés préparés extemporanement

La solution de café à 50 g/L préparée à partir du café soluble du commerce contient 710 ± 31 mg/L d'ACQ (tableau XVIII). Les autres acides hydroxycinnamiques recherchés (AC, A*p*C, AF) n'ont pas été détectés dans la boisson analysée sans hydrolyse alcaline, ce qui est en concordance avec les résultats de Nardini *et al.* (Nardini *et al.*, 2002).

D'autres formes estérifiées de l'acide caféique (acides néochlorogénique, cryptochlorogénique, 3,4-dicaféoyl-quinique, 3,5-dicaféoyl-quinique, 4,5-dicaféoyl-quinique) sont en revanche certainement présentes en concentrations moindres, comme l'indique la littérature (tableau XVIII). Il existe en effet un certain nombre de petits pics non identifiés sur les chromatogrammes du café (figure 58), qui pourraient être ces formes estérifiées.

Après hydrolyse alcaline, ces pics disparaissent totalement et sont remplacés par trois pics identifiables : AC, A*p*C et AF (figure 58), ce qui suggère la présence de ces acides sous forme estérifiée dans le café de départ (acides 3-féruloyl-quinique, 4-féruloyl-quinique, 5-féruloyl-quinique entre autres). Les esters d'AC sont les plus abondants (tableau XVIII).

A noter cependant que si l'on convertit les concentratin en mmol/L et que l'on se base sur une stoechiométrie 1 : 1, on retrouve une quantité d'acide caféique nettement plus importante que ce que l'on devrait trouver si sa seule origine était l'hydrolyse de sa forme estérifiée, l'acide chlorogénique. Ceci suggère la présence d'autres acides caféoyl-quiniques ou d'acides dicaféoyl-quiniques dans le café (Clifford *et al.*, 2003).

I.2.2.2. Comparaison des cafés préparés extemporanément avec des boissons préparées à partir de café en grains

Quel que soit le café considéré, nous confirmons que l'acide chlorogénique est l'acide hydroxycinnamique le plus abondant du café (tableau XVIII). La solution de café à 50g/L préparée à partir du café soluble du commerce en contient 710 ± 31 mg/L, ce qui est légèrement supérieur à ce que l'on obtient en préparant du café par filtration de poudre moulue (tableau XIX). Cette dernière valeur est cependant proche de celle indiquée par Nardini *et al.* (2002) pour une solution de café préparée par filtration. Le dosage choisi pour l'expérimentation, à savoir 50 g de poudre de café soluble par litre de solution, correspond donc à un café relativement riche en ACQ, mais n'est pas totalement aberrant par rapport à ce que l'on obtiendrait avec une préparation par filtration.

Les concentrations en ACQ retrouvées dans la solution de café vert sont 3,5 fois plus importantes que celles trouvées dans les cafés torréfiés (tableaux XVIII et XIX). Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'une grande partie de l'ACQ présent dans le grain de café disparaît à la torréfaction (Herrmann, 1989), même si les cafés analysés ici n'avaient pas la même origine. De plus, l'extractibilité des acides phénoliques est probablement différente dans le café vert et dans le produit torréfié, du fait des modifications profondes du grain lors de la torréfaction.

I.2.2.3. Influence de l'atomisation sur les acides hydroxycinnamiques

L'atomisation de la solution de café fait légèrement diminuer les concentrations d'acides hydroxycinnamiques retrouvées dans le café avant et après hydrolyse acide (tableau XVIII, figures 59 et 60). Cependant, cette diminution, bien que significative, reste faible.

En revanche, les concentrations retrouvées sont nettement plus faibles lorsque l'atomisation du café est réalisée en présence de lait. Or, nous avons vérifié que le rendement d'extraction de l'ACQ du café n'était pas modifié en présence de lait. Ce résultat suggère donc qu'il a pu se former des complexes entre les protéines du lait et les acides phénoliques pendant le procédé d'atomisation. En effet, ce dernier est susceptible de légèrement dénaturer les protéines et de démasquer des zones hydrophobes auparavant inaccessibles.

De plus, la littérature suggère que des liaisons covalentes peuvent également se former en faible quantité entre l'acide chlorogénique et les protéines laitières, à pH acide et en présence de dioxygène (Petzke *et al.*, 2005). Or, la surface de contact entre l'air et les molécules composant le café au lait est considérablement augmentée lors du procédé d'atomisation, par comparaison à un mélange extemporané, puisque le café liquide est présenté au flux d'air chaud sous forme de gouttelettes. Une partie des acides phénoliques a donc pu s'oxyder en

quinones, qui sont ensuite susceptibles de former des liaisons covalentes avec les protéines tel que ce que l'on observe en milieu basique (Rawel *et al.*, 2001a). De tels complexes pourraient être à l'origine d'une diminution de l'extractibilité des acides phénoliques.

S'il existe des complexes entre les protéines du lait et les acides phénoliques du café, l'analyse du contenu polyphénolique des cafés suggère qu'ils se forment préférentiellement lors de l'atomisation des mélanges en présence de lait.

I.3. DETERMINATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT

Trois tests de mesure du pouvoir antioxydant (PAO) ont été réalisés sur les différentes boissons :

- Le test DPPH permet d'évaluer l'effet antiradicalaire direct des molécules contenues dans les boissons. Il s'agit d'un test rapide et simple à mettre en œuvre, qui permet donc de tester un nombre élevé de conditions susceptibles d'être rencontrées lors de la préparation du café.
- Le test AAPH permet de mesurer le pouvoir antioxydant des boissons vis-à-vis d'une émulsion lipidique et s'approche davantage d'un système alimentaire que le test DPPH.
- Le test TAC est classiquement utilisé pour déterminer le pouvoir antioxydant de fluides biologiques tels que le plasma suite à l'ingestion d'aliments riches en antioxydants. Cependant, il est également intéressant de l'appliquer à l'aliment lui-même, de manière à disposer d'un point de comparaison valable entre le PAO potentiel de l'aliment et le statut antioxydant acquis par le plasma suite à son ingestion.

Dans un premier temps, le PAO du café a été mesuré de manière globale, en faisant varier divers paramètres intervenant dans la préparation de la boisson ; puis des séparations sur colonne chromatographique LH-20 ont permis d'attribuer les parts relatives du PAO aux différents composés du café.

I.3.1. Pouvoir antioxydant global des boissons

I.3.1.1. Pouvoir antioxydant du café extemporané

I.3.1.1.1. Pouvoir antioxydant du café extemporané seul

Le café extemporané présente bien une activité antioxydante, quel que soit le test utilisé (figures 61 et 63). Cependant, il n'est pas possible de comparer les valeurs que nous avons obtenues aux données de la littérature, car les tests que nous avons utilisés ont rarement été appliqués à des boissons à base de café, et, lorsqu'ils l'ont été, les conditions de manipulation

étaient différentes. Nous avons donc appliqué nos tests à d'autres boissons afin d'obtenir un point de comparaison.

I.3.1.1.2. Comparaison du pouvoir antioxydant des cafés préparés extemporanément avec celui des cafés préparés à partir de café en grains

Une solution de café a été préparée à partir de café en grains du commerce (marque Carte Noire également), torréfiés et moulus, selon un procédé proche des conditions de préparation domestique. Cette dernière est décrite dans la littérature de la manière suivante : « après avoir déposé les grains moulus sur un filtre et les avoir fait gonfler avec de l'eau tiède, on ajoute sur la poudre par petites fractions de l'eau à la limite de l'ébullition durant dix minutes » (Debry, 1993). Pour des raisons évidentes de répétabilité de l'extraction, il a été préféré d'incuber la poudre de grains de café (vert ou torréfié) dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes, puis de filtrer le mélange sur filtre papier (Maeztu *et al.*, 2001 ; Nardini *et al.*, 2002).

Afin de pouvoir effectuer une comparaison entre les cafés ainsi préparés et le café expérimental préparé par dissolution de poudre de café lyophilisé Carte Noire dans de l'eau, nous avons rapporté tous les résultats à la quantité de matière sèche apportée par le café contenu dans les boissons. En effet, la matière sèche de la boisson expérimentale préparée extemporanément est de 4,8 ± 0,3 %, tandis que les matières sèches des filtrats de café en grains verts et torréfiés sont respectivement de 1,7 ± 0,6 % et de 2,0 ± 0,2 %. Comparer directement les boissons en considérant le volume de liquide ajouté dans les cuves apporte donc un biais dû aux différences de concentration.

Si l'on compare le PAO des cafés préparés avec la poudre soluble avec celui d'un café préparé à partir de café en grains torréfiés (figure 61), on constate qu'à contenu en acide chlorogénique sensiblement égal, le pouvoir antioxydant du café préparé à partir de café en grains est environ 40 % plus élevé que celui des cafés préparés extemporanément avec la poudre commerciale soluble : il faut plus de poudre de café soluble que de matière sèche de filtrat de café pour obtenir un PAO équivalent à celui d'un café préparé par filtration.

On peut donc penser que le procédé industriel appliqué pour obtenir la poudre de café soluble commerciale fait évoluer le contenu en composés antioxydants autres que l'acide chlorogénique. Ces derniers sont probablement impliqués dans le pouvoir antioxydant, puisque celui de la préparation de café vert en grains, n'est que faiblement plus élevé que celui de son équivalent torréfié, alors qu'il contient plus de 60% de plus d'acide chlorogénique en matière sèche (figure 61).

Cependant, la poudre soluble et le café utilisé pour la préparation filtrée n'ayant pas la même origine, il est également possible que ces variations proviennent d'un degré de torréfaction

différent. En effet, la littérature montre que plus ce dernier est élevé, et plus le pouvoir antioxydant du café diminue (Borrelli *et al.*, 2002 ; del Castillo *et al.*, 2002 ; Nicoli *et al.*, 1997).

I.3.1.1.3. Comparaison du PAO du café préparé extemporanément à celui d'une infusion de thé vert

Afin de conforter l'intérêt du choix du café comme aliment modèle (profil phénolique simple, consommation habituelle avec du lait), son pouvoir antioxydant a été comparé à celui d'une boisson consommée dans des conditions équivalentes et reconnu pour son pouvoir antioxydant : le thé vert (Natella *et al.*, 2002 ; Serafini *et al.*, 1996). Le café extemporané, préparé avec 50 g/L de poudre de café soluble, apparait comme étant compétitif avec la boisson au thé vert étudiée, puisque son activité antioxydante est près de dix fois plus élevée (tableau XX). Ceci confirme les résultats de Natella *et al.* (2002), qui ont montré que le pouvoir antioxydant du café était 5 à 8 fois plus élevé que celui du thé selon le test TRAP (Natella *et al.*, 2002). Il serait toutefois évidemment nécessaire de répéter cette manipulation avec différents thés du commerce pour obtenir un résultat plus valable, cependant, ce résultat montre que le test utilisé pour cette manipulation donne un résultat comparable aux données de la littérature.

Le choix du modèle café/café au lait se justifie donc pleinement pour étudier l'impact des protéines sur le pouvoir antioxydant et les effets santé des composés phénoliques du café, avec implication possible de cet aliment dans la lutte contre le stress oxydatif.

I.3.1.2. Effets de la formation de liaisons covalentes avec des protéines sur le pouvoir antioxydant de l'acide chlorogénique

Comme nous l'avons vu précedemment, différents types de liaisons sont susceptibles de se former entre les protéines et les composés phénoliques d'un aliment : en milieu acide, des interactions de faible énergie sont susceptibles de prendre place lors d'une première phase réversible, remplacées par des liaisons covalentes au bout de quelques jours, liaisons dont l'apparition est facilitée par le rapprochement occasionné lors de la phase réversible ; en milieu basique ou oxydant, les composés phénoliques peuvent être convertis en quinones, qui forment alors des liaisons covalentes avec les protéines. La déprotonation d'un phénol augmente en effet son caractère réducteur et donc sa sensibilité à l'autooxydation.

La littérature suggère que la formation de telles liaisons entre les polyphénols et les protéines dans un mélange de ces composés fait diminuer le pouvoir antioxydant du mélange (Arts *et al.*, 2001d ; Arts *et al.*, 2002). Nous avons donc dans un premier temps cherché à mettre en évidence cette diminution par le test TAC.

Des complexes à liaisons covalentes entre l'acide chlorogénique et les protéines ont été formés selon le protocole décrit par Rawel *et al.*, entre l'ACQ et la SAB (Rawel *et al.*, 2002b), l'ACQ et la β-lactoglobuline (Rawel *et al.*, 2001a), et l'ACQ et un mélange commercial de caséines extraites du lait, en milieu basique.

Dans ces publications, des proportions croissantes de protéines étaient ajoutées à de l'acide chlorogénique à pH 9. Pour nos essais, nous avons uniquement utilisé le rapport apportant le maximum de protéines. Ainsi, des solutions de SAB, de β-lactoglobuline, ou de caséines, dans de l'eau à pH 9, ont été préparées, et mélangées à une solution d'acide chlorogénique pendant 24 heures à 24°C. Les quantités de β-lactoglobuline ont été choisies en se basant sur le fait que l'extrait de protéines du lactosérum utilisé dans la publication contenait 75 % de cette protéine.

Le pouvoir antioxydant des mélanges a été analysé, après avoir été ramené à la quantité d'acide chlorogénique présente dans le milieu après dialyse, cette dernière visant à éliminer l'acide chlorogénique libre restant dans le milieu. Nous avions préalablement vérifié que les protéines ajoutées n'apportaient pas de pouvoir antioxydant, en réalisant les mêmes tests mais en remplaçant la solution d'ACQ par du tampon. Les résultats obtenus montrent bien que le pouvoir antioxydant des complexes est plus faible que le pouvoir antioxydant de la molécule pure (figure 62) : on observe des diminutions significatives ($p<0,05$) respectivement de 27 %, 34 % et 48 % pour les complexes à base de SAB, de caséines et de β-lactoglobuline (rapports molaires initiaux protéine/ACQ de 1/9 pour la SAB, et de 1/7 pour la β-lactoglobuline et les caséines). Il semble que la formation de complexes soit plus élevée avec les caséines et la β-lactoglobuline qu'avec la SAB, puisque le nombre de moles d'ACQ par mole de SAB introduite est plus importante que dans le cas des deux autres protéines, alors que la diminution de pouvoir antioxydant observée est plus importante pour ces dernières.

La formation de complexes de nature irréversible entre l'acide chlorogénique et certaines protéines entraîne donc bien une diminution du pouvoir antioxydant du mélange, mesurable par le test TAC. Cependant, la proportion protéines/polyphénol utilisée dans ces systèmes modèles, fidèle aux données publiées (Rawel *et al.*, 2002b ; Rawel *et al.*, 2001a), ne reflète pas nécessairement la réalité de l'aliment : d'une part, les proportions dans le café au lait sont différentes ; d'autre part, les conditions de pH et de force ionique, ainsi que les autres composés présents dans le café, peuvent considérablement modifier l'interaction. Des interactions de nature radicalement différente, puisque réversibles, ont ainsi été mises en évidence dans un système modèle présentant des conditions de pH et de force ionique comparables à celles d'un aliment, entre la SAB et l'acide chlorogénique (Rawel *et al.*, 2005).

De telles interactions sont susceptibles de se produire dans le système « café au lait ». Nous avons donc dans un premier temps cherché à mettre en évidence une variation du pouvoir antioxydant dans le café additionné de lait, puis nous avons recherché l'existence de tels complexes dans la boisson.

I.3.1.3. Pouvoir antioxydant du café au lait préparé extemporanément

D'après les résultats observés précédemment, il semble plausible que la formation d'interactions entre les protéines du lait et l'acide chlorogénique du café diminue le pouvoir antioxydant de la boisson. Nous avons donc étudié l'influence de divers paramètres susceptibles d'être utilisés dans la préparation du café au lait et de créer des interactions protéines/ACQ, plutôt de nature réversible dans ce cas, sur le pouvoir antioxydant global de la boisson, à savoir l'ajout extemporané de lait, la température de préparation et un procédé industriel couramment appliqué à la boisson, l'atomisation.

I.3.1.3.1. Effets de l'ajout extemporané de lait dans les différentes boissons

Des interactions entre protéines et polyphénols ayant été mises en évidence dans divers systèmes alimentaires (Haslam et Lilley, 1988), il est important d'évaluer l'impact éventuel de la présence de protéines laitières sur l'expression de l'activité antioxydante des composés phénoliques du café. Dans le cas du thé, Serafini *et al*. (1996) ont montré une diminution du « bénéfice santé » apporté par les flavonoïdes du thé vert lorsque celui-ci était consommé en présence de lait (élimination totale du pouvoir antioxydant acquis par le plasma suite à la consommation de la même boisson sans lait), bien qu'aucune différence du pouvoir antioxydant des boissons initiales, thé vert et thé vert au lait, n'aient été observées.

Les résultats que nous avons obtenus par le test TAC confirment ces données. Ainsi, une boisson à base de thé vert, préparée dans des conditions courantes d'utilisation (1 sachet de 2 g de thé vert infusé pendant 5 minutes dans 150 mL d'eau bouillante), possède la même capacité antioxydante qu'elle contienne ou non 25 % de lait (tableau XXI).

Il faut cependant noter que les composés phénoliques présents ne sont pas les mêmes que dans le café. En effet, si le café est riche en dérivés hydroxycinnamiques, le thé contient principalement des flavonoïdes monomériques (thé vert) comme l'épigallocatéchine gallate ou des dérivés polymériques (thé noir) comme la théaflavine ou encore la théarubigine (Graham, 1992). Les interactions éventuellement mises en jeu avec les protéines laitières ne sont donc probablement pas équivalentes.

La mesure de la capacité antioxydante des boissons préparées de manière extemporanée, café et café au lait, a donc été réalisée en parallèle d'une solution contenant uniquement du lait à la même concentration que dans le café au lait.

La figure 63 présente les pouvoirs antioxydants des solutions préparées à partir du café soluble Carte Noire, auquel on ajoute ou non du lait, obtenus selon les trois tests de mesure différents (DPPH, AAPH et TAC). Il n'existe pas de différence significative entre les différents échantillons.

Le lait seul, dilué aux doses utilisées dans le café au lait expérimental (25 % de la boisson, soit 250 g/L) n'a montré aucun pouvoir antioxydant dans les trois tests de mesure. Des études menées sur un sous-produit de la fabrication de la crème ayant une composition proche de celle du lait écrémé (Wong et Kitts, 2003) ont montré une activité antioxydante non nulle, mais de nombreuses publications traitant du PAO des protéines laitières montrent qu'une hydrolyse préalable est nécessaire (Kitts et Weiler, 2003 ; Marshall, 2004). En effet, les effets antioxydants du lait observés dans l'organisme seraient essentiellement dus à des peptides dérivés des protéines du lactosérum, obtenus suite à la digestion trypsique du lait. Ils agiraient notamment grâce à la conversion de leurs cystéines en glutathion au sein de la cellule (Kitts et Weiler, 2003 ; Marshall, 2004).

L'ajout de lait au café, de manière extemporanée (250 g/L dans la boisson), ne semble donc pas avoir d'effet sur le pouvoir antioxydant de la boisson. Il en est de même lorsque l'on ajoute 250 g/L de lait dans la boisson préparée à base de café vert ou dans la boisson préparée par filtration de café moulu (figure 64).

Deux hypothèses peuvent alors être émises pour expliquer ce résultat : soit il ne se forme aucun complexe entre les acides hydroxycinnamiques du café et les protéines du lait au cours d'une préparation extemporanée, soit la présence de lait ne modifie pas, dans ces conditions de mesure, la capacité antioxydante du café ou de l'acide chlorogénique, malgré la formation de complexes protéines/acides hydroxycinnamiques.

I.3.1.3.2. Effets de la matière grasse du lait

La β-lactoglobuline est susceptible de s'associer aux acides gras présents dans le lait (Phillips *et al.*, 1994). Cette association pourrait donc limiter une éventuelle interaction avec les acides phénoliques du café, ou au contraire améliorer cette interaction, puisqu'il a été montré que la liaison de la β-lactoglobuline à l'acide palmitique modifiait sa conformation, ce qui faisait augmenter l'accessibilité aux résidus tryptophane de la protéine (Busti *et al.*, 1998). Nous nous sommes donc intéressés aux effets de la teneur en matière grasse du lait sur le pouvoir antioxydant de la boisson.

Les différents pouvoirs antioxydants des solutions préparées avec le café soluble Carte Noire auquel du lait, contenant différents taux de matières grasses, a été ajouté, ont été évalués par les tests DPPH et TAC (figure 65). Les trois laits testés ne présentent pas de pouvoir

antioxydant, du moins pour les concentrations utilisées. L'ajout de lait au café, quelle que soit sa teneur en matière grasse, ne semble pas avoir d'effet sur le pouvoir antioxydant de la boisson. La matière grasse n'aurait donc pas d'influence sur la formation d'éventuelles liaisons ACQ/protéines ou sur l'expression du pouvoir antioxydant.

I.3.1.3.3. Influence de la température de préparation du café soluble

Le chauffage du lait au-delà de 55°C induit des associations entre caséines, α-lactalbumine et β-lactoglobuline, mais également un début de dénaturation de l'α-lactalbumine dès 65°C (Holt et Roginski, 2001). Chauffés entre 50 et 80°C, les dimères de β-lactoglobuline se dissocient et des zones hydrophobes de la protéine se trouvent découvertes (Chobert, 1995), libérant ainsi des zones susceptibles de former des complexes réversibles avec les acides phénoliques. Au pH du café au lait (5,5), la température de dénaturation de la β-lactoglobuline est d'environ 78°C (Relkin, 1996). De même, plus on chauffe les caséines, moins leur structure est organisée (Holt et Roginski, 2001). Ces changements induits par le chauffage sont donc *a priori* susceptibles d'induire de nouvelles interactions entre les protéines du lait et les composés du café.

La figure 66 présente les pouvoirs antioxydants (test DPPH) des solutions préparées avec le café soluble Carte Noire, auquel on ajoute du lait et/ou de l'eau chauffés au micro-ondes ou à la casserole. Le fait de simplement chauffer l'eau ajoutée au café fait légèrement augmenter le pouvoir antiradicalaire de la solution. De même, ajouter au café du lait chaud ou froid avec de l'eau à 85°C induit une augmentation légère mais significative de PAO par rapport à la même préparation à froid avec ou sans lait, quel que soit le mode de chauffage. Ces augmentations du PAO peuvent s'expliquer par une solubilité légèrement meilleure du café dans l'eau chaude ; cependant, elles restent très faibles. Les données obtenues avec les préparations réalisées à froid sont donc comparables à ce que l'on obtiendrait avec une préparation par filtration du café.

I.3.1.4. Effet de l'atomisation du café en présence de lait sur le pouvoir antioxydant

Les pouvoirs antioxydants des solutions préparées à partir des poudres de café atomisées ou avec la poudre Carte Noire initiale, auxquelles on ajoute ou non du lait (tests DPPH, AAPH et TAC), sont présentés sur la figure 67. Le pouvoir antiradicalaire de la solution de café au lait atomisé a été calculé en considérant uniquement le café présent dans la poudre, *i.e.* les mêmes dilutions que pour les autres échantillons ont été appliquées aux solutions mères. Dans le cas du test DPPH, il n'existe pas de différence significative entre les échantillons. L'ajout de lait et/ou l'atomisation des mélanges ne semblent donc pas avoir d'effet sur le pouvoir

antiradicalaire du café, malgré les différences constatées dans les quantités d'acides phénoliques détectées dans ces solutions (cf. 3.1.2).

En revanche, lorsque le pouvoir antioxydant est évalué par les tests AAPH et TAC, atomiser le café en présence de lait entraîne une dininution faible mais significative ($p<0,05$) du pouvoir antioxydant de la boisson reconstituée après atomisation par rapport au café au lait préparé extemporanément, alors que ni l'ajout extemporané de lait ni l'atomisation du café n'induisent de variation du PAO. De plus, on détecte moins d'acides phénoliques dans la poudre de café au lait atomisée que dans le café de départ (- 33 %), alors que l'atomisation du café seul ne fait pas diminuer de manière importante les quantités détectées. On peut supposer que le procédé d'atomisation favorise la formation d'interactions ACQ/protéines, à l'origine de la diminution de PAO constatée. Cependant, il est également possible que ce procédé induise la formation de nouveaux produits de la réaction de Maillard, bien que le chauffage lors du procédé d'atomisation ne soit pas particulièrement drastique. La première explication semble donc plus plausible et concorde de plus avec les résultats sur l'effet de la formation de complexes de nature covalente sur le pouvoir antioxydant de l'acide chlorogénique.

I.3.2. Rôle de l'acide chlorogénique dans le pouvoir antioxydant du café

La concentration d'ACQ dans les différents cafés ayant été déterminée, les proportions relatives du pouvoir antioxydant attribuables à l'acide chlorogénique du café ont pu être évaluées (figure 68). Pour tous les tests de mesure du pouvoir antioxydant, les dilutions ont été réalisées dans du tampon acétate de sodium 0,1 mol/L pH 5,5, ceci afin de se trouver dans des conditions de pH et de force ionique proches de celles rencontrées dans la boisson. Il est à noter que les résultats obtenus ne prennent pas en compte les éventuels phénomènes de synergie.

I.3.2.1. Evalué par le test DPPH

La proportion du pouvoir antiradicalaire du café due à l'acide chlorogénique est de 19 %. En présence de lait, cette proportion n'est plus que de 14 %, alors qu'aucune différence significative n'est observée pour le café au lait lorsque ce dernier est ajouté extemporanément (figure 68). On peut penser que ce résultat peut être la conséquence d'une complexation protéines/ACQ, qui serait masquée dans le café au lait par le pouvoir antioxydant dû à d'autres composés du café, comme les produits de la réaction de Maillard par exemple. On peut également supposer que la présence d'autres composés dans le café empêche l'interaction de se produire, ce qui fait que l'on n'observe pas de différence dans la boisson « café au lait » complète.

I.3.2.2. Evalué par le test AAPH

Si l'on se base sur le pouvoir antioxydant de l'ACQ dans le test AAPH, qui donne une valeur de 40 min/µM d'ACQ dans le milieu réactionnel (Peyrat-Maillard *et al.*, 2003), on peut calculer la part relative de l'ACQ dans le pouvoir antioxydant observé. Sachant que 1 mg de poudre de café contient 14,2 µg d'ACQ, soit 0,04 µmol, on peut calculer que la durée de protection offerte par cette quantité d'ACQ est de 1,6 min. Notre café présentant une valeur de 13,44 min/mg.L^{-1}, un simple rapport nous permet d'estimer que l'ACQ entre pour environ 12 % du pouvoir antioxydant total.

En traçant les graphiques représentant le temps en fonction de la concentration équivalente en café à la concentration d'ACQ ajoutée seule ou avec du lait dans le milieu réactionnel, on obtient les valeurs des pentes en équivalence café, ce qui permet de calculer le pourcentage de l'activité antioxydante totale apporté par l'ACQ. Avec ou sans lait, on trouve 13 ±1 % (figure 68), ce qui confirme le calcul théorique précédemment mené. L'ajout de lait ne semble pas avoir d'influence sur la proportion du PAO due à l'ACQ dans ce test. Cependant, la proportion trouvée dans les deux cas est inférieure à la valeur trouvée dans le test DPPH sans lait.

I.3.2.3.Evalué par le test TAC

La proportion du PAO due à l'ACQ dans le test TAC est du même ordre de grandeur que celles trouvées dans les deux autres tests, soit 15 %, et ne varie pas lorsqu'on ajoute du lait à la solution (figure 68).

Une seule publication à ce jour s'est intéressée à notre connaissance à la proportion du pouvoir antioxydant du café due à l'ACQ (Somoza et al., 2003) : par un test de peroxydation de l'acide linoléique, après séparation de différentes fractions du café par ultrafiltration, une part d'environ 10 % dans le PAO du café a pu être attribuée à l'ACQ, ce qui est proche de nos valeurs.

Les résultats obtenus dans notre étude laissent supposer qu'il se forme des interactions entre les protéines et d'autres composés responsables du pouvoir antioxydant dans le café au lait atomisé, comme par exemple les produits de la réaction de Maillard (PRM). En effet, si l'on se base sur une fixation d'au moins 33 % des acides phénoliques aux protéines (diminution constatée lors du dosage de l'ACQ dans le café au lait atomisé), la proportion théorique due à l'ACQ dans le test AAPH diminue de 4 %. Or la diminution globale de PAO observée est de 12 %, ce qui laisse supposer qu'il se produit d'autres phénomènes qu'uniquement une complexation des acides phénoliques pendant l'atomisation

en présence de lait. On peut supposer que les PRM se complexent avec les protéines du lait ou évoluent en des composés moins antioxydants, voire prooxydants.

I.3.3. Part relative des polyphénols et des produits de la réaction de Maillard dans l'activité antioxydante du café

Si le café vert contient 70 % d'ACQ de plus que les cafés torréfiés, la perte de PAO varie seulement de 15 % pour le café torréfié préparé à base de café en grains, et de 54 % pour le café torréfié soluble, ce qui laisse supposer qu'effectivement, des composés antioxydants sont générés lors de la torréfaction. Nous avons donc cherché à savoir dans quelle proportion ces composés, probablement des PRM, étaient impliqués dans le pouvoir antioxydant du café.

I.3.3.1. Séparation des molécules antioxydantes du café

Le spectre d'absorption de la solution de café Carte Noire présente un maximum à 287 nm et un épaulement à 325 nm (figure 69). Il est assez proche de celui d'une solution de PRM obtenue par incubation de glucose (0,8 mol/L) et de lysine (0,5 mol/L) pendant 92 heures à 103°C (figure 70b), suggérant que des PRM similaires sont probablement présents dans la solution de café.

Afin de déterminer le pourcentage du pouvoir antioxydant dû à chaque famille de composés, PRM ou polyphénols, nous avons réalisé une séparation en deux fractions sur colonne chromatographique Sephadex LH-20. Les trois expériences réalisées montrent une bonne répétabilité des spectres obtenus pour la fraction éluée par l'eau acidifiée (figure 70a). Cette première fraction présente un spectre similaire à celui de l'étalon de PRM.

En revanche, la fraction méthanolique (figure 71a) présente un spectre relativement différent : deux maxima, l'un à 293 nm et l'autre à 329 nm, sont observés. Les maxima d'absorbance de l'ACQ diffèrent légèrement selon le milieu dans lequel l'ACQ est solubilisé (figure 71b) : 324 nm dans l'eau à pH 3, 328 nm dans un mélange eau pH 3/méthanol 50 /50 (v/v) et 329 nm dans le méthanol. Le maximum d'absorption obtenu avec l'échantillon de café correspond bien au spectre de l'ACQ, mais le maximum observé dans la fraction méthanolique du café est plus marqué que celui observé sur le standard d'ACQ. Il semble donc que l'ACQ soit bien extrait dans la fraction méthanolique, mais soit mélangé à d'autres composés.

En effet, lorsque l'on étalonne la colonne LH-20 avec une solution d'ACQ à 710 mg/L dans du tampon acétate 0,1 mol/L pH 5,5, la fraction méthanolique obtenue présente la même déformation. Le dosage de l'ACQ à partir de la mesure de l'absorbance des solutions à 329 nm, établi à partir d'une gamme d'étalonnage, montre néanmoins que la majorité (99 %) de l'acide chlorogénique de départ se retrouve bien dans la fraction méthanolique.

Nous avons vérifié que cette modification du spectre de l'ACQ ne provenait pas d'un phénomène d'isomérisation sur la colonne LH-20 : en effet, le spectre de l'ACQ isomérisé sous forme *cis*, obtenu après 24 h sous U.V., ne présente qu'un seul maximum à 329 nm dans le méthanol et pas d'épaulement. En revanche, lorsque l'on étalonne la colonne avec de l'ACQ isomérisé, le spectre de la fraction méthanolique obtenue est identique à celui de l'acide chlorogénique. La fraction méthanolique contient donc probablement une majorité d'acide chlorogénique, sous une forme légèrement transformée, mais pas isomérisée. Il est également probable qu'une petite quantité de PRM soit présente dans cette fraction.

Par ailleurs, afin d'approcher la taille des composés impliqués dans le pouvoir antioxydant de la fraction PRM obtenue par LH-20, nous avons effectué des séparations de celle-ci par ultrafiltration. Les spectres obtenus pour le rétentat d'ultrafiltration ne sont pas là-encore très différents de celui de la fraction totale de PRM (figure 72), ce qui indique que la masse moléculaire des composés de la fraction PRM est en majorité supérieure à 3000 Da. Le spectre du filtrat obtenu présente alors un maximum à 260 nm, puis deux épaulements similaires à ceux observés sur les autres spectres (maximum à 287 nm et un épaulement à 325 nm).

I.3.3.2. Pouvoir antioxydant des fractions obtenues par séparation sur colonne Sephadex LH-20

I.3.3.2.1. Pouvoir antioxydant global des fractions

Le pouvoir antiradicalaire des deux fractions obtenues sur Sephadex LH-20 a été évalué : par les tests DPPH, AAPH et TAC pour la fraction HCl et par les tests DPPH et TAC pour la fraction méthanolique.

70 ± 4 % du pouvoir antioxydant du café sont ainsi expliqués par le PAO de la fraction HCl contenant les PRM (figure 73a), alors la fraction méthanolique (polyphénols) représente 39 ± 3 % du PAO du café selon le test DPPH. Il est intéressant de se rappeler que le PAO de l'ACQ seul n'expliquerait que 18 % du PAO du café ; par conséquent, le surcroît de PAO observé dans la fraction méthanolique pourrait être attribué aux autres composés phénoliques du café et en partie à la faible proportion de PRM probablement présente dans cette seconde fraction.

Les résultats obtenus par les tests AAPH (figure 73b) et TAC (figure 73c) sont quelque peu différents :

- le PAO de la fraction obtenue par élution acide est largement inférieur à celui obtenu par le test DPPH (47 ± 4 % dans le test AAPH et 49 ± 5 % dans le test TAC contre 70 ± 4 %). Ceci

semble indiquer que les mécanismes mis en jeu sont différents de ce que l'on évalue par la simple mesure d'un pouvoir antiradicalaire.

- les résultats obtenus pour la fraction phénolique sont tout à fait comparables à ces derniers, puisqu'elle représente 46 ±7 % du pouvoir antioxydant du café dans le test TAC.

- les proportions du PAO dues aux différentes fractions obtenues dans le test TAC sont légèrement modifiées par rapport au test DPPH : 49 % du PAO sont attribués à la fraction HCl, et 46 % à la fraction méthanolique (figure 73c). On remarque enfin qu'aucune synergie entre les fractions PRM et polyphénol n'est mise en évidence dans le test TAC.

I.3.3.2.2. Recherche de synergies entre l'ACQ et la fraction PRM

Si le test TAC n'a pas mis en évidence d'effets mélange entre les fractions HCl et méthanolique, on peut néanmoins rechercher l'existence de synergies éventuelles entre les PRM et l'ACQ dans le pouvoir antioxydant du café. Ceci a été réalisé en testant le pouvoir antioxydant, par les tests DPPH et AAPH, de mélanges fraction HCl/solutions d'ACQ aux concentrations rencontrées dans le café (710 mg/L).

Pour le mélange fraction HCl+ACQ (figure 74), on obtient avec le test DPPH un pouvoir antioxydant de 79 % du PAO du café total, au lieu des 88 % que l'on devrait obtenir en additionnant les PAO des deux protagonistes testés séparément. Cette différence n'est pas significative selon le test de Student, mais suggère plutôt l'existence d'antagonismes des deux catégories de composés. Le même mélange testé par le test AAPH montre un comportement similaire. L'ACQ et la fraction PRM n'interagiraient donc que très peu, il n'existerait pas de phénomène de synergie.

I.3.3.2.3. Séparation de la fraction PRM par ultrafiltration et pouvoir antioxydant des sous-fractions obtenues

La fraction PRM obtenue par Sephadex LH-20 a été traitée en ultrafiltration (seuils de coupure de 3000 ou de 5000Da). Le filtrat et le rétentat obtenus ont été dilués de façon à réaliser le test TAC dans les mêmes conditions que sur le café. On constate que le pourcentage du pouvoir antioxydant du café dû au rétentat d'ultrafiltration, est significativement plus important que celui de la fraction totale obtenue après séparation sur LH-20 (figure 75), alors que le filtrat présente un pouvoir antioxydant plus faible que la fraction d'origine, et ce quel que soit le seuil de coupure des membranes.

On constate en revanche, que lorsque l'on remélange les deux fractions, filtrat et rétentat, dans les proportions d'origine, le pourcentage obtenu est très comparable à celui de la fraction de départ. Le pouvoir antioxydant des composés de haute masse moléculaire serait donc plus important que celui des PRM de faible masse moléculaire, ce qui concorde avec la littérature

(Borrelli *et al.*, 2002 ; López-Galilea *et al.*, 2005 ; Nicoli *et al.*, 1997 ; Yen *et al.*, 2005), mais il existerait de forts phénomènes d'antagonismes entre les différentes molécules composant la fraction PRM.

Si le pouvoir antioxydant du café apparaît comme étant majoritairement dû aux produits de la réaction de Maillard, le pouvoir antioxydant apporté par les polyphénols représente cependant jusqu'à 40 % du pouvoir antioxydant total, environ 15% pouvant être attribués à l'ACQ.

D'autre part, si la formation de complexes à liaisons covalentes entre l'ACQ et les protéines du lait ou l'atomisation d'un mélange de café et de lait, induit bien un masquage du pouvoir antioxydant dû à cet acide phénolique, il semble en revanche que la formation d'interactions de nature réversible n'induise pas de tels effets dans le café au lait préparé extemporanément. Cependant, on peut penser qu'il se forme bien des interactions entre les protéines du lait et l'ACQ dans la boisson, mais que celles-ci ne sont pas à l'origine d'un masquage du pouvoir antioxydant. Il est donc nécessaire de procéder à une étude plus fine de ces interactions.

I.4. ETUDE DES INTERACTIONS ACIDE CHLOROGENIQUE/PROTEINES DANS LA MATRICE ALIMENTAIRE

Nous avons montré que l'ajout de lait ne semblait pas modifier de façon importante le pouvoir antioxydant du café. Toutefois, il est possible que des interactions réversibles se produisent dans le milieu mais n'aient pas d'influence sur le pouvoir antioxydant de la boisson. Si de telles interactions existent, leur impact sur la biodisponibilité des polyphénols du café peut sensiblement modifier les effets bénéfiques potentiels de la boisson pour l'organisme, une fois ingérée. Nous avons donc cherché à mettre en évidence ces interactions.

I.4.1. Etude des interactions par ultrafiltration

I.4.1.1. Validation de la méthode

Il existe peu de données concernant l'étude des interactions protéines/polyphénols par ultrafiltration. Il a donc été nécessaire de valider l'utilisation de cette méthode en reproduisant des données de la littérature obtenues par d'autres méthodes.

Nous avons donc répété les manipulations de Prigent *et al.* (2003), en utilisant l'ultrafiltration à la place de la dialyse à l'équilibre utilisée dans la publication. La régression linéaire trouvée avec notre méthode (figure 76) correspond exactement à celle mise en évidence par Prigent *et al.* (2003) : le nombre de molécules d'ACQ liées par molécule de SAB augmente de manière linéaire avec l'augmentation de la quantité relative d'ACQ par rapport à la SAB (à

concentration en SAB constante). L'équation de la courbe de tendance est $y = 0,2073x + 1,7422$ ($R^2 = 0,9922$), avec y le nombre de moles d'ACQ liées par mole de SAB et x le nombre de moles d'ACQ par mole de SAB présentes dans le milieu.

De plus, dans nos conditions de centrifugation, la répétabilité de la manipulation est bonne, puisque sur trois manipulations réalisées dans les mêmes conditions, le coefficient de variation sur le ratio d'ACQ ayant filtré est de 3 % en absence de SAB et de 1 % lorsqu'on ajoute de la SAB dans le milieu. L'ultrafiltration semble donc être une méthode applicable à l'étude du système café au lait.

I.4.1.2. Interactions dans les solutions de lait

Les interactions entre l'acide chlorogénique et les protéines du lait ont tout d'abord été étudiées, par ultrafiltration, de manière globale, en utilisant directement du lait écrémé ou demi-écrémé, ajouté de manière extemporanée à l'acide chlorogénique, dans les proportions rencontrées dans le café au lait expérimental à 50 g/L de poudre de café Carte Noire et 250 g/L de lait. Deux températures de préparation, 20°C (dissolution à froid comme dans les expérimentations animales) et 85°C (préparation filtrée), ont été testées dans le cas du lait demi-écrémé. Les concentrations et la nature des tampons ont été choisies de manière à être les plus proches possible de la force ionique des solutions de café au lait.

Les résultats sont présentés dans le tableau XXII. Environ 40 % de l'ACQ introduit semblent se lier aux protéines du lait, indépendamment du taux de matière grasse ; cependant, la répétabilité de la manipulation semble bien meilleure à 85°C qu'à 20°C (écarts-types de 1 % à 85°C et >10 % dans le cas des manipulations à 20°C), ce qui semble cohérent compte tenu du fait que le chauffage favorise les effets hydrophobes impliquées dans la formation des complexes réversibles protéines/polyphénols (Siebert *et al.*, 1996).

I.4.1.3. Interactions dans les solutions modèles

Des solutions modèles, contenant de l'acide chlorogénique et un mélange de caséines ou une solution de β-lactoglobuline, dans les proportions du café au lait utilisé dans notre étude, ont ensuite été traitées par ultrafiltration. Il semble que la majorité des interactions se produisent avec la fraction caséines du lait, la β-lactoglobuline ne jouant qu'un rôle négligeable, puisque dans les proportions du café au lait expérimental, aucune interaction n'a été détectée avec cette protéine, alors que dans le cas du mélange de caséines, on retrouve environ 40 % de formes liées (tableau XXII), ce qui correspond au pourcentage de liaison trouvé avec le lait. De la même manière que dans la solution de lait, l'écart-type est plus faible lorsque la solution est chauffée.

Afin de nous assurer de l'absence d'interactions entre la β-lactoglobuline et l'acide chlorogénique, nous avons réalisé un essai en utilisant un rapport ACQ/β-lactoglobuline égal à 3, au lieu du rapport trouvé dans le café expérimental, égal à 17 : on trouve dans ce cas 15 % d'acide chlorogénique lié. Dans le café expérimental, on ne voyait très probablement pas d'interaction à cause de la forte proportion d'ACQ dans le milieu, très supérieure à celle de la β-lactoglobuline. L'interaction existe donc certainement dans le café expérimental, mais la proportion d'ACQ non liée est telle que la fraction liée apparaît comme négligeable.

L'ultrafiltration permet donc d'obtenir rapidement des informations fiables quant à l'existence d'éventuelles interactions.

Cependant, l'information obtenue n'est que partielle, puisqu'elle n'indique ni la nature de l'interaction ni le nombre potentiel de sites de fixation. Des manipulations complémentaires devraient être réalisées afin d'obtenir ces informations, comme l'établissement de diagrammes de Scatchard.

Il se crée donc bien des interactions de nature réversible entre l'ACQ et les protéines du lait dans la boisson. La majorité de l'interaction aurait lieu avec les caséines, les protéines du lactosérum n'étant que faiblement impliquées, ce qui est très probablement dû au fait qu'elles sont présentes en concentrations faibles par comparaison avec les caséines. Ces interactions ne semblent pas avoir d'influence sur le pouvoir antioxydant de la matrice café au lait.

II. DEVENIR DE LA MATRICE CAFE AU LAIT APRES INGESTION

II.1. DIGESTION *IN VITRO* ET ULTRAFILTRATION

II.1.1. Problématique

Il a été montré qu'il existait des interactions entre les caséines du lait et l'acide chlorogénique, dues à des liaisons de faible énergie, dans nos solutions modélisant le café au lait. Cependant, lors de la digestion dans l'organisme, les protéines se trouvent décomposées en unités plus petites qui sont ensuite absorbées.

On peut donc se demander si les interactions formées dans la matrice alimentaire subsistent dans le tractus gastro-intestinal, si des associations acides phénoliques/peptides se maintiennent après décomposition de la protéine ou se forment avant absorption des acides phénoliques, ou si au contraire toutes les interactions sont annihilées par la digestion. Dans tous les cas, l'absorption des acides phénoliques et des protéines est susceptible d'être modifiée.

II.1.2. Elaboration des solutions modèles

Les solutions digérées *in vitro* devant être appliquées par la suite sur des cellules Caco-2, afin de simuler l'absorption de l'acide chlorogénique (voir chapitre suivant), il a été nécessaire de modifier les doses d'acide chlorogénique et de protéines dans les solutions modèles par rapport à celles contenues dans le café au lait, de façon à ne pas se retrouver en limite de sensibilité pour l'analyse des perméats cellulaires. Nous nous sommes donc basés sur des résultats publiés qui utilisaient des concentrations en acide chlorogénique de 5 mmol/L (Konishi et Kobayashi, 2004). Les concentrations utilisées au départ ont donc été calculées afin d'être égales à 5 mmol/L, avant passage sur les cellules, par le simple jeu des dilutions successives appliquées dans le protocole de digestion *in vitro*.

Dans les solutions de café au lait expérimentales à 25 % de lait, les concentrations étaient de 710,5 mg/L, soit 2 mmol/L d'acide chlorogénique, de 408,7 mg/L de β-lactoglobuline, ou de 6,625 g/L de caséines, ou encore de 250 g/L de lait. Pour les solutions modèles à digérer, nous avons réalisé des proportions et appliqué les facteurs de dilutions successifs du protocole, afin d'obtenir des solutions dans les mêmes rapports que dans le café expérimental. On obtient deux solutions modèles de départ : ACQ / β-lactoglobuline : 2,741 g/L (7,73 mmol/L) / 1,020 g/L, ACQ / Caséines : 2,741 g/L / 25,5 g/L. Un témoin d'ACQ seul (7,73 mmol/L), *i.e.* en solution dans le même tampon sans protéine, a été réalisé.

Afin de montrer une éventuelle interférence dans l'absorption de l'acide chlorogénique due à la présence de produits de la réaction de Maillard dans le café, nous avons également appliqué aux cellules Caco-2 un système modèle en contenant. Ce modèle a subi les mêmes étapes de digestion *in vitro* que les autres mais les interactions lors de la digestion n'ont pas pu être analysées par ultrafiltration, à cause des interférences dans la mesure par spectrophotométrie dues à des PRM de faible masse moléculaire qui traversent également la membrane.

II.1.3. Elaboration du protocole de digestion *in vitro*

Le protocole de digestion *in vitro* a été établi à partir des travaux de Glahn *et al.* (1996), des résultats du D.E.A. de Géraldine Leforestier effectué au sein du laboratoire, ainsi que de quelques données trouvées dans d'autres publications (Ekmekcioglu, 2002 ; Gil-Izquierdo *et al.*, 2002b ; Rubio et Seiquer, 2002). Les conditions expérimentales mises en place tendent à mimer les conditions de digestion humaine.

Dans notre système, les conditions de pH retenues sont relativement peu éloignées de ces données : le pH de la partie gastrique a été fixé à 2,0, et celui de la partie intestinale à 6,0. La littérature indique un pH gastrique de 1,5 à jeûn, qui varie entre 5 et 1,5 lors de la période postprandiale, et un pH variant de 5,5 à 7,7 dans l'intestin.

En revanche, les durées des différentes phases sont plus faibles (une heure pour la digestion gastrique et deux heures pour la digestion intestinale), mais le protocole de Glahn, adapté pour la digestion de caséines, et assez peu différent de celui proposé par Gil-Izquierdo pour la digestion d'un liquide contenant des polyphénols, le jus d'orange, a été validé par comparaison avec la digestion de la même solution chez l'homme. Les durées sont donc plus faibles qu'une digestion réelle, mais permettent d'obtenir le même résultat.

Les quantités d'enzymes utilisées sont moindres que dans la réalité chez l'homme, mais il apparaît qu'elles sont largement suffisantes pour « digérer » de telles solutions. De plus, un excès d'enzyme provoquerait le décollement des cellules Caco-2 (Rubio et Seiquer, 2002).

Une fois le protocole de digestion retenu, la dégradation de l'acide chlorogénique au cours de celui-ci a été évaluée en mesurant l'absorbance de la solution initiale à 324 nm, et de la solution après chaque étape (digestion gastrique, intestinale, inactivation des enzymes), et des digestats en présence et en absence d'enzyme, dilués au $1/100^{e}$ dans du tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7. Après avoir tenu compte des facteurs de dilution induits par les prélèvements et les ajustements de pH au cours du protocole, il apparaît que la dégradation de l'acide chlorogénique dans nos conditions de digestion est quasi-nulle, puisque l'on retrouve 99 % de la quantité initialement introduite en sortie de digestion.

II.1.3.1.1. Résultats des digestions *in vitro*

Nous avons donc appliqué une simulation des étapes de digestion gastrique et intestinale, en système statique, à nos systèmes modèles de café et café au lait, puis déterminé par ultrafiltration le pourcentage d'acide chlorogénique lié dans le milieu après chaque étape de la digestion.

Afin d'améliorer la précision de la méthode, les ratios d'acide chlorogénique se liant aux enzymes digestives ont été préalablement évaluées. Elles sont de 12 % au niveau gastrique et de 10 % au niveau intestinal. Ces quantités liées ont été retranchées aux résultats présentés dans le tableau XXII.

II.1.3.2. Digestion du mélange acide chlorogénique / lait écrémé

La matière grasse du lait provoquant le décollement des cellules Caco-2, nous avons décidé d'utiliser exclusivement du lait écrémé. Il n'a néanmoins pas été possible d'appliquer les digestats obtenus sur les cellules Caco-2. Toutefois, la digestion *in vitro* a tout de même été menée dans ces conditions.

Après digestion gastrique, le ratio d'ACQ lié dans le milieu contenant du lait écrémé diminue de 39 ± 10 % à 21 ± 2 % (tableau XXIII). De même, la digestion intestinale fait encore diminuer ce ratio jusqu'à 17 ± 2 %. On peut donc penser au vu de ces résultats que les conditions de pH et la décomposition des protéines par les enzymes digestives entraînent la dissociation partielle des interactions formées dans la matrice alimentaire.

En effet, on constate que si le ratio d'acide chlorogénique lié diminue lors de la digestion, il ne devient pas nul. Il aurait donc été intéressant de mener en parallèle un dosage des peptides libérés au cours de la digestion, afin de déterminer si le ratio d'ACQ lié influait sur la façon dont les protéines sont décomposées par le processus de digestion.

II.1.3.3. Digestion des mélanges acide chlorogénique / protéines laitières

Nous avons également tenté de comprendre par digestion *in vitro* couplée à de l'ultrafiltration, le devenir des interactions acide chlorogénique/protéines laitières dans le tractus gastro-intestinal.

La β-lactoglobuline a été choisie comme modèle pour le suivi du devenir des interactions de l'acide chlorogénique avec les protéines du lactosérum. En effet, le devenir des protéines du lactosérum dans le système digestif est connu : l'action de la pepsine sur l'α-lactalbumine produit 9 peptides et celle de la trypsine 12 peptides différents (mais dans ce dernier cas, un chauffage à une température supérieure à 85°C est nécessaire pour la rendre sensible à l'action de cette enzyme (Chobert, 1995)) ; quant à la β-lactoglobuline, si l'étape gastrique la

laisse inchangée (conservation de structure et de solubilité, sauf en cas de chauffage préalable à T>80°C), elle est en revanche facilement hydrolysée au niveau intestinal par la trypsine et la chymotrypsine, en 17 et 10 peptides respectivement, et par conséquent facilement absorbée puisque 66 % sont absorbés au niveau de l'intestin en moins de deux heures (Jouan, 2002). Sa décomposition limitée lors de l'étape gastrique et sa bonne absorption intestinale en font par conséquent un modèle intéressant.

Les résultats expérimentaux suggèrent qu'il n'y a pas vraiment d'interactions qui se forment entre l'acide chlorogénique et la β-lactoglobuline au niveau gastrique puisque, après soustraction de la part de l'acide chlorogénique liée aux enzymes digestives, il reste environ 5 ± 5 % d'acide chlorogénique « lié » à la protéine (tableau XXIII). Il en est de même au niveau intestinal, niveau auquel la protéine est, selon la littérature, hydrolysée. La structure tridimensionnelle pourrait donc être indispensable à la formation et au maintien des interactions dans le cas de la β-lactoglobuline.

Les résultats obtenus avec la caséine sont très différents. On peut tout d'abord constater que les écart-types sont très élevés. Ceci est dû au fait que les caséines précipitant au pH gastrique, l'homogénéisation et les prélèvements dans le système étaient nettement plus délicats. De manière étonnante, ce problème ne s'est pas produit lors de la digestion du système contenant du lait, suggérant la présence de facteurs stabilisants dans la solution, que nous ne reproduisons pas dans le système modèle de caséines. Selon la littérature, la caséine est hydrolysée dès l'estomac et environ 63 % de la protéine d'origine sont absorbés après hydrolyse (Jouan, 2002). Cette hydrolyse rapide peut également être à l'origine de la faible répétabilité des manipulations de digestion de cette protéine. Néanmoins, les résultats du tableau XXIII montrent que le ratio d'acide chlorogénique lié diminue au fil de la digestion, mais ne devient pas nul, comme dans le cas du lait.

II.2. ABSORPTION SUR CELLULES CACO-2

Afin de simuler l'absorption de l'acide chlorogénique en présence de protéines, nous avons choisi d'utiliser la lignée cellulaire Caco-2. Ces cellules proviennent d'une lignée établie en 1974 par Jorgen Fogh et issue d'un adénocarcinome colique relativement bien différencié, provenant d'un patient âgé de 72 ans. Elles se développent en monocouche et possèdent la faculté de se différencier spontanément à confluence, à partir du sixième jour de culture, en entérocytes bipolaires typiques. Elles présentent alors à leur surface de nombreuses villosités constitutives de la membrane de la bordure en brosse, ainsi que d'autres de leurs caractéristiques, telles que les jonctions étanches, certaines enzymes de la bordure en brosse et des transporteurs spécifiques de l'intestin. Ces cellules cancéreuses ne possèdent pas toutes

les propriétés d'un entérocyte adulte, mais sont très proches des cellules du côlon fœtal. Elles constituent donc un bon modèle pour les études de biodisponibilité. Ce modèle a d'ailleurs été utilisé pour simuler l'absorption de l'acide chlorogénique seul par Konishi et Kobayashi (2004), dont nous avons repris les conditions, en y ajoutant l'étape préalable de digestion *in vitro*.

En utilisant ce modèle, nous constatons que la quantité finale d'acide chlorogénique retrouvée dans le perméat représente 0,14 ± 0,04 % de la quantité initialement déposée sur les cellules (figure 77a). Cette valeur est comparable aux données trouvées par Konishi et Kobayashi (2004), qui obtenaient 0,06 ± 0,01 % et 0,12 ± 0,02 % de la quantité initialement déposée, respectivement en présence et en absence de gradient de concentration entre la phase apicale et la phase basolatérale. La perméation de l'acide chlorogénique sur les cellules intestinales est donc extrêmement faible.

Lorsque la même expérience est menée en présence de protéines laitières (β-lactoglobuline et caséines), les cinétiques d'absorption se trouvent légèrement modifiées (figures 77c et 77d), sans que l'on voit toutefois de différence significative avec le témoin d'acide chlorogénique déposé seul (test de la plus petite différence significative). Le pourcentage de la quantité initiale finalement absorbé est de 0,09 ± 0,03 % en présence de β-lactoglobuline et de 0,25 ± 0,09 % en présence de caséines. La présence de protéines laitières digérées dans le milieu n'altère pas l'absorption de l'ACQ de manière significative, laissant supposer que les complexes précédemment évoqués sont dissociés dans le tractus gastro-intestinal.

En revanche, lorsque des produits de la réaction de Maillard sont ajoutés dans le milieu avant digestion *in vitro*, l'absorption de l'ACQ est significativement ralentie (figure 77b), et la quantité d'ACQ finale dans le perméat est significativement inférieure à la quantité retrouvée dans le témoin (pourcentage de la quantité initiale finalement absorbé : 0,05 ± 0,03 %). Ces résultats suggèrent que l'absorption de l'ACQ dans une matrice de café est moins bonne que lorsque le composé est ingéré pur. Il faudrait approfondir cette étude en utilisant des PRM de différentes natures (produits intermédiaires obtenus lors des différentes étapes de la réaction de Maillard, en faisant varier la durée d'exposition à la chaleur), isolés ou non du café par chromatographie sur colonne Sephadex LH-20.

La méthode de simulation de l'absorption intestinale sur cellules Caco-2 a l'avantage de donner des résultats rapides. Cependant, elle ne permet pas d'étudier la totalité des acides phénoliques contenus dans le café (puisqu'ils n'existent pas en standards commerciaux), et néglige l'action éventuelle d'estérases pouvant être présentes *in vivo* dans la muqueuse intestinale et entraînant l'hydrolyse de l'ACQ en acide caféique avant absorption (Konishi et

Kobayashi, 2004). De plus, elle néglige l'étape colique, et les éventuels phénomènes d'adaptation pouvant survenir lors d'une consommation chronique. Il était donc nécessaire de compléter ces données par une étude en modèle animal.

In vitro, on met en évidence une diminution progressive du ratio d'acide chlorogénique lié au fil de la digestion. Les quantités absorbées sont faibles et ne sont pas modifiées par la présence de protéines laitières dans le milieu de départ, alors que la présence de produits de la réaction de Maillard fait significativement diminuer l'absorption.

II.3. DETERMINATION DE LA BIODISPONIBILITE DES ANTIOXYDANTS DU CAFE PAR UNE ETUDE *IN VIVO* SUR MODELE ANIMAL

II.3.1. Evolutions pondérales des animaux et efficacité alimentaire des régimes contenant du café

5 groupes de 6 rats, nourris avec un régime P14 standard, ont été constitués : un groupe témoin buvant de l'eau sucrée (« témoin »), un groupe consommant du café (« C »), un groupe consommant du café au lait (« $CL_{1/2}$ »), un groupe consommant du café atomisé (« C_a ») et un groupe consommant du café au lait atomisé (« $CL_{1/2a}$ »), chaque jour entre 9 et 10 heures.

L'évolution pondérale des cinq groupes d'animaux est identique au cours de l'expérimentation et leurs moyennes pondérales ne présentent aucune différence significative ($p > 0,05$). De même, nous avons prélevé et pesé différents organes susceptibles de présenter des hypertrophies suite à la consommation de polyphénols (Scalbert et Williamson, 2000). Rapporté à la masse de l'animal, aucun des organes pesés ne montre d'hypertrophie (tableau XXIV).

Si la prise alimentaire de P14 n'est pas significativement différente d'un groupe à l'autre, la consommation moyenne en boisson, sur la période comprise entre 9 h et 10 h, est en revanche différente pour les groupes du fait de la faible acceptabilité du goût café par les animaux (Tableau XXV).

Des variations de consommation sont de plus observables d'un rat à l'autre au sein d'un même groupe, au cours des trois semaines. Les résultats obtenus, que ce soit pour le statut antioxydant ou les concentrations plasmatiques en antioxydants phénoliques, ont donc été exprimés en tenant compte de ces différences de consommation.

Nous avons également calculé le coefficient d'efficacité alimentaire apparent (tableau XXVI) de l'ensemble des régimes sur les deux dernières semaines de régime, lorsque la prise alimentaire des animaux avait atteint un rythme stable.

Malgré les légères différences de composition des régimes consommés (présence de lait ou non), on n'observe pas de différence significative entre les groupes de rats. L'ajout de lait dans le régime café ne modifie donc pas l'efficacité alimentaire totale du régime.

II.3.2. Evaluation de paramètres sanguins

La littérature montre l'existence de modifications de certains paramètres sanguins (cholestérol, triglycérides) suite à la consommation chronique de café (tableau XXVII).

Ces résultats sont souvent contradictoires, mais imputables aux acides phénoliques contenus dans le café, car des effets sont observés aussi bien avec de l'acide chlorogénique en solution qu'avec du café, contenant de la caféine ou non. Dans la majorité des études utilisant du café, les effets constatés ne sont pas imputables à la caféine, les auteurs ayant travaillé avec du café décaféiné ou des acides phénoliques purs.

Ces paramètres sanguins étant dosables en routine au laboratoire, nous les avons donc mesurés, de façon à déterminer de manière indirecte si l'ajout de lait avait des effets sur les quantités d'acides phénoliques retrouvées dans l'organisme. Nous n'avons pas mis en évidence de différence par rapport au témoin dans la quantité de triglycérides ou de cholestérol plasmatique total. En revanche, la concentration en HDL Cholestérol est significativement supérieure dans le plasma des rats ayant consommé du café, quelle que soit la nature de la préparation (tableau XXVIII), mais l'augmentation est du même ordre de grandeur dans tous les groupes.

Néanmoins, ce résultat montre tout de même un effet positif du café sur la santé. En effet, le HDL cholestérol permet de réguler le taux de cholestérol dans l'organisme. Il a donc une fonction protectrice, d'épuration.

II.3.3. Evaluation du pouvoir antioxydant des plasmas

II.3.3.1. Détermination du statut antioxydant plasmatique des animaux après consommation des régimes expérimentaux, sans hydrolyse enzymatique

La mise au point du test a été réalisée par Claire Ordonaud au sein du laboratoire, dans le cadre de son stage de DEA. Le pouvoir antioxydant des différentes solutions de café a été déterminé selon un protocole adapté d'un test mesurant la Capacité Antioxydante Totale (TAC) (Kampa *et al.*, 2002 ; Lussignoli *et al.*, 1999). Ce test repose sur la capacité que possède une solution antioxydante à ralentir l'oxydation d'un substrat caroténoïde, la crocine, en milieu tamponné, à 37°C. L'AAPH génère des radicaux libres qui oxydent la crocine. Celle-ci subit alors une décoloration, ce qui se traduit par une perte d'absorbance à sa longueur d'onde d'absorbance maximale. En présence de molécules antioxydantes (AOH), les

formes radicalaires issues de l'oxydation de l'AAPH sont réduites sous forme AzOH et AzOOH, limitant ainsi l'oxydation de la crocine et ralentissant sa décoloration.

Le pouvoir antioxydant mesuré dans le plasma des rats du groupe témoin n'est pas nul (figure 78), ce qui traduit l'existence d'un statut antioxydant plasmatique basal. Ce dernier peut être dû à des molécules naturellement présentes dans le plasma, comme l'albumine (Tubaro *et al.*, 1998), le glutathion, la bilirubine, l'acide urique (Lussignoli *et al.*, 1999) ou l'acide ascorbique (Prior et Cao, 1999). Cependant, toutes ces molécules ne réagissent pas dans le test TAC. Par exemple, les substances liposolubles ne peuvent pas être testées (Lussignoli *et al.*, 1999). Le rôle de l'acide urique, l'un des composés majoritaires du plasma, dans la valeur du statut antioxydant plasmatique donnée par le test TAC, est controversé. Il représenterait jusqu'à deux tiers de la valeur du TAC selon certains auteurs (Kampa *et al.*, 2002 ; Lussignoli *et al.*, 1999), ou au contraire ne réagirait pas dans ce test (Natella *et al.*, 2002). Enfin, l'héparine ajoutée pour empêcher la coagulation du sang lors du prélèvement, peut induire une légère réaction (Lussignoli *et al.*, 1999), qui se compense par le fait que tous les rats ont été traités avec la même quantité d'héparine.

Le statut antioxydant des plasmas de rats ayant consommé les régimes expérimentaux a ensuite été déterminé. Une fois les résultats rapportés à la masse de nourriture consommée par chaque rat, nous remarquons que l'ingestion de café permet d'améliorer significativement le statut antioxydant plasmatique ($p < 0,05$) (figure 78). Cette augmentation peut être due soit à la présence dans le plasma d'acides phénoliques du café, absorbés et éventuellement métabolisés ou modifiés par la microflore, soit à la présence de molécules antioxydantes dont l'apparition pourrait être induite par la consommation chronique de café. Il a notamment été montré que la consommation de café faisait augmenter la teneur en acide urique plasmatique postprandiale, mais les mêmes auteurs suggèrent que cette molécule ne peut être responsable de l'augmentation que nous observons, car elle ne réagit pas dans le test utilisé (Natella *et al.*, 2002).

L'ajout extemporané de lait au café ou le procédé d'atomisation, en présence ou non de lait, n'entraîne aucune variation du statut antioxydant (figure 78). Le comportement du café est donc différent de celui observé pour le thé. En effet, Serafini *et al.* (1996) ont montré que la consommation de thé en présence de lait entraînait une annulation de l'amélioration du statut antioxydant plasmatique apporté par le thé vert ou noir. Ce résultat conforte en revanche ceux obtenus par d'autres équipes utilisant d'autres tests (Hollman *et al.*, 2000 ; Van Het Hof *et al.*, 1998), qui n'observent aucune diminution des teneurs en (+)-catéchine et en quercétine dans le plasma lorsque ces flavonoïdes du thé sont consommés en présence de lait. Il rejoint

également les observations réalisées lors des expériences d'absorption sur cellules Caco-2, montrant que la présence de protéines, ajoutées de manière extemporanée, dans le milieu digestif et dans les proportions de nos régimes expérimentaux, n'influe pas sur l'absorption de l'ACQ.

Les écart-types importants obtenus dans le cas de la détermination du statut antioxydant des rats ayant consommé le régime « café au lait atomisé » suggèrent cependant une forte variabilité interindividuelle dans l'absorption des composés antioxydants de ce régime, qui pourrait être due à l'existence de complexes à liaison covalente dans cette boisson, dont la décomposition serait plus délicate lors de la digestion. Il serait intéressant de mener une expérience complémentaire d'absorption sur les cellules Caco-2, en utilisant des complexes à liaison covalente. Cependant, les conditions de pH (pH = 9) utilisées lors de la synthèse et de la conservation de tels complexes n'étant pas compatibles avec les conditions d'utilisation des cellules (il n'est pas certain que la structure chimique du complexe ne soit pas modifiée si on le place dans les conditions de pH d'utilisation des cellules), et la réalisation de l'atomisation d'une solution d'acide chlorogénique en présence de protéines étant trop coûteuse (quantités d'aide chlorogénique purifié nécessaires trop importantes), nous n'avons pas pu réaliser ces expérimentations.

Il a cependant pu être montré, par digestion enzymatique *in vitro* (trypsine, pancréatine, pepsine) de complexes covalents ACQ/ β-lactoglobuline formés à pH 9, que la digestibilité de la protéine était significativement diminuée par la complexation (Petzke *et al.*, 2005), ce qui suggère qu'une partie de l'acide chlorogénique a pu être absorbée sous forme légèrement modifiée suite à la décomposition des protéines, ce qui expliquerait la variabilité du résultat obtenu par le test TAC.

II.3.3.2. Statut antioxydant plasmatique des animaux après consommation de café ou de café au lait, après hydrolyse enzymatique

Le PAO du plasma, mesuré par le test TAC, s'il est effectivement dû à l'acide chlorogénique absorbé, est sous-estimé, et ce pour deux raisons.

D'une part, lors de la mise au point de la méthode, le pouvoir antioxydant de l'acide chlorogénique ajouté à du plasma témoin a été déterminé, puis comparé à celui de l'acide chlorogénique seul. On observe une diminution significative du taux d'inhibition de l'acide chlorogénique en présence de plasma. Ainsi, l'acide chlorogénique se lierait aux protéines plasmatiques (Kang *et al.*, 2004), induisant une diminution de l'activité antioxydante de ce composé dans le test TAC. Ce problème est rencontré avec de nombreux polyphénols, dont l'effet est suivi de cette manière, comme par exemple la quercétine (Arts *et al.*, 2001d ; Rohn

et al., 2004). Cette sous-estimation permet cependant de montrer une différence significative avec le groupe n'ayant pas consommé de café.

D'autre part, les polyphénols sont majoritairement présents dans le plasma sous forme métabolisée (Rondini *et al.*, 2003 ; Scalbert et Williamson, 2000). Or, ces formes métabolisées, dont le pouvoir antioxydant est moindre, du fait du masquage de leurs fonctions phénoliques par des groupements sulfatés ou méthylés notamment (Rondini, 2002), peuvent éventuellement être déconjuguées lorsqu'elles atteignent leur tissu cible, ce qui a été observé dans le cas de l'acide férulique sulfaté avec le test AAPH et le test KRL (Rondini *et al.*, 2004). Il peut donc être intéressant de réaliser une hydrolyse enzymatique des plasmas avant de leur appliquer le test TAC, ceci afin d'évaluer le potentiel antioxydant réel du plasma.

Une hydrolyse enzymatique des formes sulfatées et glucuronidées a donc été réalisée, uniquement sur les plasmas du groupe « café au lait », par un mélange enzymatique sulfatase/β-glucuronidase.

L'étape d'hydrolyse enzymatique du plasma nécessite de travailler en milieu tamponné, en présence d'enzymes qui gênent la réalisation du test TAC. Il est donc nécessaire d'ajouter une étape de purification, qui a pour objectif de précipiter les protéines, dont les enzymes, afin de permettre l'analyse par le test TAC de l'échantillon. Afin de vérifier l'influence éventuelle de ce traitement sur le statut antioxydant plasmatique, une analyse a tout d'abord été réalisée en absence d'enzymes. On observe alors une perte importante du statut antioxydant plasmatique, variable d'un plasma à l'autre (figure 79). Il est donc probable que l'étape de précipitation des protéines conduise également à une perte des antioxydants phénoliques qui pourraient être associés à celles-ci.

Si ces valeurs ne représentent donc pas parfaitement le statut antioxydant des plasmas, elles peuvent néanmoins être comparées avec celles obtenues pour les plasmas hydrolysés par le mélange sulfatase/β-glucuronidase (figure 79), en tenant compte des taux de récupération en acide chlorogénique obtenus par cette méthode d'extraction. Il apparaît alors une augmentation significative du statut antioxydant plasmatique, variant de 10 à 50 %, pour les plasmas du groupe « café au lait », lors d'une hydrolyse enzymatique. Ceci indique donc bien une sous-évaluation possible du pouvoir antioxydant plasmatique lorsque l'on ne tient pas compte des formes métabolisées dans le plasma, comme cela avait déjà été proposé (Rondini, 2002).

Si une analyse directe des plasmas au test TAC permet d'accéder à une évaluation et une comparaison du statut antioxydant plasmatique entre les différents groupes de rats ayant ingéré une alimentation variable, elle doit être affinée par une analyse plus lourde mettant en

oeuvre une étape d'hydrolyse enzymatique des formes métabolisées retrouvées dans les plasmas.

II.3.4. Détermination des teneurs plasmatiques en antioxydants phénoliques

Si la biodisponibilité des composés phénoliques apportés aux rats *via* leur alimentation est en partie approchée par la mesure du statut antioxydant plasmatique et des paramètres sanguins, elle ne peut réellement être déterminée qu'après dosage des molécules antioxydantes dans le plasma.

La mise en place des méthodes d'extraction et de dosage des antioxydants phénoliques a fait l'objet d'une collaboration au sein du laboratoire avec Claire Ordonaud (DEA, 2004). Le café consommé par les rats étant essentiellement source d'acides hydroxycinnamiques, nous nous sommes focalisés sur le développement d'une méthode de séparation et de dosage des acides chlorogénique, caféique et férulique, ainsi que de leurs métabolites. Pour cela, nous avons exploité les données de la littérature concernant la biodisponibilité de ces molécules.

II.3.4.1. La biodisponibilité de l'acide chlorogénique : données de la littérature

Un certain nombre de publications présentent des données sur la biodisponibilité de l'acide chlorogénique. Cependant, elles concernent majoritairement son excrétion urinaire (tableau XXIX), et de fait, l'absorption de l'acide chlorogénique sous sa forme native est encore controversée. En effet, certains auteurs retrouvent 0,86 % de l'acide chlorogénique ingéré intact dans les urines de rats (Gonthier *et al.*, 2003b) ou encore 0,2 % à 0,46 % chez le sujet iléostomisé (Olthof *et al.*, 2001 ; Olthof *et al.*, 2003) et 1,7 % chez l'homme (Olthof *et al.*, 2003), alors que d'autres n'en retrouvent pas (Bitsch *et al.*, 2001 ; Bourne et Rice-Evans, 1998a ; Bourne et Rice-Evans, 1998b ; Choudhury *et al.*, 1999 ; Rechner *et al.*, 2001) ou retrouvent uniquement des formes hydrolysées et métabolisées (Wittemer *et al.*, 2005). Par ailleurs, pour d'autres auteurs (Gonthier *et al.*, 2003a ; Olthof *et al.*, 2003), respectivement 36 % et 50 % de la dose ingérée sont retrouvés sous forme de métabolites d'origine microbienne (acide hippurique et acide 3-hydroxyphénylpropionique en majorité, provenant également de l'acide quinique).

L'incubation d'acide chlorogénique avec un extrait de flore fécale provoque une disparition de ce composé au profit de l'acide caféique (Plumb *et al.*, 1999). A l'inverse, lorsque de l'acide chlorogénique est incubé avec des prélèvements de foie, d'intestin ou du plasma humain, aucune hydrolyse n'est observée. Les auteurs de cette étude en concluent que seule la flore fécale contient une estérase capable d'hydrolyser les esters d'acide quinique. L'ensemble de ces résultats a permis de proposer une voie de métabolisation des acides hydroxycinnamiques (figure 80).

Dans la majorité des publications, il apparaît donc comme acquis que la grande majorité de l'acide chlorogénique ingéré est hydrolysée et métabolisée après ingestion, tandis qu'une faible partie serait absorbée telle quelle, mais les mécanismes d'absorption et les acteurs de cette dégradation demeurent incertains.

Cependant, l'absorption de l'acide chlorogénique a été confirmée de manière indirecte sur des patients iléostomisés (Olthof *et al.*, 2001). Ces sujets, dépourvus d'iléon et de gros intestin, n'ont pas de flore intestinale et sont incapables d'hydrolyser l'acide chlorogénique. Pour calculer le taux de passage à travers la membrane intestinale, les auteurs procèdent par différence : la quantité d'acide chlorogénique absorbée est égale à la quantité ingérée par les sujets à laquelle on soustrait la quantité dosée dans le fluide iléostomique. De cette manière, les auteurs estiment à 33 ± 14 % l'acide chlorogénique absorbé. La même expérience réalisée avec de l'acide caféique donne une absorption de 95 ± 4 %. L'estérification de l'acide caféique n'empêcherait donc pas son absorption au niveau de la barrière intestinale mais la réduirait d'un facteur 3 environ. Pour ces mêmes auteurs, l'absorption intestinale de l'acide chlorogénique ne représenterait qu'un tiers de son absorption totale, le reste étant absorbé au niveau du côlon après dégradation (Olthof *et al.*, 2003).

L'analyse de la concentration plasmatique apparaît donc comme une donnée manquante capitale, et pourtant très peu d'études s'y intéressent, en particulier à cause de la difficulté à mettre au point une méthode d'analyse fiable pour cet acide phénolique. En effet, l'acide chlorogénique est facilement hydrolysé par l'activité estérase résiduelle trouvée dans la plupart des préparations enzymatiques commerciales utilisées pour l'analyse des formes métabolisées, et précipite de plus facilement avec les protéines, ce qui en fait une molécule difficile à analyser, contrairement aux formes non estérifiées, d'autant plus qu'elle est présente en faible concentration dans le plasma. La méthode que nous avons mise au point au laboratoire, minimise la quantité d'enzymes et utilise des vitesses de centrifugation élevées, ce qui permet d'obtenir des taux de récupération dans le plasma meilleurs que dans la plupart des publications.

II.3.4.2. Mise au point de la méthode d'analyse

Les potentiels de travail et la phase mobile utilisés lors de l'analyse des cafés par CLHP/DEC n'ont pas pu être conservés pour ces analyses, car un composé provenant du plasma, probablement de nature protéique, possédait un temps de rétention très proche de celui de l'acide chlorogénique, et se trouvait en concentration suffisante pour gêner l'analyse, et ce quelles que soient les modifications de proportions des solvants ou de potentiel des électrodes appliquées (figure 81, pic n°2).

Une phase mobile plus adaptée à l'analyse des plasmas a donc été recherchée, et les potentiels de travail des électrodes optimisés. Un mélange eau / méthanol / acide acétique 88/10/2 (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium a ainsi été retenu. L'acétate de lithium couplé à l'acide acétique permet une meilleure résolution des pics aux temps longs que la phase mobile utilisée pour l'analyse des cafés. En effet, la modification des proportions de solvants dans la phase mobile, à dessein de séparer l'acide chlorogénique du pic plasmatique parasite, induit également une augmentation considérable des temps de rétention des acides hydroxycinnamiques sortant le plus tardivement, ce qui a en général pour effet un étalement des pics sur les chromatogrammes. Dans les conditions chromatographiques retenues, les temps de rétention de l'acide *trans*-chlorogénique, de l'acide *trans*-caféique et de l'acide *trans*-férulique sont respectivement de 23, 38 et 121 minutes (figure 82).

Afin de déterminer le potentiel de travail optimal des deux électrodes, qui permet de suivre les acides hydroxycinnamiques retrouvés dans le plasma, sans interférence avec les autres constituants naturellement présents dans celui-ci, les voltamogrammes d'un plasma témoin et d'un mélange d'acides chlorogénique, caféique et férulique, ainsi que d'un plasma témoin extrait, dissous dans la phase mobile utilisée en CLHP, ont été réalisés.

Le potentiel de E1 a été fixé à 300 mV (sensibilité de 1 µA), celui de E2 variant entre 300 et 1000 mV (sensibilité de 1 µA). Les résultats, présentés sur la figure 83, justifient le choix des potentiels : E1 = 300 mV (1 µA), E2 = 400 mV (1 µA). En effet, à ces potentiels, la réponse des acides phénoliques recherchés est suffisante pour permettre l'analyse, tandis que le pic parasite provenant du plasma répond de manière suffisamment faible pour ne plus gêner : le composé issu du plasma n'est que très faiblement oxydé entre 300 et 400 mV, puis donne une réponse électrochimique beaucoup plus forte au-delà de 400 mV pour atteindre un plateau à 600 mV. En revanche, les acides chlorogénique, caféique et férulique présentent un signal constant entre 400 et 800 mV. Afin de limiter les interférences entre ces acides hydroxycinnamiques et le plasma témoin, le potentiel de E2 a donc été fixé à 400 mV.

II.3.4.3. Dosage des acides hydroxycinnamiques plasmatiques

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les acides hydroxycinnamiques peuvent se trouver dans le plasma soit sous forme native, soit sous forme métabolisée, principalement sulfatée, glucuronidée ou sulfo-glucuronidée. Chez le rat, les formes glucuronidées sont majoritaires et représentent 41 % des métabolites plasmatiques après ingestion d'acide caféique (Azuma *et al.*, 2000). Ce composé est également sulfoglucuronidé (~20 %) et la forme native (aglycone) est minoritaire. Il en va de même pour l'acide férulique dont 58 % sont sous forme sulfatée ou sulfo-glucuronidée, 24 % sous forme libre et 18 % sous forme

glucuronidée (Rondini *et al.*, 2002). De telles données sont inexistantes pour l'acide chlorogénique.

Les molécules natives, généralement présentes dans le plasma à l'état de traces, peuvent être analysées directement par CLHP/DEC après extraction du plasma. En revanche, les formes métabolisées sont difficilement détectables car les sites oxydables sont parfois masqués par les groupements sulfates ou glucuronides ; de plus, elles possèdent une polarité élevée qui rend quasiment impossible leur séparation d'avec les autres constituants polaires systématiquement présents dans le plasma. Aussi, une hydrolyse enzymatique préalable du plasma est réalisée de façon à libérer les formes natives, sans entraîner pour autant leur dégradation.

II.3.4.3.1. Analyse des plasmas sans hydrolyse enzymatique

L'analyse des plasmas des rats du groupe « témoin » en CLHP/DEC a permis de confirmer l'absence de pics correspondants aux temps de rétention (Tr) des acides chlorogénique, caféique, férulique. Le profil chromatographique de ces plasmas est identique après traitement ou non par le mélange sulfatase/β-glucuronidase : un pic majoritaire (pic n°1) apparaît autour de 17 minutes (Tr/Tr trans-acide chlorogénique = 0,74) et des pics de très faible intensité autour de 20, 34 et 68 minutes (respectivement appelés pics 2, 4 et 6) (figure 84).

Le pic n°1 étant présent dans tous les plasmas et la variabilité des temps de rétention étant relativement importante, nous avons utilisé ce pic comme référence interne. Le tableau XXX présente ainsi les rapports Tr/Tr pic n°1 des différents composés retrouvés dans l'ensemble des plasmas.

Lors de l'analyse sans hydrolyse enzymatique des plasmas de rats des groupes ayant consommé les régimes à base de café, nous avons mis en évidence la présence en très faible concentration d'acide chlorogénique *trans* et *cis* et d'un composé élué à un temps de rétention de l'ordre de 75 minutes (pic n°7) et retrouvé uniquement dans le plasma de rats ayant consommé ces régimes. Toutefois, l'intensité des pics est si faible que l'on se trouve dans la limite de détection de la méthode d'analyse.

Afin de déterminer si l'on retrouvait également dans le plasma les formes estérifiées non identifiées d'acides phénoliques que nous avions détectées dans le café, ce dernier a de nouveau été extrait, mais analysé en électrochimie dans les mêmes conditions que les plasmas (figure 85). Aucun autre acide hydroxycinnamique présent initialement dans le café n'a été détecté dans les plasmas.

II.3.4.3.2. Analyse des plasmas avec hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse par le mélange sulfatase/β-glucuronidase n'a pas entraîné d'augmentation significative de la concentration en acide chlorogénique, ni d'apparition de ses dérivés, notamment les acides caféique et férulique (figure 86). Ce résultat, certes surprenant compte-tenu de la métabolisation probable de l'acide chlorogénique par les rats (à titre de comparaison avec les données de la littérature, nos rats ont consommé 23,6 mg d'ACQ/kg PC/jour), peut s'expliquer par une concentration trop faible de ces composés dans le plasma (inférieure à 0,2 µmol/L) pour être détectable dans notre système de CLHP/DEC compte-tenu du seuil de détection et du faible taux de récupération (71 ± 4 % sans enzyme et de 64 ± 10 % avec enzyme). Par ailleurs, il faut rappeler que ces plasmas ont été conservés plusieurs mois au congélateur avant analyse, ce qui pourrait expliquer une dégradation partielle des composés phénoliques issus du café, même si aucune dégradation n'avait été observée avec l'acide férulique dans une étude menée antérieurement au laboratoire.

II.3.4.4.Identification du composé n°7 retrouvé dans les plasmas des animaux ayant consommé du café

La concentration du composé 7, de l'ordre de 0,1 à 0,3 µmol/L en équivalent acide chlorogénique dans le plasma, est augmentée significativement après hydrolyse enzymatique dans la plupart des plasmas des rats ayant consommé les régimes expérimentaux (figure 87). Il pourrait donc s'agir d'un composé phénolique qui serait sulfaté, glucuronidé ou sulfo-glucuronidé.

Le pic n°7 étant retrouvé uniquement dans les plasmas des rats ayant consommé du café et absent des plasmas témoins, nous avons cherché à vérifier sa présence éventuelle dans le café. Un extrait de café préparé a donc été injecté dans les conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse des plasmas, mais cette analyse n'a pas montré la présence de ce composé (figure 85).

Afin de vérifier l'hypothèse de la présence de glucuronylesters, nous avons réalisé une hydrolyse alcaline sur un plasma contenant ce composé, cette hydrolyse devant normalement conduire à la libération du phénol. Dans les mêmes conditions expérimentales, une hydrolyse alcaline a été réalisée sur de l'acide chlorogénique ayant également une structure estérifiée, la disparition du pic chromatographique correspondant nous permettant de valider notre protocole d'hydrolyse. Aucune augmentation du composé 7 n'a été observée après hydrolyse alcaline, ce qui laisse supposer que ce composé n'est pas un dérivé glucuronylester. Il reste cependant la possibilité qu'il s'agisse d'un *o*-glucuronide, ce qu'une hydrolyse acide pourrait permettre de déterminer. De même, si ce composé était sulfo-glucuronidé, un pic

chromatographique devrait apparaître après hydrolyse acide. Afin de confirmer une métabolisation par sulfatation simplement, il aurait fallu traiter les plasmas par une sulfatase présentant un taux de pureté élevé, dépourvue d'activité β-glucuronidase. Une telle enzyme n'étant actuellement pas disponible dans le commerce, une autre possibilité aurait consisté à inhiber l'activité β-galactosidase du mélange enzymatique issu d'*Helix pomatia*. Néanmoins, l'hypothèse de la sulfatation reste peu probable compte tenu de la faible polarité de la molécule.

Il est enfin possible que le pic n°7 corresponde à un produit de dégradation plus poussée de l'acide chlorogénique. Si l'on s'intéresse aux différentes voies de métabolisation suggérées dans la littérature (figure 80), nous pouvons émettre quelques hypothèses de structures pour ce composé : l'acide *p*-coumarique, l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque, l'acide isoférulique ou l'acide vanillique. Aucun de ces composés n'a toutefois présenté en CLHP/DEC le même comportement que le composé 7 (Tableau XXXI).

Il s'agit donc probablement d'un composé issu d'une métabolisation encore plus avancée de l'acide chlorogénique, comme l'acide 3-(*p*-hydroxyphényl)-propionique, l'acide hippurique, l'acide cinnamique ou l'acide benzoïque. Dans les conditions d'analyse utilisées, l'acide benzoïque présente effectivement un temps de rétention similaire à celui du composé n°7. Une analyse par CLHP couplée à un détecteur UV-visible à barettes de diodes indique que le spectre du composé 7 est identique à celui de l'acide benzoïque (figure 88).

Bien que cela soit surprenant compte tenu de sa structure chimique, l'acide benzoïque répond tout de même très faiblement dans les conditions électrochimiques utilisées lors du dosage des plasmas. Ceux-ci semblent donc contenir une concentration importante en acide benzoïque, compte-tenu des aires importantes relevées lors de l'analyse des plasmas, témoignant probablement d'une forte métabolisation de l'acide chlorogénique chez les rats ayant consommé les régimes expérimentaux. Il faudrait néanmoins confirmer ce résultat par CLHP couplée à une détection par spectrométrie de masse.

II.3.4.5. Corrélation entre les concentrations en acide chlorogénique et le pouvoir antioxydant des plasmas

Si l'on trace un graphique représentant le pouvoir antioxydant des plasmas en fonction de la concentration d'acide chlorogénique détectée dans ces échantillons (figure 89), on constate que le degré de corrélation entre les deux est presque nul (R^2= 0,3112). L'augmentation de pouvoir antioxydant constatée dans les plasmas provient bien des régimes, mais ne serait donc due que pour une faible part à la présence d'acides hydroxycinnamiques. Il est donc probable que cette augmentation puisse provenir d'autres composés du café, comme les produits de la

réaction de Maillard. Une partie de ces derniers pourrait être décomposée lors de la digestion en produits de plus petite taille, qui seraient alors absorbés mais non détectés en électrochimie, au moins dans nos conditions d'analyse. Il est également possible qu'un cycle métabolique complexe conduise à l'apparition d'autres molécules antioxydantes dans le plasma, suite à la consommation de café. Cependant, de telles données n'existent pas dans la littérature.

Si les concentrations d'acide chlorogénique détectées dans le plasma demeurent extrêmement faibles, notre étude est la première à mettre clairement en évidence sa présence dans le plasma. Ces concentrations, certes faibles, ne sont pas modifiées par l'ajout de lait ou l'atomisation de la boisson. Il est évident que ces concentrations ne sont pas suffisantes pour assurer le rôle de capteur de radicaux libres qu'on a longtemps attribué aux acides phénoliques. En revanche, elles pourraient être physiologiquement pertinentes pour jouer un rôle dans la régulation de l'expression génétique impliquée dans la prévention de certains cancers, mise en évidence dans des publications récentes (Feng *et al.*, 2005 ; Gao *et al.*, 2000 ; Kasai *et al.*, 2000).

Si le pouvoir antioxydant déterminé dans la boisson était prometteur, les concentrations retrouvées dans l'organisme sont en revanche très faibles. Cependant, il semble que la formation de complexes protéines/polyphénols se produisant dans la boisson n'altère pas la biodisponibilité de cet acide phénolique de manière significative.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a donc permis de montrer que des interactions de nature réversible entre les protéines du lait et les polyphénols du café seraient susceptibles de se former lors de la préparation extemporanée de la boisson. La majorité de l'interaction aurait lieu au niveau des caséines, les protéines du lactosérum n'étant que faiblement impliquées. Cependant, ces interactions de nature réversible ne semblent pas avoir d'influence réelle sur le pouvoir antioxydant de la boisson.

Le procédé d'atomisation, lorsqu'il est appliqué à la boisson en présence de lait, semble favoriser l'apparition de complexes à liaisons covalentes dans la poudre issue de la boisson, ce qui pourrait avoir une légère influence sur le potentiel antioxydant de la boisson reconstituée à partir d'une telle poudre. Il serait intéressant d'approfondir ce dernier point, notamment en mettant en évidence l'existence de tels complexes dans le café au lait atomisé, de manière plus précise, par calorimétrie différentielle ou par la technique de Hummel et Dryer par exemple (il s'agit d'une méthode de filtration sur gel, (de type Séphadex par exemple) les complexes étant séparés en fonction de leur taille). Il faudrait également approfondir la nature des interactions mises en jeu, ce qui nécessiterait notamment l'établissement de constantes de liaison et/ou de dissociation. Enfin, le devenir des interactions lors de la digestion mériterait d'être approfondi.

Le pouvoir antioxydant du café semble en grande partie être dû aux produits de la réaction de Maillard, également extraits lors de la préparation de la boisson, bien que le pouvoir antioxydant apporté par les polyphénols représente jusqu'à la moitié du pouvoir antioxydant total, selon le test utilisé. La nature des interactions et antagonismes entre ces différents produits, ainsi que la nature des PRM impliqués et leur mode d'action dans le pouvoir antioxydant, constitueraient donc d'autres points intéressants à approfondir. De même, les interactions possibles entre PRM et protéines ou entre PRM et acides hydroxycinnamiques, qu'il s'agisse de la formation complexes ou d'effets sur le pouvoir antioxydant de la boisson, mériteraient d'être explorées.

Nos résultats montrent qu'en revanche, si le pouvoir antioxydant déterminé dans le café était prometteur, les concentrations en acides phénoliques retrouvées dans l'organisme sont très faibles, traduisant une absorption très faible de l'ACQ. Les interactions acide chlorogénique/caséines seraient de plus partiellement dissociées pendant la digestion gastro-intestinale, et les faibles concentrations en ACQ retrouvées peuvent être attribuées à une

absorption faible, comme le suggèrent les études de perméation sur cellules Caco-2. Cependant, les concentrations d'acide chlorogénique retrouvées, bien que quantitativement faibles, ne sont pas nulles, ce qui est surprenant car l'analyse a été menée quatre heures après ingestion du repas expérimental. Ce résultat sous-entend qu'elles proviennent non pas de ce dernier repas, mais reflètent un état basal du plasma induit par la consommation chronique de café, dans des proportions certes importantes mais relativement réalistes par rapport à la consommation humaine. Il est possible qu'un phénomène d'adaptation se produise lors d'une consommation chronique de café et que l'absorption réelle de la molécule augmente au fil du temps. Il pourrait par exemple y avoir induction dans la bordure en brosse de la production des protéines de transport des acides phénoliques mises en évidence dans la littérature (Konishi et Kobayashi, 2004). Des phénomènes de stockage, dans le foie par exemple, ont également pu se produire. L'analyse des organes prélevés et des urines aurait pu apporter des éléments de réponse, mais la mise au point de méthodes d'analyse fiables s'est révélée trop longue et difficile. Il est en tout cas probable que la quantité de produits provenant du café, absorbée par les rats ait augmenté au fil de l'étude de biodisponibilité en chronique, car la couleur des urines était de plus en plus foncée au fil des jours. De telles observations ont également été réalisées par d'autres auteurs, sans plus d'approfondissement (Sakamoto *et al.*, 2003). Une étude d'absorption sur des animaux ayant consommé ou pas de manière chronique du café, sur différentes durées, pourrait apporter des réponses à ces questions. Enfin, il serait intéressant de déterminer si les doses retrouvées dans le plasma sont suffisantes pour avoir un effet sur la régulation des gênes, ces doses étant vraissemblablement trop faibles pour avoir un effet antiradicalaire direct. Les autres effets santé potentiels tels que la régulation de la glycémie par la consommation chronique d'acide chlorogénique, pourraient également être explorés.

S'il semble que la présence de produits de la réaction de Maillard dans le milieu fasse légèrement diminuer l'absorption des acides phénoliques, l'ajout de lait n'induit pas de variation dans les concentrations finales d'acide chlorogénique retrouvées dans les plasmas, et de plus une légère amélioration du statut antioxydant plasmatique et en HDL cholestérol est constatée suite à la consommation chronique des quatre régimes expérimentaux.

Le modèle café au lait montre que les interactions protéines / acides hydroxycinnamiques n'ont d'influence ni sur leur pouvoir antioxydant, ni sur leur biodisponibilité. La consommation chronique de café, décaféiné, en présence de lait ou pas

peut donc être considérée comme une pratique favorable à l'amélioration du statut antioxydant plasmatique basal, contribuant par cela même à la prévention des pathologies associées aux radicaux libres. Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle possible des produits de la réaction de Maillard présents dans le café, dans le potentiel antioxydant pour l'organisme de celui-ci. Leur devenir dans l'organisme (absorption, effets santés bénéfiques, interactions avec les autres nutriments lors de la digestion) mériterait d'être à présent explorés.

TABLEAUX

Tableau I : Contenu en polyphénols de quelques aliments (d'après Bravo, 1998)

Teneurs exprimées en g / 100g de matière humide

Céréales (mg/100g)		Boissons (mg/L)	
riz	8,6	bière	60-100
avoine	8,7	vin blanc	200-300
mais	30,9	jus d'orange	660-1000
blé	22-40	jus de pomme	370-7100
millet	590-1060	thé	750-1050
orge	1200-1500	café	1330-3660
sorgho	170-10260	vin rouge	1000-4000
Fruits (mg/100g)		**Légumes (mg/100g)**	
poire	2-25	choux de Bruxelles	6-15
abricot	30-43	chou	25
groseilles à maquereau	22-75	poireau	20-40
cerise	60-90	céléri	94
orange	50-100	persil	55-180
canneberge	77-247	pois chiche	78-230
pêche	10-150	haricot	34-280
tomate	85-130	oignon	100-2025
prune	4-225		
fraise	38-218		
airelles	135-280		
pomme	27-298		
mûres	135-280		
framboise	37-429		
raisin	50-490		
cassis	140-1200		

Tableau II : Divergence sur la perception des monomères de polyphénols dans la littérature (d'après Robichaud et Noble, 1990 ; Tsai-Su et Singleton, 1969 ; Arnold et Lea, 1983 ; Delcour *et al.*, 1984 ; Kielhorn et Thorngate, 1999 ; Arnold *et al.*, 1980 ; Dadic et Belleau, 1973 ; Thorngate et Noble, 1995)

Polyphénols	**Matrice**	**Ajout (ppm)**	**Sensation perçue**	
			Amer	**Astringent**
(+)-Catéchine	Eau	46,1[d]	+	-
	Vin	1200[a]	+	-
		1500[b]	-	+
	5 % d'éthanol	20[c]	+	-
Monomères de flavan-3-ols	Vin	200[e]	+	-
		160-300[f]	+	+
(-)-Epicatéchine	Eau	100[d]	+	+
	Vin	500[g*]	+	+
		900[h]	+	+

- concentration sans ajout (ppm), + = sensation perçue, - = sensation non perçue. a : (Robichaud et Noble, 1990), b : (Kielhorn et Thorngate, 1999), c : (Arnold et Lea, 1983), d :(Delcour *et al.*, 1984), e : (Tsai-Su et Singleton, 1969); f :(Arnold *et al.*, 1980), g :(Dadic et Belleau, 1973), h : (Thorngate et Noble, 1995)

Tableau III : Composition en acides aminés de trois protéines de salive de rat induite par 3 jours d'un régime hautement enrichi en tanins de sorgho (d'après Mehansho *et al.*, 1985)

	Protéines		
Acides aminés (mol/100 mol)	**GP-66sm**	**GP-66p**	**GP-27p**
Acide aspartique	1,9	1,9	3,5
Thréonine	3,5	3,6	0,5
Serine	1,1	1,4	1,7
Acide glutamique	**18,9**	**18,4**	**20,5**
Proline	**44,7**	**45,6**	**43,8**
Glycine	**19,0**	**18,2**	**19,3**
Alanine	1,8	1,6	0,4
Isoleucine	0,6	0,6	0,5
Leucine	1,0	0,9	0,6
Arginine	**7,6**	**7,0**	**7,2**
Valine	0,0	0,0	1,3

Tableau IV : Composés de la paroi végétale entrant dans la composition des fibres (d'après Macheix *et al.*, 1990 ; Ferguson *et al.*, 2001)

Fibres « Solubles »	Polysaccharidiques	Pectines :	Homogalacturonanes Rhamnogalacturonane I Rhamnogalacturonane II Galactane Arabinane Arabinogalactane type I Arabinoxylanes
		Carraghénanes Alginates Gommes	
	Polyphénoliques	Tanins hydrolysables	
Fibres « Insolubles »	Polysaccharidiques	Cellulose	
		Hémicellulose :	Xyloglucanes Hétéroxylanes (1→3, 1→4) β-glucanes
	Polyphénoliques	Acides hydroxycinnamiques :	Acide férulique Acide dihydroférulique Acide *p*-coumarique
		Tannins condensés Lignine Subérine	
Autres	Lipides	Cutines Cires végétales	
	Protéines	Extensines Protéines riches en prolines ou en glycine Enzymes	
	Composés inorganiques	Calcium Silice Eau	

Tableau V : coefficients de partage des composés antioxydants de l'huile d'olive dans des émulsions huile/eau (d'après Rodis *et al.*, 2002)

Antioxydant	Coefficient de partage *
Oleuropéïne	0,0006
3-4 dihydroxyphényléthanol	0,0100
Acide protocatéchuique	0,0390
Tyrosol	0,0770
Acide caféique	0,0890
Oleuropéïne aglycone	0,14900

- *en mg de molécule dans l'huile par mg de molécule dans l'eau.

Tableau VI : Différents tests permettant l'évaluation d'un pouvoir antioxydant

Tests en système modèle

Tests du pouvoir anti-radicalaire

test	température	initiateur	substrat	Produit	Avantages	Limites	Référence
FRAP	37°C	-	Fe^{III}	Fe^{II}	Sensible, simple et rapide	Peu spécifique Ne mesure que le pouvoir réducteur	(Benzie et Strain, 1996)
DPPH	20°C	-	DPPH°	DPPH	Rapide	Ne mesure que le pouvoir antiradicalaire Peu sensible.	(Brand-Willliams *et al.*, 1995)
TEAC	37°C	H_2O_2 $K_2S_2O_8$	$ABTS^+$	$ABTS^{\circ+}$	Sensible, simple, répétable et rapide	Interférences	(Prior et Cao, 1999 ; Re *et al.*, 1999)

Tests faisant intervenir une co-oxydation de lipides

test	température	Substrat	initiateur	Produit	Avantages	Limites	Référence
AAPH	37°C	Acide linoléique	AAPH	-	Simulation d'un milieu alimentaire émulsionné	Long à mettre en oeuvre	(Liegeois *et al.*, 2000)
TAC	37°C	crocine	AAPH	Crocine oxydée	Sensible, simple, répétable	[substrat] élevée	(Lussignoli *et al.*, 1999)
TOSCA	35°C	acide α-céto-γ-méthiolbutyrique	AAPH	éthylène	Sensible	Méthode d'analyse lourde Interférences	(Winston *et al.*, 1998)
ORAC	37°C	B-Phycoérythrine R-Phycoérythrine	AAPH	Phycoérythrine oxydée	Sensible, simple, répétable et spécifique	Bruit de fond	(DeLange et Glazer, 1990 ; Ghiselli *et al.*, 2000).

Tests évaluant le pouvoir antioxydant dans une matrice

test	température	initiateur	Paramètre suivi	Avantages	Limites	Référence
TRAP (Lipides plasmatiques)	37°C	AAPH $CuSO_4$	Mesure de l'oxygène consommé pendant la réaction	Sensible et répétable	Peu spécifique	(Wayner *et al.*, 1985)
LDL	30°C 37°C	CuSO4 AAPH iodination	Acide thiobarbiturique et malonaldéhyde : mesure des TBA-RS	Représentativité *in vivo* Sensible et répétable	Extraction longue Stabilité des LDL ?	(Khouw *et al.*, 1993 ; Blache *et al.*, 1995 ; Valkonen et Kuusi, 1997)
Liposomes	37°C 50°C	AAPH	Acide thiobarbiturique et malonaldéhyde : mesure des TBA-RS		Préparation fastidieuse	(Van der Sluis *et al.*, 2000)
Hématies		AAPH	Hémolyse			(Durand et Blache, 1996 ; Ko *et al.*, 1997 ; Manna *et al.*, 1999)
			Diènes conjugués			
		Fe3+ hématinique	Diènes conjugués			

AAPH : 2-2'-Azobis (2-AmidinoPropane) di-Hydrochloride ; ABTS: 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ; DPPH : 1,1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl ; FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma; LDL: Low Density Lipoprotein; ORAC : Oxygen-Radical Absorbance Capacity assay ; TAC : Total Antioxydant Capacity ; TBA-RS : ThioBarbituric Acid Reactive Substances; TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ; TOSCA : Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay ; TRAP : Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter .

Tableau VII : Contenu en polyphénols et pouvoir antioxydant de différents échantillons de cacao, chocolat au lait et chocolat noir du commerce (d'après Vinson et al., 1999).

Produit	Polyphénols totaux (µmol/g de matière sèche)	CE_{50}	% d'augmentation de la phase de latence par rapport au témoin
Cacao	224,0 ±66,4	0,32 ± 0,07	42%
Chocolat noir	126,0 ± 17,4	0,25 ± 0,03	55%
Chocolat au lait	52,2 ± 20,4	0,41 ± 0,04	26%*

- *p<0,05

- Le pouvoir antioxydant a été mesuré par le test d'oxydation des LDL *ex-vivo* par des ions cuivriques à 25µM pendant 6h. Les quantités de chaque chocolat utilisées ont été choisies de façon à contenir 100µM de polyphénols en équivalents catéchine que pour le test. La quantité de polyphénols totale a été quantifiée par la méthode de Folin-Ciocalteu, il a été vérifié que ni la matière grasse ni les protéines du chocolat n'interféraient. Les résultats sont la moyenne obtenue sur 4 échantillons commerciaux de cacao, 6 de chocolat noir et 5 de chocolat au lait. CE_{50} : concentration efficace pour faire aumenter le temps de latence de 50% par rapport au témoin.

Tableau VIII : Composition d'un jus de pamplemousse domestique et d'un jus industriel, et implication des différents composés phénoliques dans le pouvoir antioxydant (d'après Gil *et al.*, 2000)

Composés phénoliques	Composition (mg/L)		Contribution au pouvoir antioxydant du jus industriel (%)
	Jus domestique	Jus industriel	
Anthocyanes	306,0	387,4	7,8 %
Punicalagine	67,9	1561,7	54,7 %
Acide ellagique	33,2	121,1	2,7 %
Tanins hydrolysables	539,2	417,3	34,6 %

- Pouvoir antioxydant mesuré par le test DPPH. La contribution est exprimée en pourcentage de l'activité due aux composés phénoliques

Tableau IX : Effets de la cuisson domestique sur le pouvoir antioxydant et le contenu en polyphénols de quelques légumes (d'après Wu *et al.*, 2004)

	Composés phénoliques totaux (mg équivalents acide gallique/g de matière sèche)		**Pouvoir antioxydant de la fraction hydrophile** (µmol équivalents trolox/g de matière sèche)		**Pouvoir antioxydant de la fraction lipophile** (µmol équivalents trolox/g de matière sèche)	
	Cru	Cuit	Cru	Cuit	Cru	Cuit
Asperge	1,41 ± 0,03	1,59 ± 0,13	29,15 ± 2,20	16,44 ± 2,47	1,02 ± 0,18	N.D.
Brocoli	3,37 ± 0,62	3,25 ± 1,70	14,18 ± 2,04	12,26 ± 2,22	1,72 ± 0,24	0,33 ± 0,10
Carottes	1,25 ± 0,10	1,56 ± 0,28	11,56 ± 1,79	3,56 ± 0,69	0,59 ± 0,14	0,15 ± 0,10
Pomme de terre blanche	1,63 ± 0,17	1,36 ± 0,60	10,10 ± 2,12	10,41 ± 1,90	0,49 ± 0,12	0,40 ± 0,28
Patate douce	0,74 ± 0,27	1,20 ± 0,28	8,58 ± 1,15	7,29 ± 2,04	0,44 ± 0,11	0,37 ± 0,31
Tomate	0,80 ± 012	1,00 ± 0,11	3,13 ± 0,69	4,26 ± 0,86	0,24 ± 0,07	0,34 ± 0,05
Chou rouge	2,54 ± 0,18	3,21 ± 0,57	22,32 ± 3,68	31,46 ± 6,00	0,20 ± 0,14	N.D.
Oignons	0,91 ± 0,09	1,50 ± 0,47	10,17 ± 1,89	12,20 ± 1,71	0,12 ± 0,03	N.D.
Pomme de terre rouge	1,38 ± 0,29	1,76 ± 0,16	10,60 ± 1,34	13,04 ± 1,79	0,38 ± 0,01	0,22 ± 0,28
Pomme de terre reinette grise	1,22 ± 0,23	1,79 ± 0,57	12,72 ± 2,28	15,27 ± 1,33	0,51 ± 0,14	0,28 ± 0,09

- Le contenu en polyphénol a été mesuré par la méthode de Folin-Ciocalteu. Le pouvoir antioxydant des fractions lipophile et hydrophile a été mesuré par le test ORAC. N.D. : Non determiné

Tableau X : Distribution de la radioactivité dans des rats, 72 heures après ingestion de complexes acide caféique - caséine marquée radioactivement au niveau de la lysine (d'après Hurell *et al.*, 1982)

		Témoin (caséine seule)	**Complexes formés à pH 7**	**Complexes formés à pH 10**
% de la radioactivité ingérée retrouvée dans:	Fèces	5	3,6	26,1
	Urine	11,6	11,4	10,5
Radioactivité détectée dans: (désintégrations/min x10^{-4}/g)	Foie	12,20	12,09	8,65
	Rein	10,77	11,11	7,79
	Muscle	5,65	6,30	4,15
Radioactivité détectée dans: (désintégrations/min x10^{-4}/mL)	Sang	5,01	5,49	3,91

Tableau XI : Biodisponibilité relative et paramètres pharmacocinétiques de la quercétine chez le porc après ingestion de quercétine aglycone ou de quercétine-3-O-glucoside dans des régimes différant par leur contenu en matière grasse (d'après Lesser *et al.*, 2004)

n=6 ; les lettres indiquent une différence significative lorsqu'elles ne sont pas communes à deux valeurs au sein d'une même colonne ; tous les échantillons ont subi une hydrolyse enzymatique.

% de matière grasse dans le régime	Concentration plasmatique maximale (µmol/L)	Temps d'atteinte de la concentration maximale (min)	Aire sous la courbe totale (min x µmol/L)	Biodisponibilité relative %
Quercétine aglycone				
3 %	0,518 ± 0,056	102,9 ± 8,0^{a}	117,3 ± 18,5^{b}	100 %
17 %	0,583 ± 0,060	70,0 ± 8,6^{b}	184,5 ± 19,8^{a}	157 %
32 %	0,563 ± 0,056	51,4 ± 8,0^{b}	176,0 ± 18,5^{a}	150 %
Quercétine-3-O-glucoside				
3 %	0,906 ± 0,089^{a}	70,0 ± 7,9^{a}	205,5 ± 19,8^{b}	100 %
17 %	0,895 ± 0,089^{a}	50,0 ± 7,9^{a,b}	270,9 ± 19,8^{a}	132 %
32 %	0,642 ± 0,089^{b}	45,0 ± 7,9^{b}	249,7 ± 19,8^{a}	122 %

Tableau XII : Liste des produits alimentaires utilisés

Aliments	Marque	Fournisseurs
Café arabica décaféiné soluble	Carte Noire	Cora (Massy, France)
Café arabica moulu	Carte Noire	Cora (Massy, France)
Café vert en grains arabica (Brésil)	-	Fourni par le Pr. P. Giampaoli.
Lait écrémé UHT	Lactel	Cora (Massy, France)
Lait ½ écrémé UHT	Lactel	Cora (Massy, France)
Lait entier UHT	Lactel	Cora (Massy, France)
Sucre	Saint-Louis	Cora (Massy, France)
Thé vert	Auchan	Auchan (Villebon sur Yvette, France)
P 14		INRA (Jouy en Josas, France)

Tableau XIII : Liste des réactifs et produits utilisés

Réactifs ou produits	Qualité / Pureté [1]	Fournisseurs
Solvants		
Acétate d'éthyle	CLHP / 99,8 %	Carlo Erba (Val de Reuil, France)
Acétone	CLHP	Fischer Scientific (Elancourt, France)
Acétonitrile	CLHP	Carlo Erba (Val de Reuil, France)
Chloroforme	CLHP /99,8 %	Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne)
Eau ultrapure	Ultrapure	Système de filtration Millipore Elix
Eau ultrapure, résistivité 18,3MΩ/cm	CLHP, Ultrapure	Double système de filtration Millipore, Simplicity 185
Ethanol	CLHP / 99,8 %	Carlo Erba (Val de Reuil, France)
Ether éthylique	Non stabilisé	Carlo Erba (Val de Reuil, France)
Méthanol	CLHP / 99,8 %	Carlo Erba (Val de Reuil, France)

Acides		
Acide acétique glacial	99,9 %	Carlo Erba (Val de Reuil, France)
Acide acétique glacial	CLHP / 99,7 %	Fischer Scientific (Elancourt, France)
Acide borique	99,5 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acide chlorhydrique	37 %	Merck (Darmstadt, Allemagne)
Acide *ortho*-phosphorique	85 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acide trichloroacétique	99,8 %	Fischer Scientific (Elancourt, France)
Autres produits chimiques		
2,2'azo-bis-(2 méthylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)	97 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acétate de lithium dihydraté	98 %	Acros Organics (Geel, Belgique)
Acétate de sodium trihydraté	> 99 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acide linoléïque	98 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Azoture de sodium	-	Prolabo/VWR, Fontenay-sous-Bois
Chlorure de sodium	99,5 %	Acros Organics (Geel, Belgique)
Dihydrogénophosphate de sodium dihydraté	> 99 %	Acros Organics (Geel, Belgique)
2,2-diphényl 1-pycrilhydrazile (DPPH)	95 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acide éthylenediaminetetraacétique (EDTA)	100 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
D-Glucose	96 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Tampon HEPES	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Hydrogénophosphate disodique dihydraté	> 99,5 %	Labosi (Oulchy-le-château, France)
Hydroxyde de sodium	Analyses / 98%	Carlo Erba (Val de Reuil, France)
L-lysine	98 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acide 4-morpholineeéthanesulfonique (MES)	≥ 99,5%	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Métaborate de sodium tétrahydraté	99 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Pentoparbital sodique	6 %	Sanofi (Plancoët, France)
Safran	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Sephadex LH-20	-	Pharmacia Biotech /Pfizer (Val-de-Reuil, France)
Tween 20	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)

Antioxydants		
Acide ascorbique	99 %	Merck (Darmstadt, Allemagne)
Acide benzoïque	99,7 %	Prolabo
Acide caféique	-	Extrasynthèse (Genay, France)
Acide chlorogénique	99 %	Acros Organics (Geel, Belgique)
Acide *p*-coumarique	-	Extrasynthèse (Genay, France)
Acide dihydrocaféique	-	Extrasynthèse (Genay, France)
Acide 2,3-dihydroxybenzoïque	99 %	Aldrich (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne)
Acide férulique	> 98 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acide hippurique	99 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acide iso-férulique	-	Extrasynthèse (Genay, France)
Acide 3-(*p* –hydroxyphényl)-propionique	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Acide urique	98 %	Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Acide vanillique	98 %	Extrasynthèse (Genay, France)
Protéines		
β-lactoglobuline, mélange de A et B, #L-0130	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Caséines, extraites de lait de vache, #L-7078	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
sérum albumine bovine, #A-3902	98 %	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Enzymes		
Extrait de bile, #B-8631	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Pancréatine, #P-7545, 0,27 µkat/g	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Pepsine, #P-7012, 58,8 µkat/mg de solide [2]	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Sulfatase Helix Pomatia (EC 3.1.6.1)	-	Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)

- 1 : taux de pureté indiqué par le fournisseur
- 2 : Le mélange contient entre autres de l'amylase, de la trypsine, des lipases, des ribonucléases et des protéases (informations fournisseur)

Tableau XIV : Quantité de matière sèche par g de produit dans les différents cafés

	Matière sèche (%)
Poudre de café décaféiné Carte Noire soluble	95,6 ± 0,1
Poudre de café atomisé	96,1 ± 0,3
Poudre de café au lait atomisé	97,4 ± 0,0
Lait demi-écrémé non atomisé	10,5 ± 0,0
Filtrat de café vert*	1,7 ± 0,6
Filtrat de café Carte Noire moulu*	2,0 ± 0,2

- * : Les solutions ont été préparées en faisant bouillir pendant 10 minutes dans 100 mL d'eau 6 g de grains de café moulus puis tamisés avec un tamis n°31, puis en filtrant le mélange sur filtre n°2 (Melitta, Chézy sur Marne, France). n=3.

Tableau XV : Paramètres testés par les différents tests de pouvoir antioxydant

Paramètre / échantillon	DPPH	AAPH	TAC
Témoin : Café extemporané	+	+	+
Cafés en grains (vert ou torréfié) [1]	-	-	+
Thé vert (pour comparaison) [2]	-	-	+
Laits dilués à 250 g/L [3]	+	+	+
Ajout extemporané de lait au café témoin	+	+	+
Ajout extemporané de lait au café en grains	-	-	+
Ajout extemporané de lait au thé vert	-	-	+
Teneur en matière grasse du lait[3]	+	+	+
Température de préparation[4]	+	-	-
Atomisation avec ou sans lait	+	+	+
Proportion due à l'ACQ[5]	+	+	+
Formation de liaisons covalentes ACQ/protéines	-	-	+
Fractions du café séparées sur colonne LH-20[6]	+	+	+
Fractions PRM LH-20+ACQ proportions du café[6]	+	+	+
Fractions PRM séparées par ultrafiltration	-	-	+

- 1 : Résultats ramenés à la quantité de matière sèche dans chaque boisson.
- 2 : Un sachet de thé vert de 2 g a été mis à infuser dans 150 mL d'eau bouillante (mesure à l'éprouvette) pendant 5 minutes dans un erlenmeyer rodé bouché. Le sachet a alors été retiré et l'infusion refroidie jusqu'à 40°C. La boisson a ensuite été complétée à 200 mL avec 50 mL de lait froid ou 50 mL d'eau froide (fiole de 200 mL). Ces boissons ont ensuite été diluées pour le test TAC, au 1/100^{e} dans le tampon phosphate de sodium 0,01 mol/L, pH 7,4. La matière sèche contenue dans l'infusion de thé n'ayant pas été mesurée, les résultats sont exprimés par mL de boisson, et comparés au pouvoir antioxydant du café expérimental ramené dans la même unité.
- 3 : Essais avec lait écrémé, demi-écrémé et entier.
- 4 : Chauffage de l'eau et ou du lait à 85°C, au micro-ondes ou sur plaque chauffante, avant dissolution du café. L'eau chaude était ajoutée en fiole jaugée complétée au trait de jauge ; après ajout du lait par pesée.
- 5 : Solutions contenant des quantités équivalentes d'ACQ à celles contenues dans le café soit 710,5 mg/L, contenant ou non 250 g/L de lait demi-écrémé
- 6 : Dilutions des fractions réalisées dans du tampon acétate de sodium 0,1 mol/L pH 5,5.

Tableau XVI : Composition du régime P14

Ingrédients	**Proportion**
Protéines totales de lait	14,0 %
Amidon	62,3 %
Saccharose	10,0 %
Huile de soja	4,0 %
Sels minéraux	3,5 %
Vitamines	1,0 %
Cellulose	5,0 %
Choline	0,2 %

Tableau XVII : Composition des boissons expérimentales consommées par les animaux pendant 22 jours.

Groupe de rats	«Témoin»	«Café»	«Café au lait»	« Café atomisé »	« Café au lait atomisé »
Eau (g)	80	80	60	80	78
Sucre (g)	20	20	20	20	20
Poudre café « Carte Noire » (g)	0	4	4	0	0
Poudre café atomisé (g)	0	0	0	4	0
Poudre café au lait atomisé (g)	0	0	0	0	6,1
Lait demi-écrémé (g)	0	0	20	0	0

Tableau XVIII : Concentrations d'acides hydroxycinnamiques dans les différents cafés préparés

	Sans hydrolyse	**Après hydrolyse alcaline**		
	ACQ (mg/L) ***(mg/g)***	**AC (mg/L)** ***(mg/g)***	**A*p*C (mg/L)** ***(mg/g)***	**AF (mg/L)** ***(mg/g)***
Café extemporané	710,54 ± 30,55	1370,42 ± 22,46	23,92 ± 0,81	98,94 ± 3,27
Soit par g de poudre :	*14,21 ±0,61*	*27,41 ±0,45*	*0, 48 ± 0,02*	*1,98 ±0,07*
Café atomisé	656,79 ± 12,48*	1241,58 ± 16,14*	13,07 ± 0,44*	86,96 ± 2,87*
Soit par g de poudre :	*13,14 ±0,25**	*24,83 ±0,32**	*0,26 ±0,01**	*1,74 ±0,06**
Café au lait atomisé	437,41 ± 8,75*	696,60 ± 100,31*	7,09 ± 0,77*	63,84 ± 11,87*
Soit par g de poudre :	*8,75 ±0,17**	*13,93 ±2,01**	*0 ,14 ±0,02**	*1,28 ±0,24**
Café vert en grains	2506,79 ± 179,18 *	N.D.	N.D.	N.D.
Café torréfié en grains	576,50 ± 21,00*	N.D.	N.D.	N.D.

- N.D. : non déterminé ; * :p<0,05 par rapport au témoin café extemporanné (test de la Plus Petite Différence Significative) ; ACQ : acide chlorogénique , AC : acide caféique, A*p*C : acide *p*-coumarique ; AF : acide férulique.

Tableau XIX : Quantités de composés phénoliques dans le café (d'après Clifford, 1999 ; Herrmann, 1989 ; Savolainen, 1992 ; Maeztu *et al.*, 2001 ; Nardini *et al.*, 2002)

Grains de café non torréfiés (En g / 100 g de matière sèche)

Composé	Café vert arabica	Café vert robusta	Auteurs
Acides chlorogéniques totaux	6-10 g / 100 g		(Clifford, 1999)
	5,56 ± 0,55 g / 100 g	6,7 ± 0,41 g / 100 g	(Herrmann, 1989)
Acide néochlorogénique (3-caféoyl-quinique)	0,51 ± 0,10 g / 100 g	0,74 ± 0,14 g / 100 g	(Herrmann, 1989)
Acide cryptochlorogénique (4-caféoyl-quinique)	0,71 ± 0,14 g / 100 g	0,98 ± 0,11 g / 100 g	
Acide chlorogénique (5-caféoyl-quinique)	4,79 ± 0,59 g / 100 g	5,49 ± 0,68 g / 100 g	
Acide 3,4-dicaféoyl-quinique	0,20 ± 0,05 g / 100 g	0,58 ± 0,07 g / 100 g	
Acide 3,5-dicaféoyl-quinique	0,43 ± 0,08 g / 100 g	0,58 ± 0,11 g / 100 g	
Acide 4,5-dicaféoyl-quinique	0,29 ± 0,07 g / 100 g	0,69 ± 0,17 g / 100 g	
Acide 3-féruloyl-quinique	0,015 g / 100 g	0,75 g / 100 g	
Acide 4-féruloyl-quinique	0,05 g / 100 g	0,135 g / 100 g	
Acide 5-féruloyl-quinique (ACQ méthylé)	0,28 g / 100 g	0,84 ± 0,17 g / 100 g	
Acide tannique	0,66 ± 0,06 g / 100 g		(Savolainen, 1992)
	0,68 ± 0,23 g / 100 g		

Grains de café torréfiés

Composé	Méthode d'analyse	Quantité	Auteurs
Acide tannique	Précipitation des protéines	1,8 ± 0,17 g / 100 g	(Savolainen, 1992)
	Spectrophotométrie	1,7 ± 0,27 g / 100 g	(Savolainen, 1992)

Filtration en cafetière

Composé	Masse de café[1]	Méthode d'analyse	Concentration		Auteurs
Acide chlorogénique (5-caféoyl-quinique)	187,5g/L	CLHP/DAD	Arabica	1,30 ± 0,04 mg/mL	(Maeztu *et al.*, 2001)
			Robusta	1,50 ± 0,05 mg/mL	
			« torrefacto »	1,30 ± 0,02 mg/mL	
	60g /L	CLHP/DEC	0,479 ± 0,02 mg/mL		(Nardini *et al.*, 2002)
Acides chlorogéniques (divers)	?	?	- à + torréfié	0,1-3,375 mg/mL	(Clifford, 1999)
			arabica	0,35-1 mg/mL	
			robusta	0,35-1,75 mg/mL	
Esters de l'AC	60g /L	CLHP/DEC	0,830 ± 0,07 mg/mL		(Nardini *et al.*, 2002)
Esters de l'AF	60g /L	CLHP/DEC	0,143 ± 0,01 mg/mL		(Nardini *et al.*, 2002)
Esters de l'A *p*-C	60g /L	CLHP/DEC	0,014 ± 0,001 mg/mL		(Nardini *et al.*, 2002)

- 1 : café en grain par litre d'eau (g/L) ; ACQ : acide chlorogénique , AC : acide caféique, A*p*C : acide *p*-coumarique ; AF : acide férulique.

Tableau XX : Comparaison indicative du pouvoir antioxydant du café expérimental à celui d'une infusion de thé vert

Boisson	Taux d'inhibition/mL de boisson	PAO relatif par tasse[1]
Café à 50 g/L	5323 ± 234	532300
Thé vert[2]	653 ± 24	130600

- 1 : soit 100 mL en moyenne pour le café et 200 mL pour le thé (Debry, 1993) 2 : Un sachet de thé vert de 2 g a été mis à infuser dans 150 mL d'eau bouillante (mesure à l'éprouvette) pendant 5 minutes dans un erlenmeyer rodé bouché. Le sachet a alors été retiré et l'infusion refroidie jusqu'à 40°C. La boisson a ensuite été complétée à 200 mL avec 50 mL d'eau froide (fiole de 200 mL).

Tableau XXI : Pouvoir antioxydant d'une infusion de thé vert, avec ou sans lait (test TAC)

Thé vert[1]	Pouvoir antioxydant[2]
Sans lait	653 ± 24
Avec 25 g / 100 g lait	616 ± 9

- 1 : Un sachet de thé vert de 2 g a été mis à infuser dans 150 mL d'eau bouillante (mesure à l'éprouvette) pendant 5 minutes dans un erlenmeyer rodé bouché. Le sachet a alors été retiré et l'infusion refroidie jusqu'à 40°C. La boisson a ensuite été complétée à 200 mL avec 50 mL d'eau froide ou de lait froid (fiole de 200 mL).
- 2 : Taux d'inhibition/mL de boisson

Tableau XXII : Pourcentages d'acide chlorogénique lié aux protéines de lait, déterminé par ultrafiltration.

Solution d'ACQ enrichie en :	20°C	85°C
Lait demi-écrémé	42±13	44±1
Lait écrémé	39±10	N.D.
β-lactoglobuline	0	0
Mélange de caséines	43±7	39±1

- N.D.: Non Déterminé.

Tableau XXIII : Pourcentage d'acide chlorogénique lié aux protéines laitières après digestion de solutions modélisant le café au lait, déterminé par ultrafiltration

	Avant ingestion		Après ingestion	
	20°C	85°C	Après digestion gastrique	Après digestion gastrique et intestinale
ACQ + lait écrémé	39 ± 10	N.D.	21 ± 2	17 ± 4
ACQ + β-lactoglobuline	0	0	5 ± 5	0
ACQ + caséines	43 ± 7	39 ± 1	36 ± 21	27 ± 19

- N.D.: Non Déterminé.

Tableau XXIV : Composition corporelle des animaux (% de la masse des animaux)

	Témoin	C	$CL_{1/2}$	C_a	$CL_{1/2a}$
Foie	3,4 ± 0,17	3,3 ± 0,13	3,3 ± 0,30	3,3 ± 0,83	3,2 ± 0,13
Cœur	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,02
Poumons	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,05

- « témoin » : groupe témoin buvant de l'eau sucrée, « C » : groupe consommant du café, « $CL_{1/2}$ » : groupe consommant du café au lait, « C_a » : groupe consommant du café atomisé, « $CL_{1/2a}$ » : groupe consommant du café au lait atomisé.

-

Tableau XXV : Consommation moyenne du régime expérimental par les rats, rat par rat.

Groupes de rats	Témoin	C	$CL_{1/2}$	C_a	$CL_{1/2a}$
Quantité moyenne du régime expérimental consommé sur les 22 jours (g)	12,51	7,58	10,72	8,33	9,86
	11,16	11,18	9,58	11,16	7,54
	12,49	9,68	11,83	9,64	7,73
	12,37	7,22	11,25	7,76	9,86
	12,50	6,24	11,88	4,58	10,76
	12,42	4,24	9,32	7,20	5,04
Moyenne par groupe (g)	12,24	7,69	10,76	8,11	8,47
Ecart type du groupe (g)	0,53	2,46	1,10	2,04	1,93

- « témoin » : groupe témoin buvant de l'eau sucrée, « C » : groupe consommant du café, « $CL_{1/2}$ » : groupe consommant du café au lait, « C_a » : groupe consommant du café atomisé, « $CL_{1/2a}$ » : groupe consommant du café au lait atomisé.

Tableau XXVI : Efficacité alimentaire des régimes, calculé sur les deux dernières semaines

Groupe	Prise alimentaire régime (g MS/j)	Prise alimentaire P14 (g MS/j)	Prise de poids (g/j)	Coefficient d'efficacité alimentaire apparent
Témoin	12,5 ± 0,17	22,97 ± 2,56	4,1 ± 1,9	0,12 ± 0,05
C	8,06 ± 0,56*	26,94 ± 1,16*	5,6 ± 2,6	0,15 ± 0,08
$CL_{1/2}$	11,05 ± 0,22*	26,74 ± 0,77*	5,8 ± 1,6	0,14 ± 0,04
C_a	8,43 ± 0,49*	22,20 ± 2,18	4,1 ± 1,6	0,13 ± 0,05
$CL_{1/2a}$	8,33 ± 1,10*	21,69 ± 1,74	3,6 ± 2,1	0,12 ± 0,07

- « témoin » : groupe témoin buvant de l'eau sucrée, « C » : groupe consommant du café, « $CL_{1/2}$ » : groupe consommant du café au lait, « C_a » : groupe consommant du café atomisé, « $CL_{1/2a}$ » : groupe consommant du café au lait atomisé.

- *: $p<0,05$ vs témoin

Tableau XXVII : Effets des Acides phénoliques et du café sur quelques paramètres sanguins (d'après Rodriguez de Sotillo et Hadley, 2002 ; Frank *et al.*, 2003 ; Debry, 1993 ; Ha Jee *et al.*, 2001 ; Superko *et al.*, 1991 ; Wahrburg *et al.*, 1994 ; Kamal-Eldin *et al.*, 2000)

Dose ingérée (mg)	Espèce	Effets sur le métabolisme des lipides	Référence
5mg d'ACQ/kg PC i .v ./j/3 semaines	Rat génétique -ment obèse	ACQ : croissance moins rapide que les témoins (↘ de synthèse lipidique), ↘ 24% TG hépatiques ↘ TG , cholestérol plasmatiques	(Rodriguez de Sotillo et Hadley, 2002)
2g d'ACQ /kg PC dans repas équilibré ./j/4 semaines	Rat Sprague Dawley.	↘ quantité de lipides dans les poumons ↗ cholestérol et lipides hépatiques	(Frank *et al.*, 2003)
Café décaféiné	homme	↘ cholestérolémie pas d'influence sur HDL / LDL/ VLDL cholestérol plasmatiques ↘ activité de la lipoprotéine lipase	(Debry, 1993)
Café (études épidémiologiques)	homme	Existence d'une relation dose-réponse entre consommation de café et cholestérol/ LDL cholestérol plasmatiques ↗ quantité de lipides sérale après consommation de café chez les hyperlipidémiques plus importante que chez les patients normaux	(Ha Jee *et al.*, 2001)
Café pendant deux mois puis soit sevrage soit déca pendant 2 mois	homme	Groupe Déca : ↗ LDL cholestérol plasmatiques ↘ activité de la lipoprotéine lipase (pas de changement pour le groupe subissant le sevrage)	(Superko *et al.*, 1991)
Café pendant 2 semaines puis déca pendant 2 semaines	homme	pas d'influence sur HDL / LDL/ VLDL cholestérol/ TG plasmatiques	(Wahrburg *et al.*, 1994)
2g d'acide caféique/kg PC dans repas équilibré ./j/4 semaines	Rat Sprague Dawley	↗ cholestérol et lipides hépatiques hypertrophie du foie ↘ rapport HDL cholestérol / cholestérol plasmatique	(Frank *et al.*, 2003)
4g d'acide férulique/kg PC dans repas équilibré ./j/4 semaines	rat	Tendance à la ↘ du cholestérol plasmatique ↗ HDL plasmatiques	(Kamal-Eldin *et al.*, 2000)

- PC : Poids corporel ; déca: café décaféiné ; ↗ :augmentation ; ↘ : diminution ; i .v. :intra-veineuse.

Tableau XXVIII : Paramètres sanguins mesurés après trois semaines de consommation des régimes expérimentaux (valeurs par L de plasma rapportées à la consommation quotidienne des régimes)

	Témoin	**C**	**$CL_{1/2}$**	**C_a**	**$CL_{1/2a}$**
Triglycérides	0,07 ± 0,03	0,08 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,03
Cholestérol	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,05	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,06	0,15 ± 0,05
HDL/Cholestérol	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01*	0,03 ± 0,01*	0,04 ± 0,02*	0,04 ± 0,01*

* $P<0,05$

Tableau XXIX : Biodisponibilité de l'acide chlorogénique : principaux résultats bibliographiques (d'après Olthof *et al.*, 2003 ; Cremin *et al.*, 2001 ; Olthof *et al.*, 2001 ; Nardini *et al.*, 2002 ; Bitsch *et al.*, 2001 ; Wittemer *et al.*, 2005 ; Rechner *et al.*, 2001 ; Gonthier *et al.*, 2003 ; Choudhury *et al.*, 1999)

Dose (mg)	analyse	T*	Composés retrouvés dans le plasma (µmol/L)	Excrétion **	Autres composés retrouvés dans l'urine**	Référence
Résultats chez l'homme						
2000mg/j/7J (28,58mg/kg PC) composé pur	CLHP/ SM/SM		Non déterminé	1,7 %	>60 métabolites dont 50% d'acide hippurique	(Olthof *et al.*, 2003)
1000 mg (14,29mg/kg PC) composé pur homme iléostomique	CLHP/ UV	-	Non déterminé	0,46 ± 0,23%	AC 11%	(Olthof *et al.*, 2001)
76 ± 6 mg (AHC divers) (1,09mg/kg PC) Pruneaux	CLHP/ MS/MS	2	Natif et métabolisé : traces AC-G/S :0,1% AF : traces	traces	AC,AF (traces)	(Cremin *et al.*, 2001)
95,6 ± 4,6 mg (1,36 mg/kg PC) Café	CLHP/ DEC	1 2	AC : 0,066 à 0,102 AC-G/S: 0,077 à 0,505			(Nardini *et al.*, 2002)
153,8 mg d'un mélange d'acides caffféoyle quiniques (équivalents AC) extrait d'artichaut	CLHP/ DEC	Cinétique Pic atteint à t=1h pour tous composés sauf acide dihydrocaféique t=7-8h	ACQ : 0 ; formes métabolisées de : AC : 8,04 ± 2,64 AF : 15,37 ± 3,85 AiF : 10,51 ± 2,43 Acide dihydrocaféique : 29,53 ± 12,40 Acide dihydroférulique :39,72 ± 15,51 (valeurs au pic, ng/mL)	0	AC : 0,23 ± 0,10 % AF : 0,94 ± 0,36 % AiF : 0,17 ± 0,07 % Acide dihydrocaféique : 1,29 ± 0,79% Acide dihydroférulique :1,38 ± 0,79%	(Wittemer *et al.*, 2005)
124,6 mg (1,78 mg/kg PC) Jus de pomme	CLHP/ UV	7	-	0	AC : 0,56%	(Bitsch *et al.*, 2001)
149,5 ± 0,8 mg (2,14mg/kg PC) Café	CLHP/ DAD CLHP/ SM/SM	-	ND	0	AF Acide iso-férulique Acide Vanillique,: Acide Hippurique Acide 3-hydroxyhippurique	(Rechner *et al.*, 2001)
Résultats chez le rat						
63,675 mg/j/8jours (19,1 mg/kg PC) Composé pur	CLHP/ SM/SM	R+12	Natif :0 AC : non détecté AF : 0,4 ± 0,1 Acide *m*-Coumarique : 1,9 ± 0,3 Acide 3-hydroxyphenylpropionique: 12,9 ± 2,9 Acide Hippurique: 98,2 ± 15,8	0,86 ± 0, 12%	AC+AF+AiF :0,46 ± 0,07% Acide m-Coumarique : 1,6 ± 0,5% Acide hydroxyphenylpropionique: 18,9 ± 4,2% Acide Hydrobenzoique/hydroxyhippuriques : 0,43 ± 0,07% Acide Hippurique: 36,5 ± 3,9%	(Gonthier *et al.*, 2003)
15 mg (50 mg/kg PC) Composé pur	CLHP/ DAD	-	Non déterminé	0	0	(Choudhury *et al.*, 1999)

PC : poids corporel; *Heures après le dernier repas ;** : (% de la dose ingérée)

Tableau XXX : Rapports des temps de rétention (Tr) des pics retrouvés dans les plasmas « café » ou « café au lait » par rapport au temps de rétention du pic n°1 présent dans l'ensemble des plasmas

Pics chromatographiques	Rapport Tr/Tr pic n°1	Identification
Pic n°1	1,0	Composé plasmatique
Pic n°2	1,2	Composé plasmatique
Pic n°3	1,4	*trans*-ACQ
Pic n°4	2,0	Composé plasmatique
Pic n°5	2,2	*cis*-ACQ
Pic n°6	4,0	Composé plasmatique
Pic n°7	4,3	Composé inconnu

Tableau XXXI : Rapport des temps de rétention des différents composés testés en CLHP/DEC par rapport à celui de l'acide *trans*-chlorogénique (*trans*-ACQ)

Isomères	Rapport Tr/Tr trans-ACQ
Acide 2,3-dihydroxybenzoïque	0,41
Acide hippurique	0,68
Acide vanillique	1,39
Acide benzoïque	3,02
Acide p-coumarique	4,79
Acide isoférulique	7,82
Acide 3-(p-hydroxyphényl)-propionique	Pas de réponse dans ces conditions électrochimiques

FIGURES

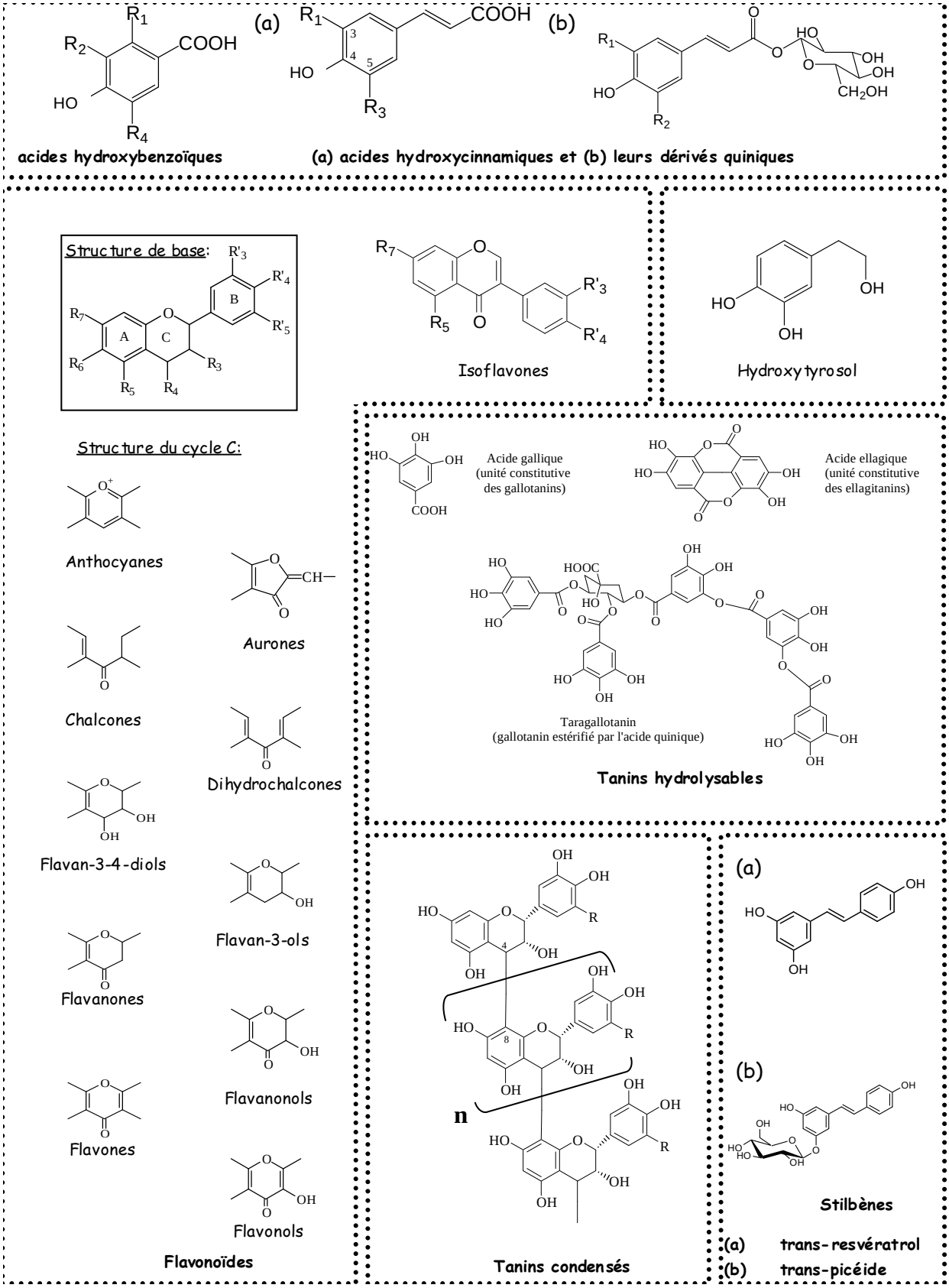


Figure 1 : Structures chimiques des principaux composés phénoliques

R_x = OH ou CH_3

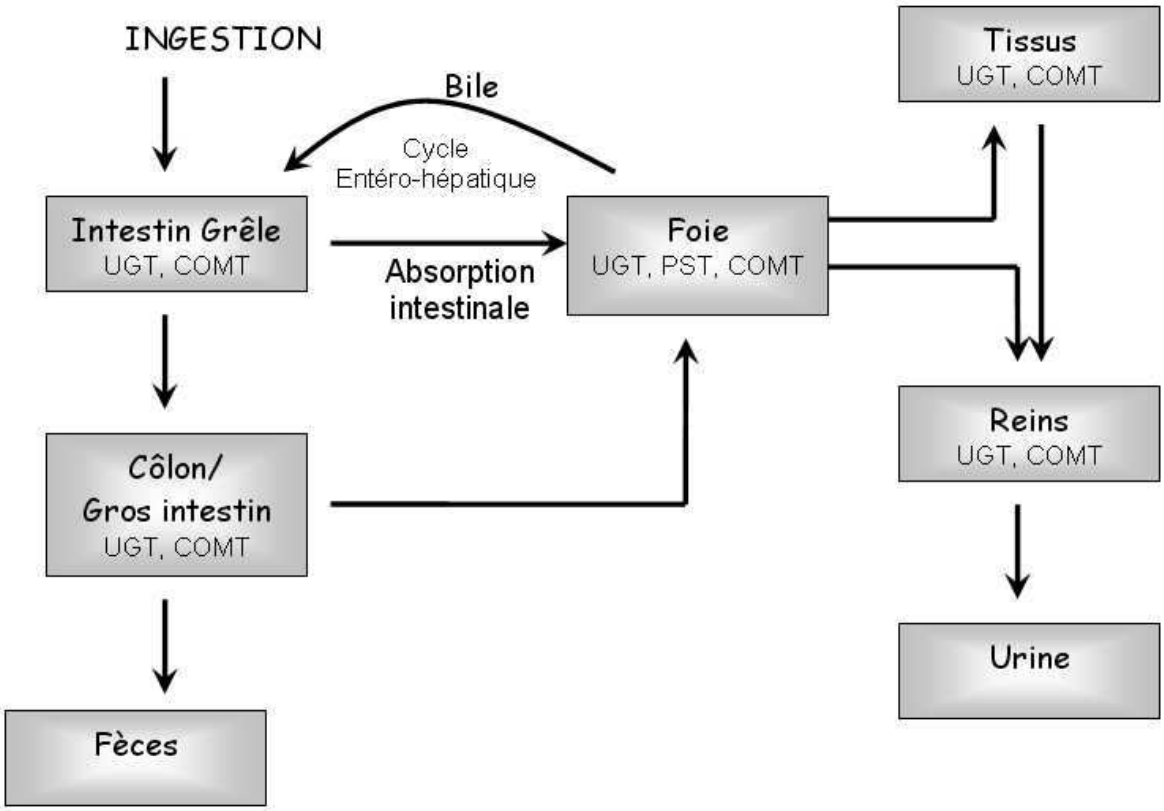


Figure 2 : Schéma du métabolisme des polyphénols (d'après Rondini, 2002)
UGT : uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférase ; PST : phénolsulfotransférase ; COMT : catéchol O-méthyltransférase

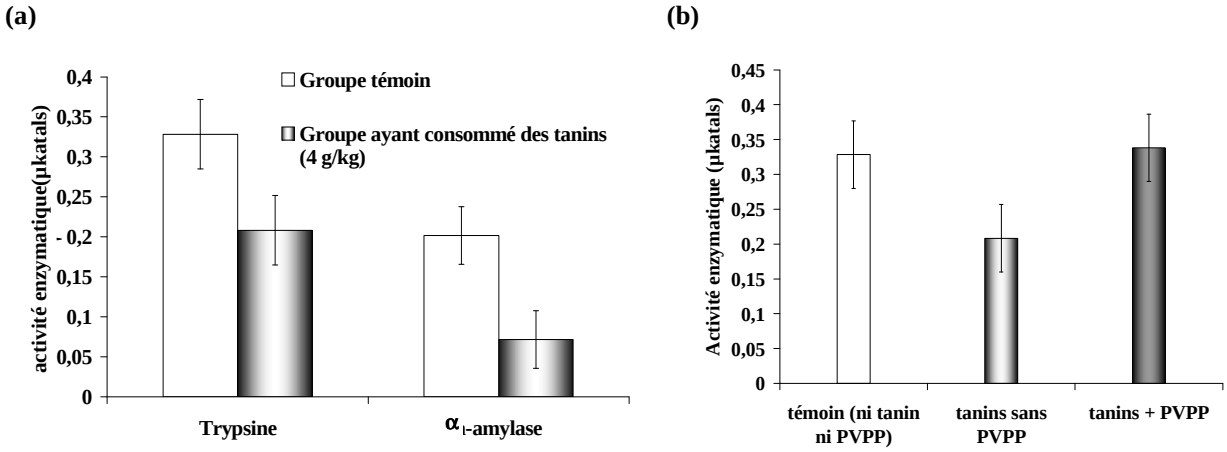


Figure 3 : Effet d'un régime enrichi en tanins sur l'activité des enzymes digestives *in vivo* chez le rat (d'après Griffith et Moseley, 1980)
(a) effets sur l'activité de 2 enzymes digestives ; (b) Recouvrement de l'activité de la trypsine par l'ajout de polyvinylpolypyrrolidone au milieu réactionnel
Moyennes des résultats obtenus pour 6 rats. Résultats ± écart-type.

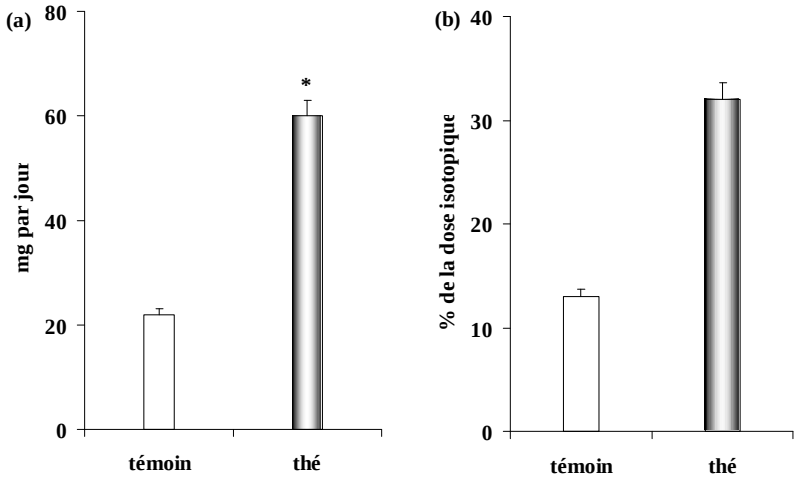
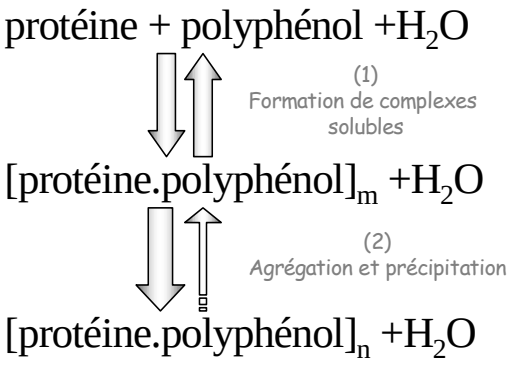


Figure 4 : Devenir physiologique de protéines endogènes marquées à la [^{15}N]glycine après consommation ou non de thé noir chez le rat (d'après Shahkhalili *et al.*, 1990)

(a) Excrétion azotée totale et (b) proportion de la dose isotopique injectée retrouvée dans les fèces 1 mg de [^{15}N]glycine dans 0,5 mL de tampon physiologique ont été injectés à des groupes de 6 rats via la veine caudale après 8 jours de régime enrichi en thé noir. Les fèces ont été analysées après 4 jours supplémentaires de ce régime.

(★= p<0,05)



	Méthodes d'étude associées
Complexes en solution	R.M.N., cristallographie Microcalorimétrie Dialyse à l'équilibre Inhibition enzymatique Fluorescence
Précipitation	Titration turbidimétrique, Marquage radioactif des protéines.

Figure 5 : Complexation réversible des protéines par les polyphénols en solution (d'après Haslam et Lilley, 1988)

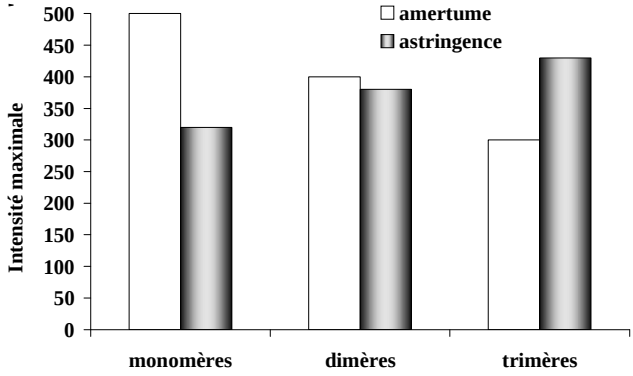


Figure 6 : Influence de la polymérisation des tanins sur les sensations gustatives qu'ils provoquent (d'après Cheynier, 2000)
(panel de 18 juges, moyenne de 2 répétitions)

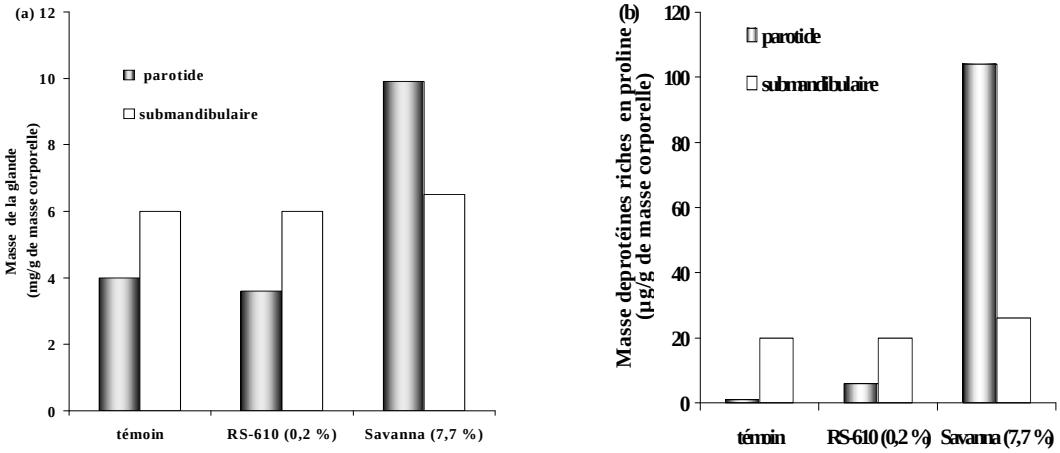


Figure 7 : Effet de 3 jours d'un régime hautement enrichi en sorgho sur (a) la masse de glandes sécrétrices de salive et sur (b) le contenu en protéines riches en proline de cette dernière (d'après Mehansho *et al.*, 1985)

Moyenne des valeurs obtenues pour 5 rats. En abscisse : variété (entre parenthèses le pourcentage de tannins dans la plante, en g / 100 g de matière humide)

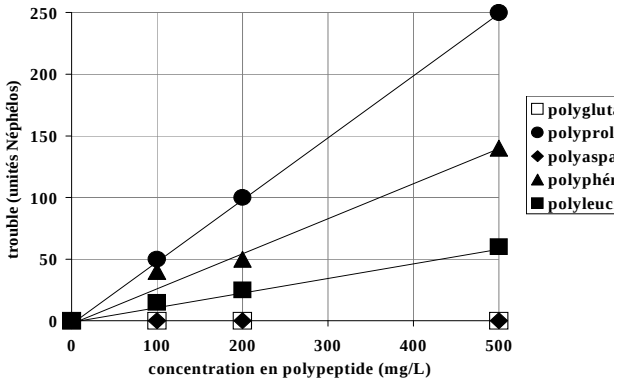


Figure 8 : Trouble formé dans des mélanges de peptides homopolymériques avec de la (+)-catéchine (60 mg/L), placés 30 minutes à 80°C et à pH = 4,2 (d'après Siebert *et al.*, 1996)

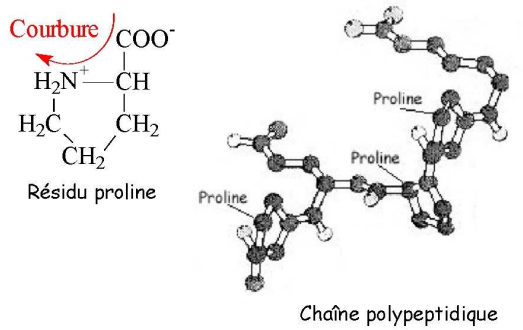


Figure 9 : Particularité du résidu proline: un hétérocycle rigide imprimant une courbure aux chaînes polypeptidiques.

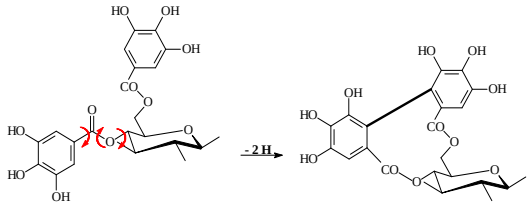


Figure 10 : Diminution de la flexibilité conformationnelle du D-galloyl-glucose.

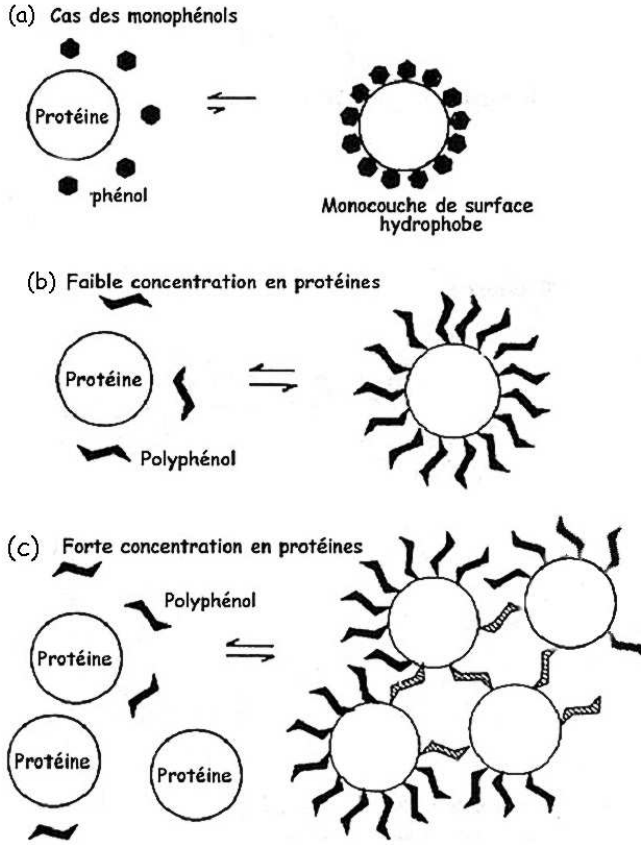


Figure 11 : Influence de la concentration des protéines et de la nature du polyphénol sur la complexation, l'agrégation et la précipitation des protéines (d'après Haslam et Lilley, 1988)

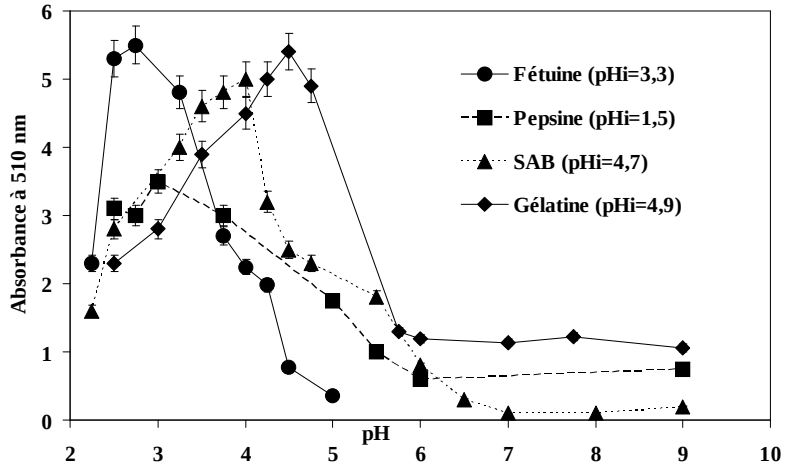


Figure 12 : Influence du pH sur la formation de complexes (turbidimétrie) entre des tanins et différents types de protéines (d'après Naczk *et al.*, 1996)

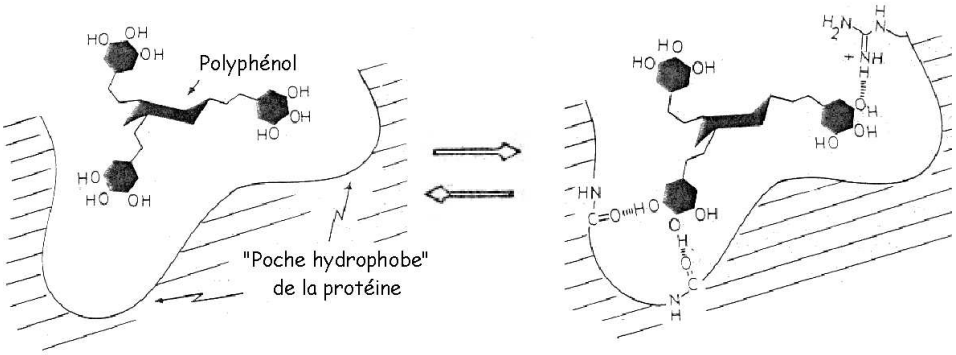


Figure 13 : Proposition d'un modèle moléculaire de la complexation réversible des protéines (d'après Spencer *et al.*, 1988)

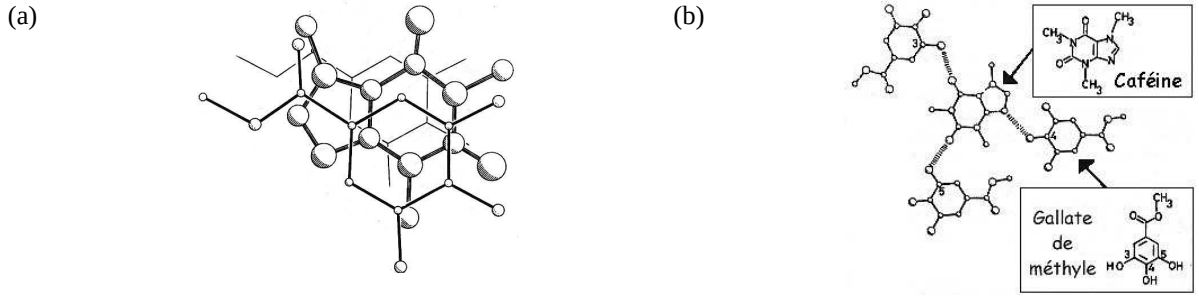


Figure 14 : Structure cristalline des complexes caféine-gallate de méthyle (a) : empilement des cycles, (b) interactions entre les différentes molécules (d'après Haslam et Lilley, 1988)

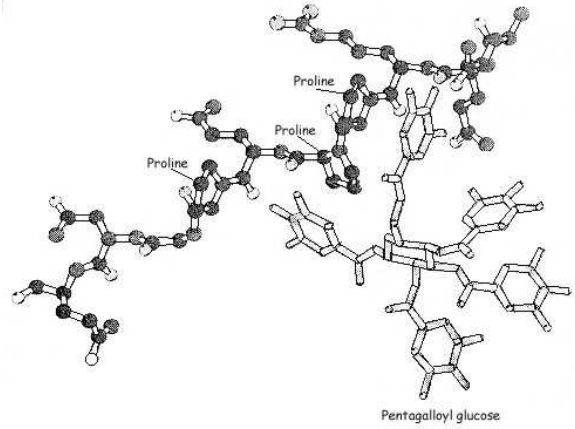


Figure 15 : Modèle d'association entre le pentagalloyl glucose et les résidus prolines d'un peptide modèle (d'après Baxter *et al.*, 1997)

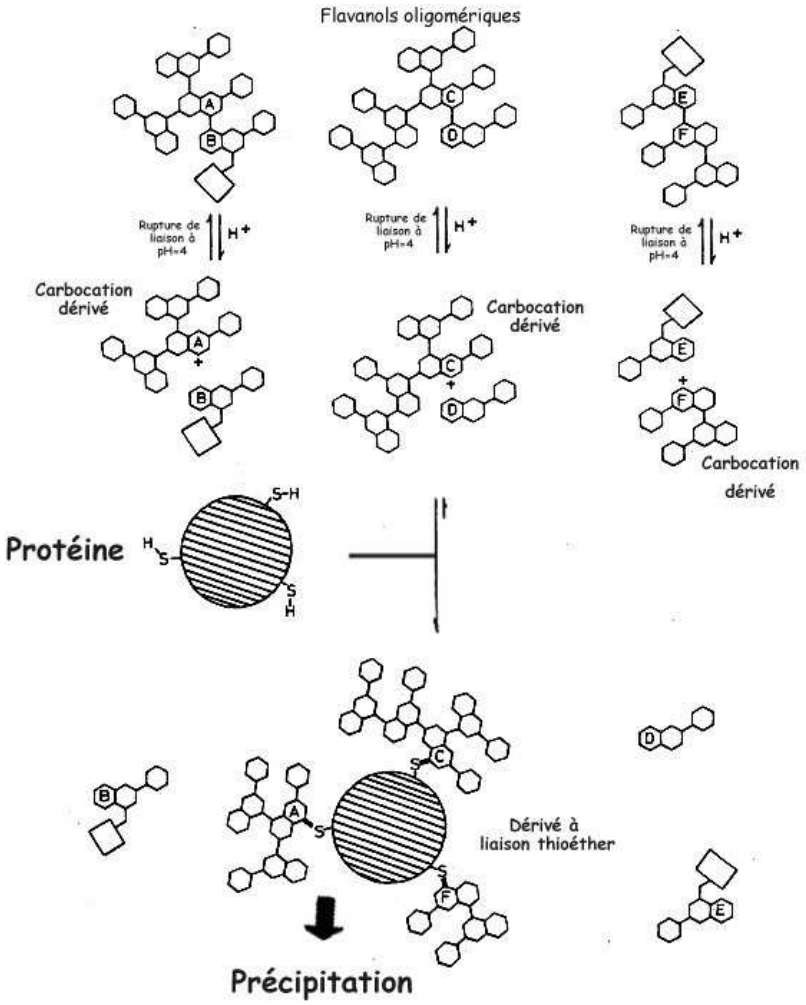


Figure 16 : Réaction en milieu acide des flavanols oligomériques avec les groupements SH des protéines : Formation du trouble permanent de la bière (d'après Haslam et Lilley, 1988)

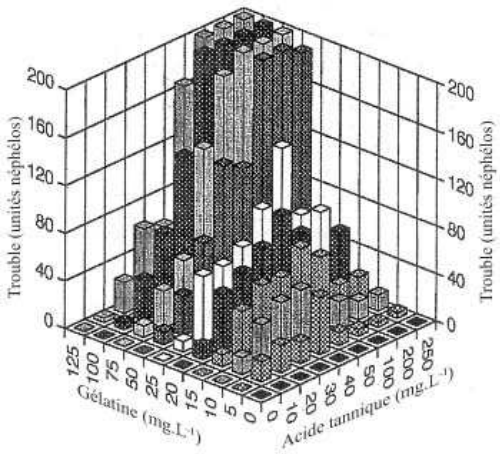


Figure 17 : Trouble produit lors du mélange de différentes concentrations de gélatine et d'acide tannique dans un tampon phosphate de potassium 0,02 mol/L, pH 4 (30 minutes, 25°C) (d'après Siebert *et al.*, 1996)

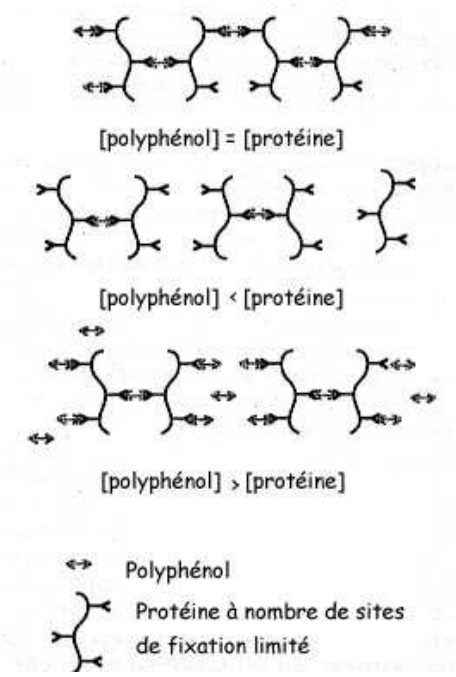


Figure 18 : Modèle de complexation protéines - polyphénols en solution (d'après Siebert et al., 1996)

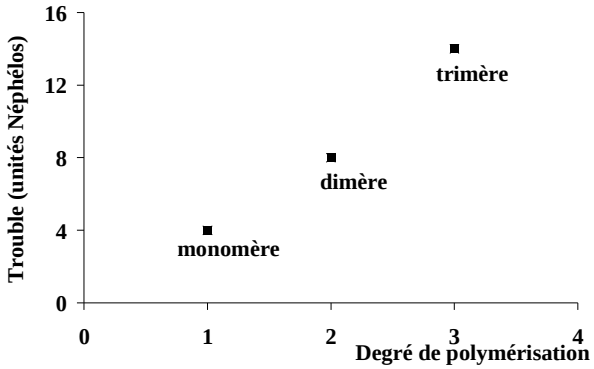


Figure 19 : Effet du degré de polymérisation de polymères de (+) catéchine sur le trouble de la bière (d'après Siebert, 1999)

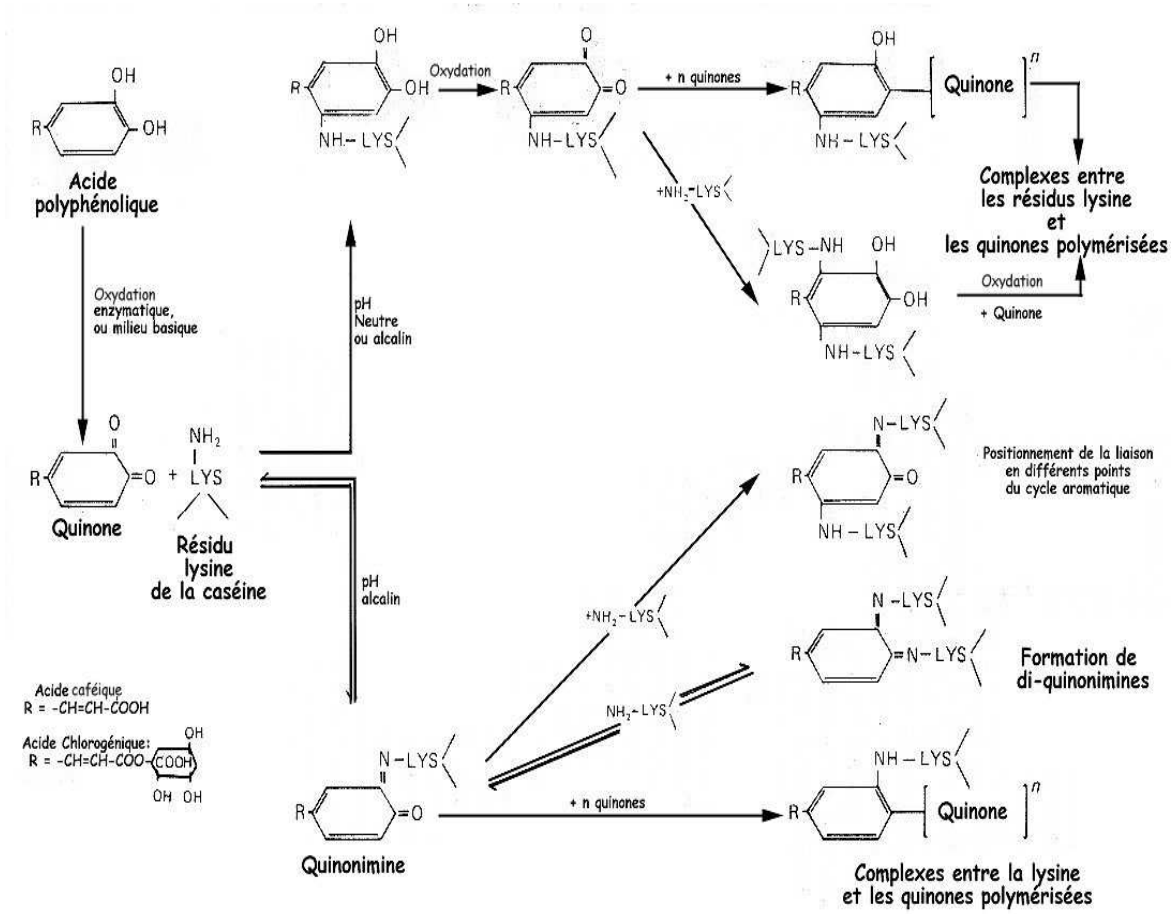


Figure 20 : Quelques réactions susceptibles de se produire entre les résidus lysine de la caséine et l'acide chlorogénique ou l'acide caféique à pH≥7 (d'après Hurell *et al.*, 1982)

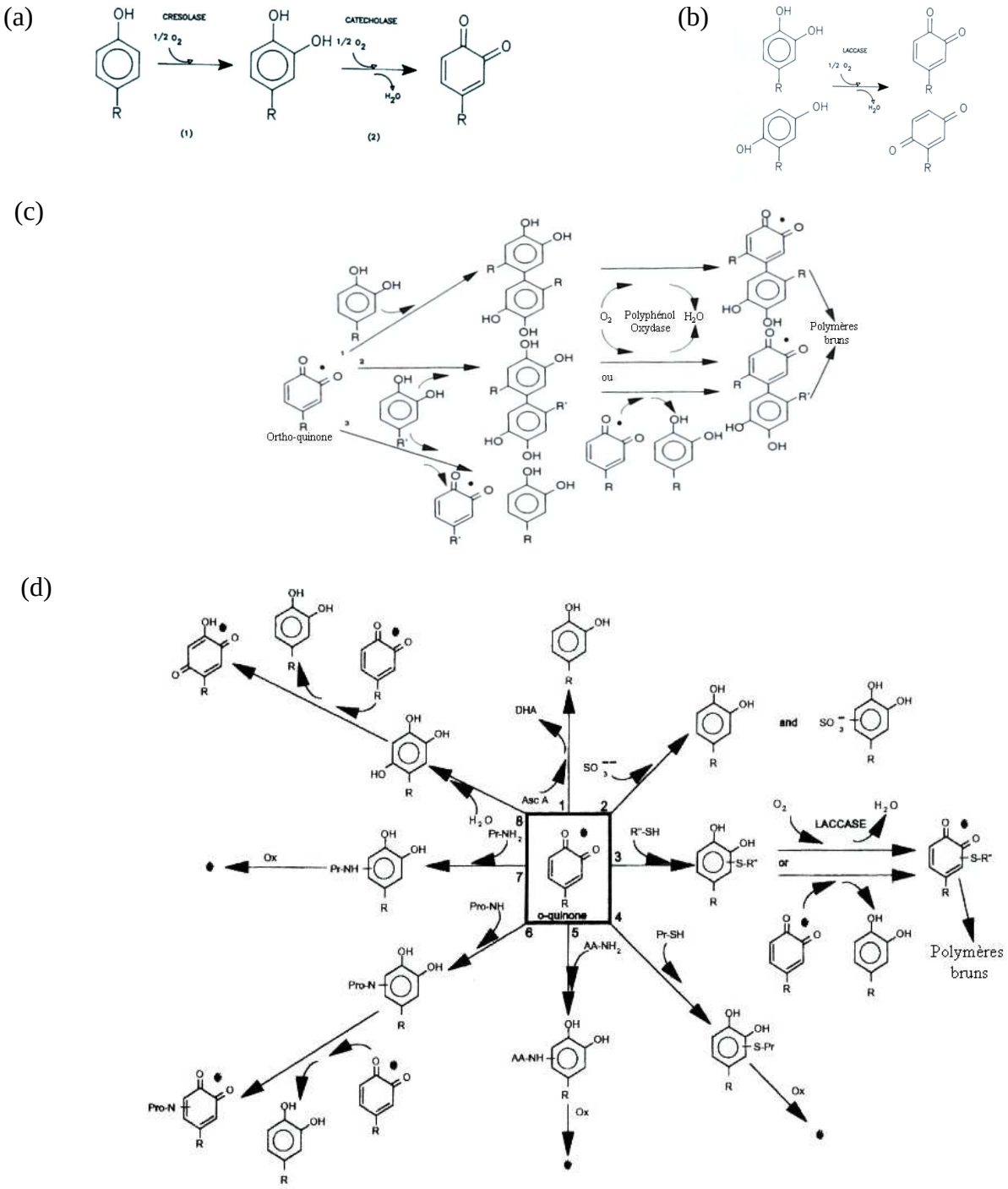
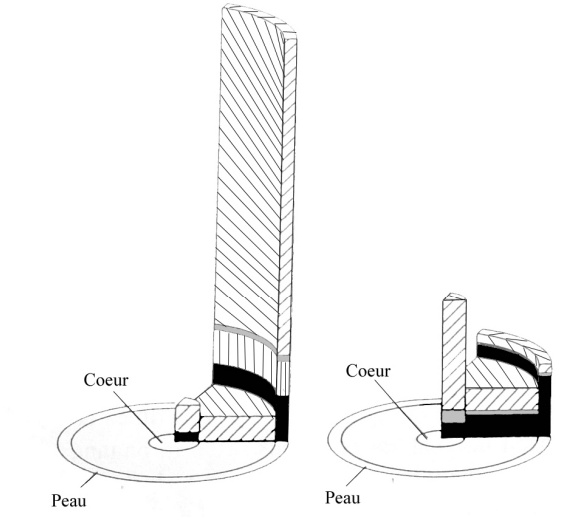


Figure 21 : Les différentes réactions d'oxydation catalysées par les polyphénol oxidases (d'après Nicolas *et al.*, 1994)

(a) : hydroxylation d'un monophénol en *o*-diphénol, suivie de sa déshydrogénation en *o*-quinone. (b) : Réactions catalysées par les laccases. (c) Réactions non enzymatiques des *o*-quinones avec les composés phénoliques. (d) Réactions non enzymatiques des *o*-quinones avec les composés non phénoliques

* : composé coloré ; Ox : réaction d'oxydation ultérieures avec l'oxygène ou les *o*-quinone ; Pr-SH et Pr-NH_2 : protéines ; pro-NH : proline ; AA-NH_2 :acides aminés ; ASC A : acide ascorbique ; DHA : acide déhydroascorbique ; R''SH : petits composés thiol (cystéine, glutathion).



Poire “Comtesse de Paris” Pomme “Jonathan”

Figure 22 : Localisation tissulaire des composés phénoliques dans les fruits charnus (d’après Macheix *et al.*, 1990)

hachures : acide caféoyl-quinique, en gris : acide *p*-coumaroyl-quinique, rayures verticales : *para*-coumaroyle-malate, en noir : (+)-catéchine

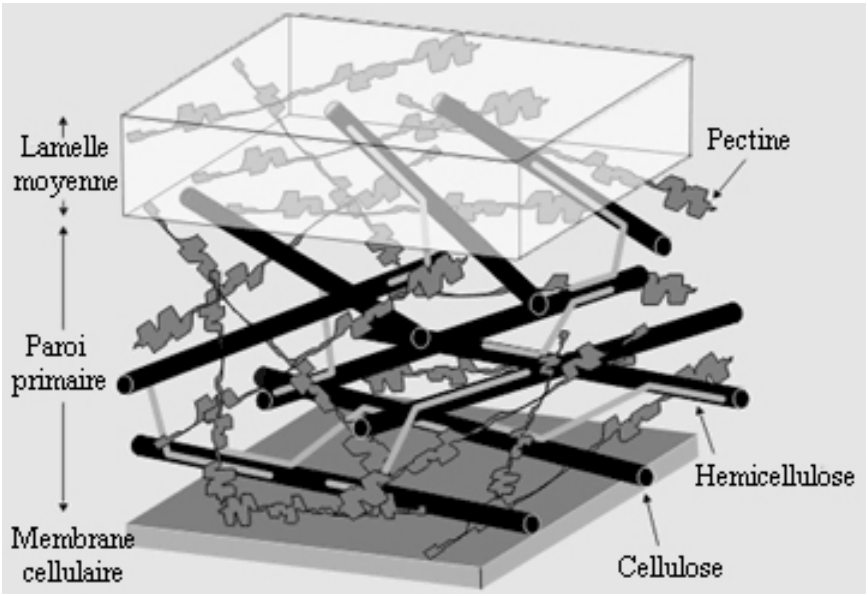
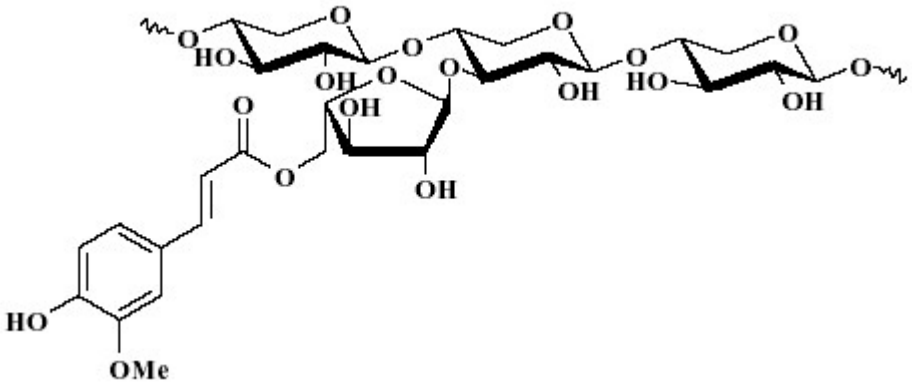


Figure 23 : structure de la paroi végétale primaire (d’après McCann et Roberts, 1991)

(a)



(b)

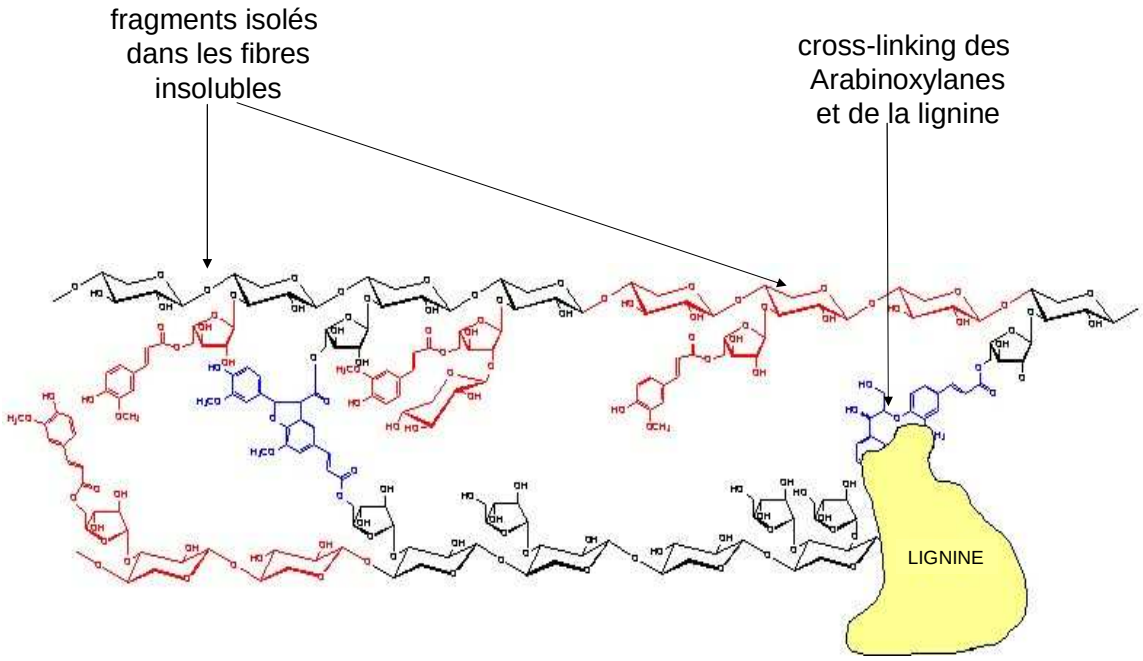
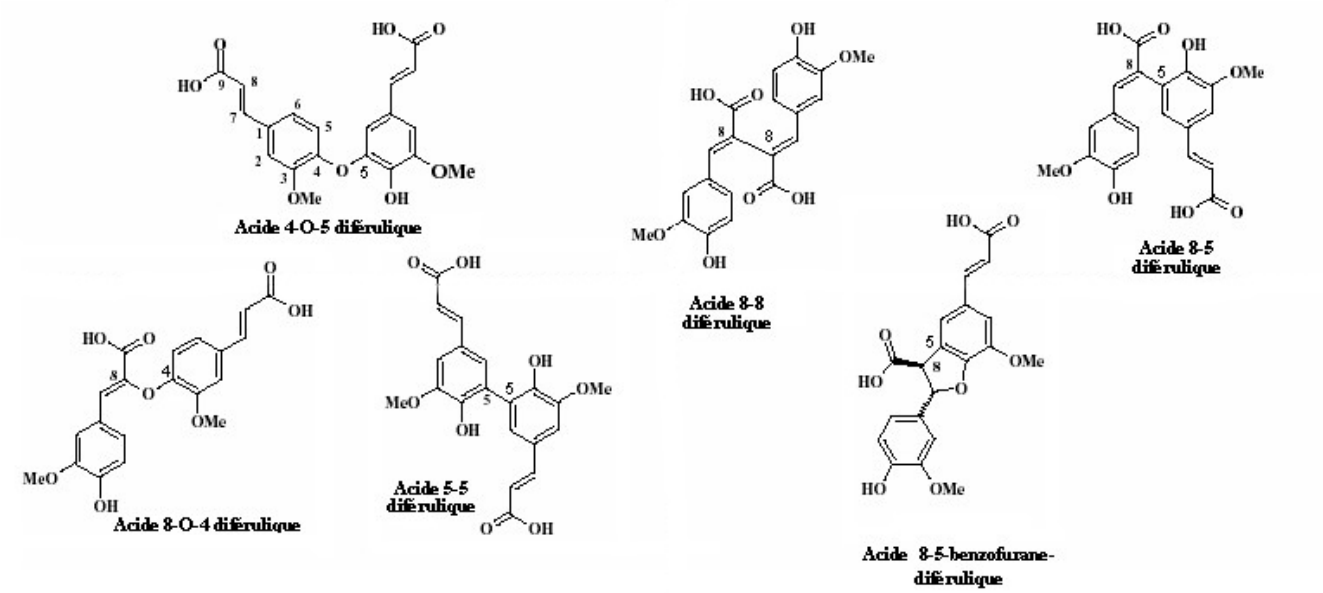
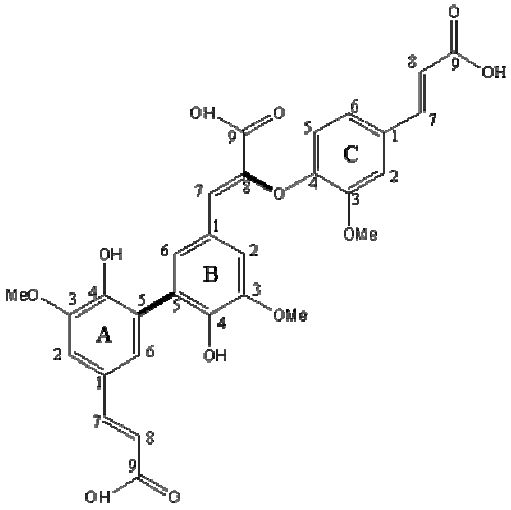
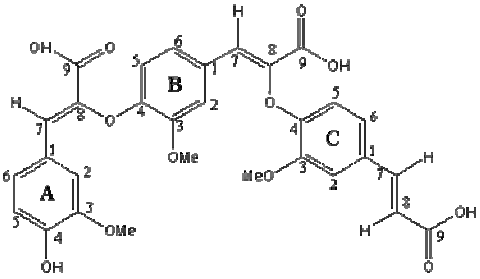


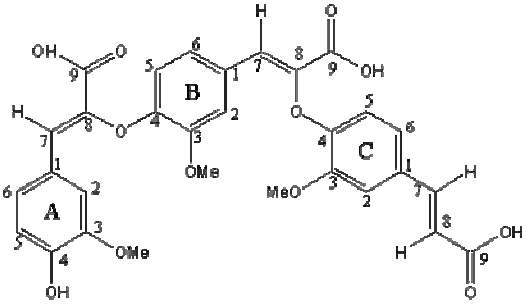
Figure 24 : (a) liaison de l'acide férulique aux arabinoxylanes ; (b) Modèle structurel de l'interconnexion des arabinoxylanes du seigle (d'après Bunzel *et al.*, 2002 ; Bunzel *et al.*, 2004)







Acide 8-O-4 /8-O-4 déhydrotriférulique



Acide 5-5/8-O-4 déhydrotriférulique **Acide 8-8 /8-O-4 déhydrotriférulique**

Figure 25 : Structures chimiques des acides diféruliques et triféruliques des fibres (d'après Bunzel *et al.*, 2001 ; Bunzel *et al.*, 2003 ; Funk *et al.*, 2005)

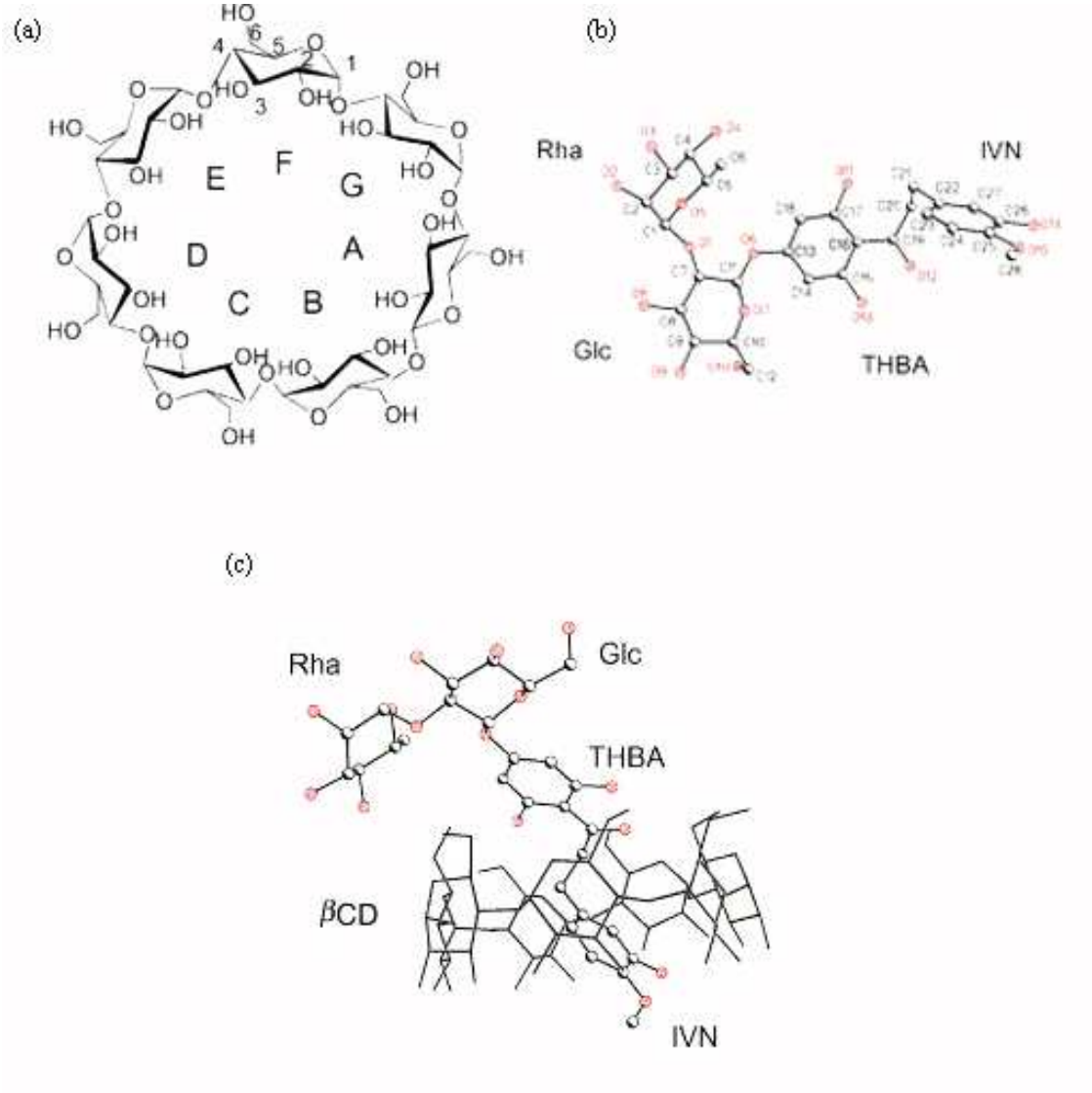


Figure 26 : Complexe néohespéridine dihydrochalcone / β-cyclodextrine (d'après Haslam et Lilley, 1988 ; Malpezzi *et al.*, 2004)

(a) β-cyclodextrine; (b) néohespéridine dihydrochalcone (c) organisation du complexe (Rha : Rhamnose ; Glc : Glucose ; THBA : acide trihydrobenzoïque ; IVN : isovaniline)

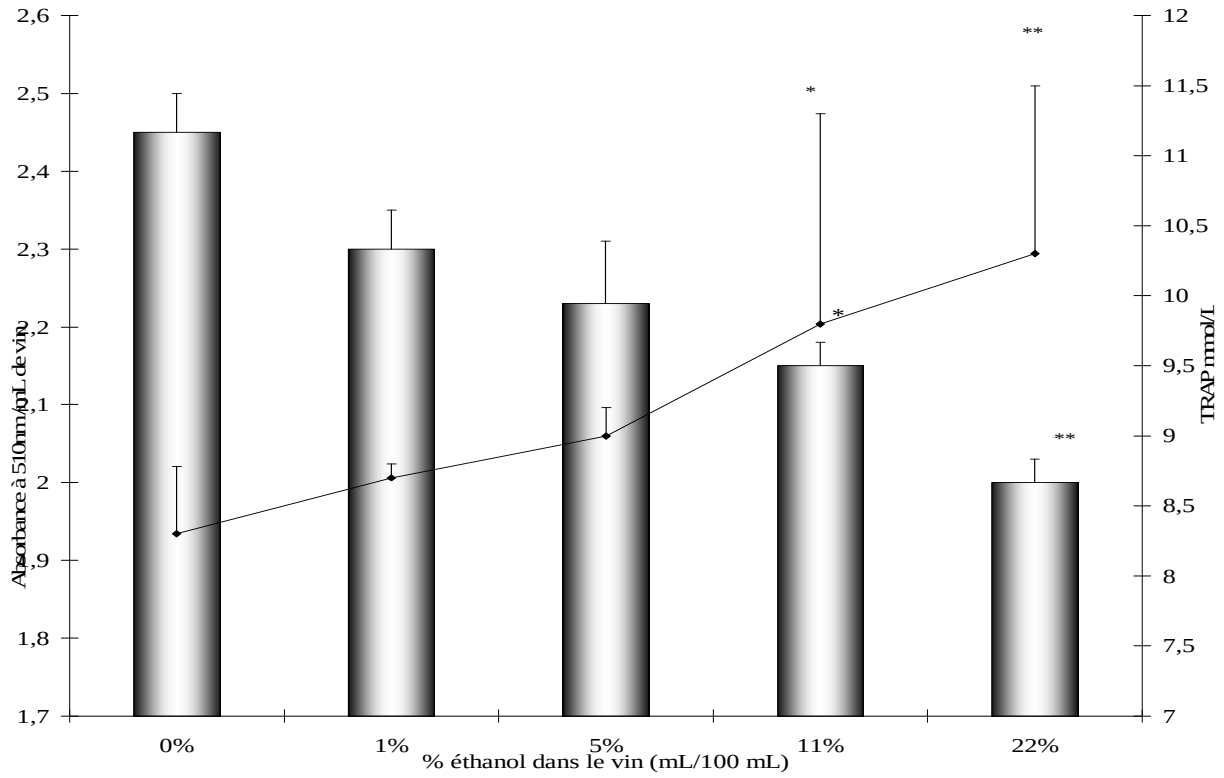


Figure 27 : Effet de l'éthanol sur la précipitation des tanins du vin rouge par la sérum albumine bovine, évaluée par l'absorbance de la solution à 510nm après centrifugation, et effet de l'éthanol sur le pouvoir antioxydant de ces mêmes fractions évalué par le test TRAP (d'après Serafini *et al.*, 1997)

p<0,05 ; ** :p<0,01.

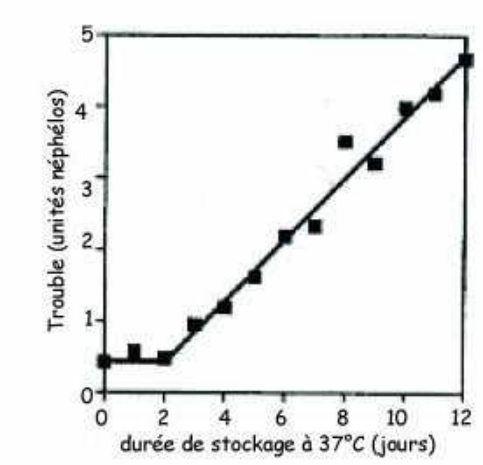
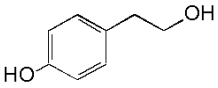
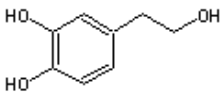


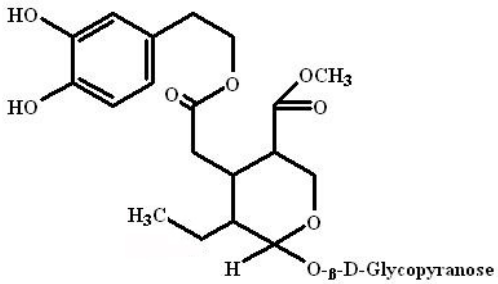
Figure 28 : Cinétique d'apparition du trouble permanent de la bière (d'après Siebert, 1999)



tyrosol



hydroxytyrosol



oleuropéine

Figure 29 : Structure chimique des polyphénols de l'huile d'olive

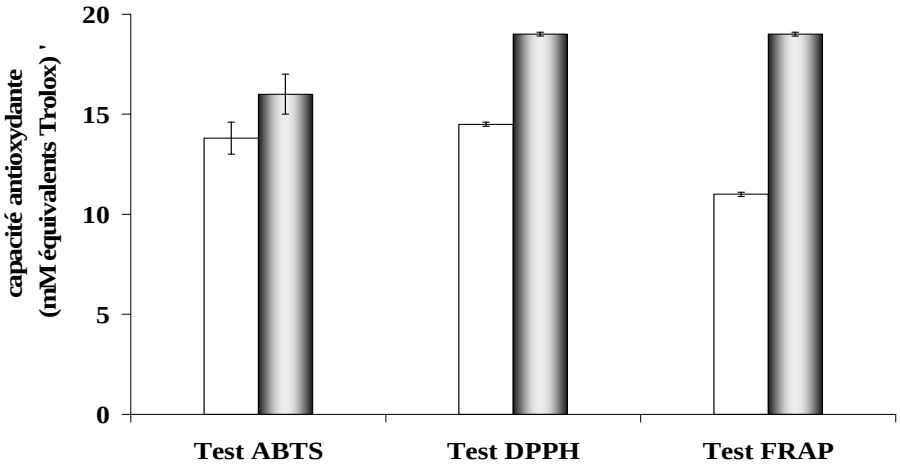


Figure 30 : Effet du procédé d'extraction des composés phénoliques sur le pouvoir antioxydant du jus de pamplemousse, évalué par trois tests différents (d'après Gil *et al.*, 2000)

En blanc : procédé domestique, en gris : procédé industriel.
Les jus ont été ajustés à 16,6% de matière sèche

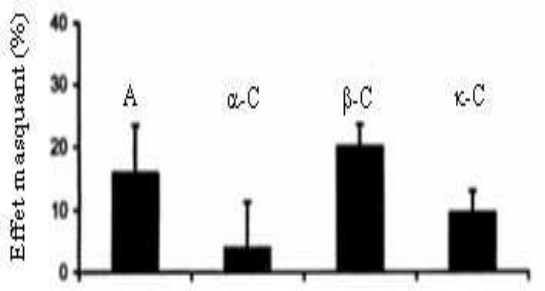


Figure 31 : Effet masquant de diverses protéines sur le pouvoir antioxydant de la (+)-catéchine (d'après Arts *et al.*, 2002)

albumine (A), α-caséine (α-C, 0,075 % en proline), β-caséine (β-C, 0,156 % en proline) et κ-caséine (κ-C, 0,105 % en proline)

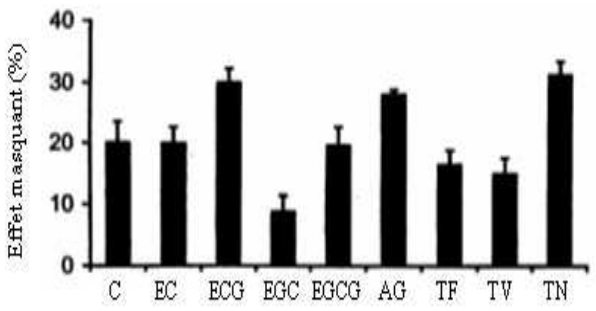


Figure 32 : Effet masquant de la β-caséine sur le pouvoir antioxydant de divers polyphénols du thé (d'après Arts *et al.*, 2002)

C : (+)-catéchine, EC : (-)-épicatéchine, ECG : (-)-épicatéchine gallate, EGC : (-)-épigallocatéchine, EGCG : (-)-épigallocatéchinegallate, AG : acide gallique, TF : théaflavines, TV : thé vert, TN : thé noir

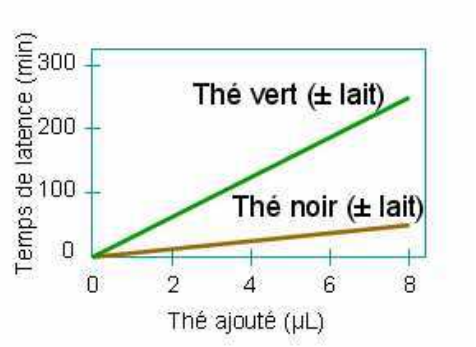


Figure 33 : Pouvoir antioxydant de solutions de thé, vert ou noir, auxquelles sont ajoutés ou non 25 % de lait (d'après Serafini *et al.*, 1996)

Test TRAP : plus la pente de la droite temps de latence=f(concentration en thé ajoutée) est importante, plus élevé est le pouvoir antioxydant.

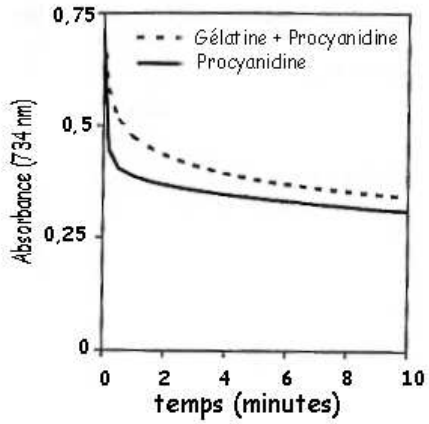
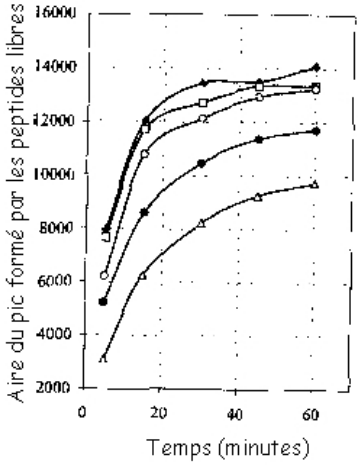


Figure 34 : Effet de la gélatine sur le captage de l'Acide 2, 2'-azinobis (3-éthylBenzoThiazoline 6-Sulfonique) .+ par les procyanidines à pH 4,9 (d'après Riedl et Hagerman, 2001)

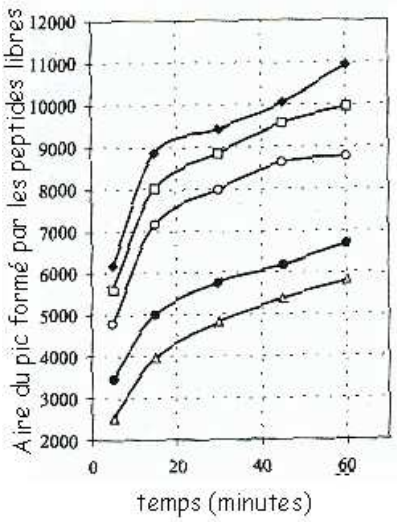
100µL d'ABTS**.+** (54,4 nmoles) ont été ajoutés soit à 900 µL de procyanidines (0,609 nmole, 3 µg), soit à un mélange contenant 3 µg de procyanidine et 0,092 nmoles (6 µg) de gélatine à t = 0.

La variation d'absorbance à 734 nm due à la transformation de l'ABTS**.+** en ABTS$^{\circ}$**+** a été suivie à 30°C. Chaque courbe représente la moyenne de trois déterminations.

(a)



(b)



(c)

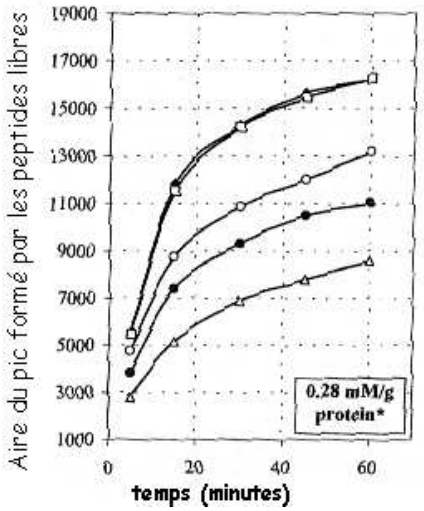


Figure 35 : Susceptibilité à la digestion enzymatique *in vitro* de dérivés myoglobine/acides phénoliques. (a) : Digestion trypsique ; (b) : Digestion chymotrypsique ; (c) Digestion pepsique (d'après Kroll *et al.*, 2000)

-◆- témoin: myoglobine seule ; -□- dérivé myoglobine/acide quinique -○- dérivé myoglobine/acide chlorogénique -●- dérivé myoglobine/acide caféique -△- dérivé myoglobine/*p*-quinone

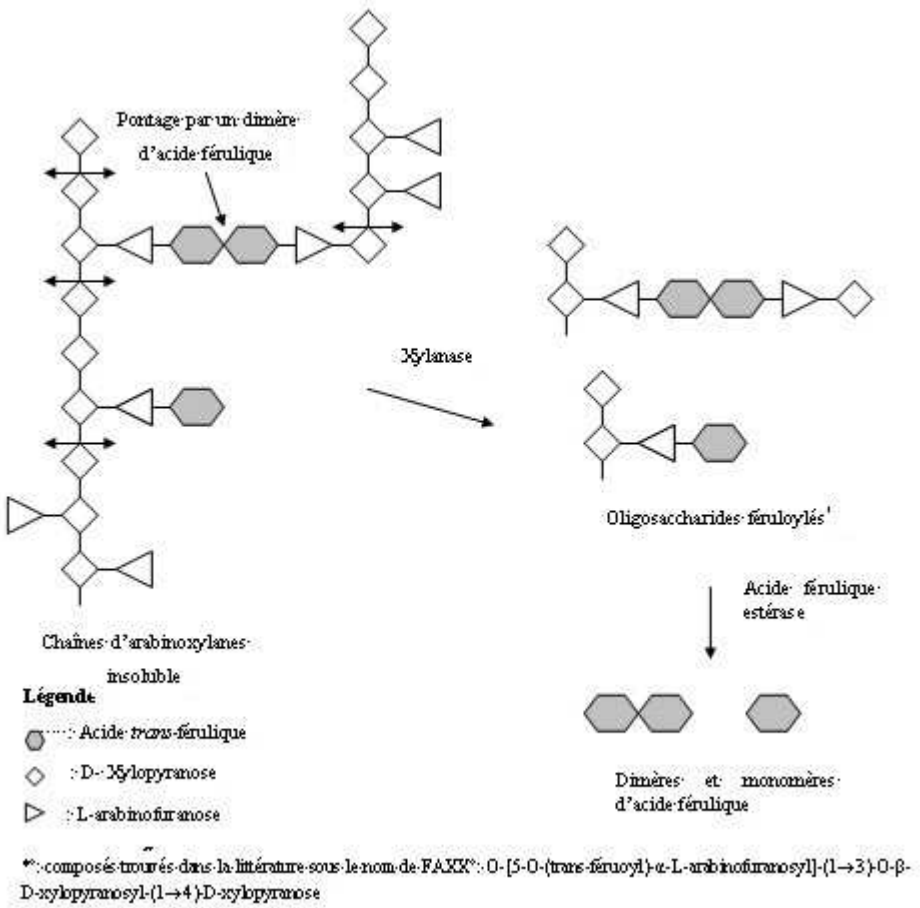


Figure 36 : Hydrolyse des fibres par la flore intestinale (d'après Kroon *et al.*, 1997)

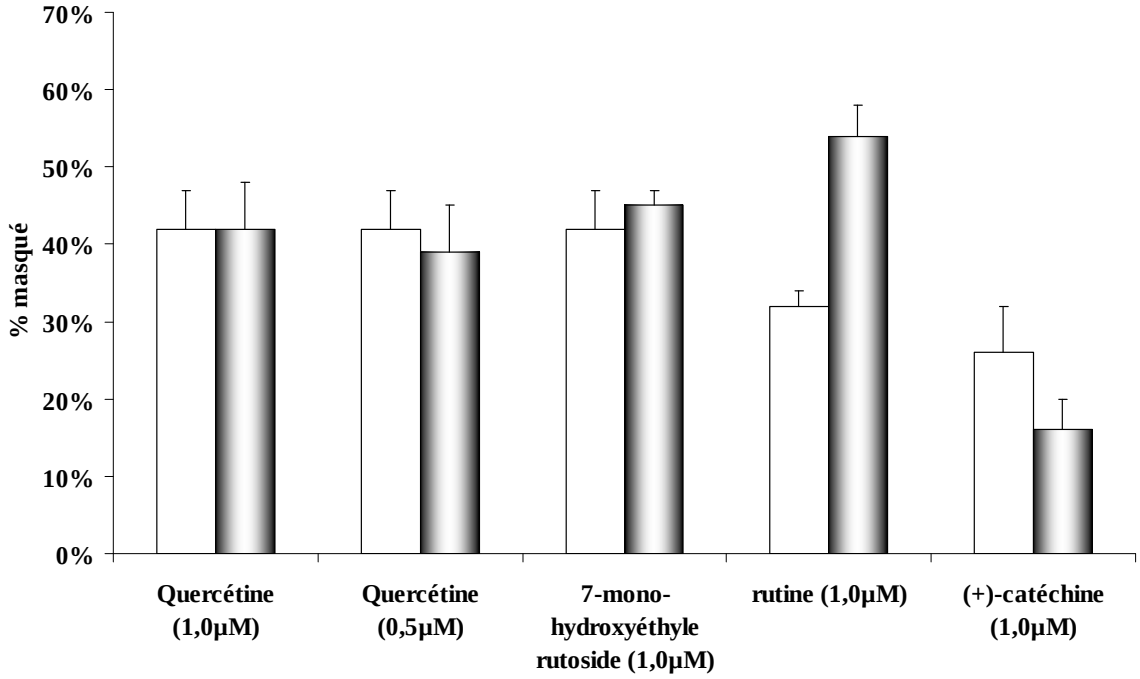


Figure 37 : Masquage du pouvoir antioxydant du plasma acquis suite à un enrichissement en polyphénols par liaison à l'albumine (d'après Arts *et al.*, 2001)

En blanc : polyphénols ajoutés à du plasma, en gris : polyphénols ajoutés à de l'albumine. Pouvoir antioxydant mesuré par le test TEAC. Le masquage est calculé par la différence entre la capacité antioxydante que l'on devrait obtenir théoriquement et celle que l'on obtient expérimentalement.

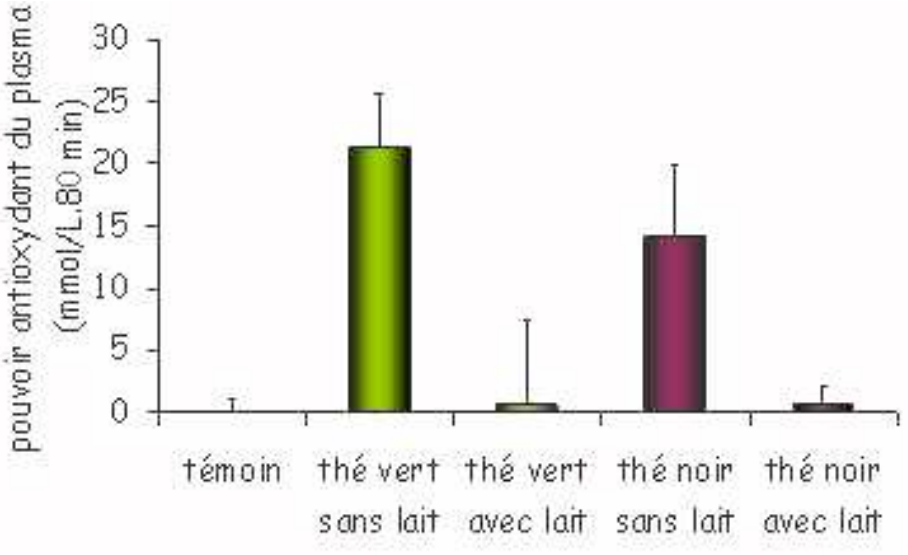


Figure 38 : Activité antioxydante (pouvoir réducteur) moyenne du plasma humain (n=5) après la consommation de thé vert ou noir, en présence ou non de 25% de lait, test FRAP (d'après Serafini *et al.*, 1996)

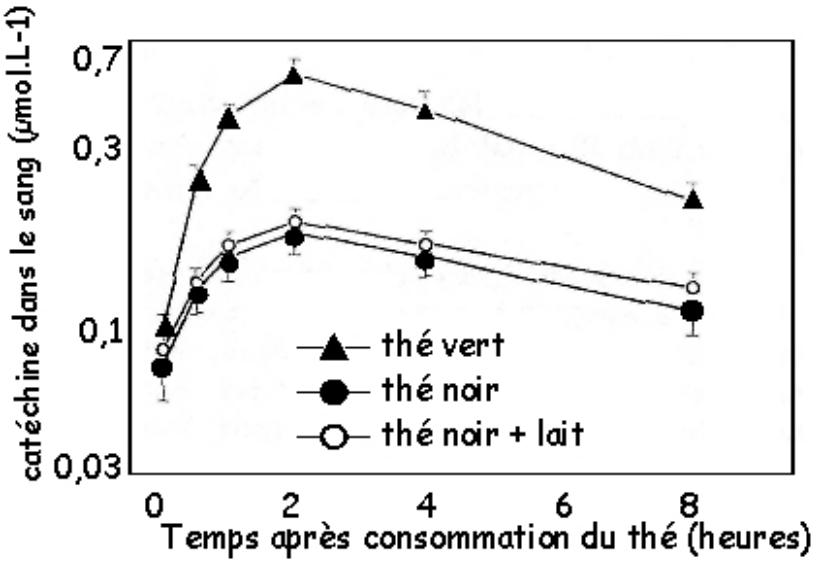


Figure 39 : Concentration totale en (+)-catéchine détectée dans le sang par spectrophotométrie U.V. après ingestion de 600 mL de thé avec ou sans lait (d'après Van Het Hof *et al.*, 1998)
(n = 12)

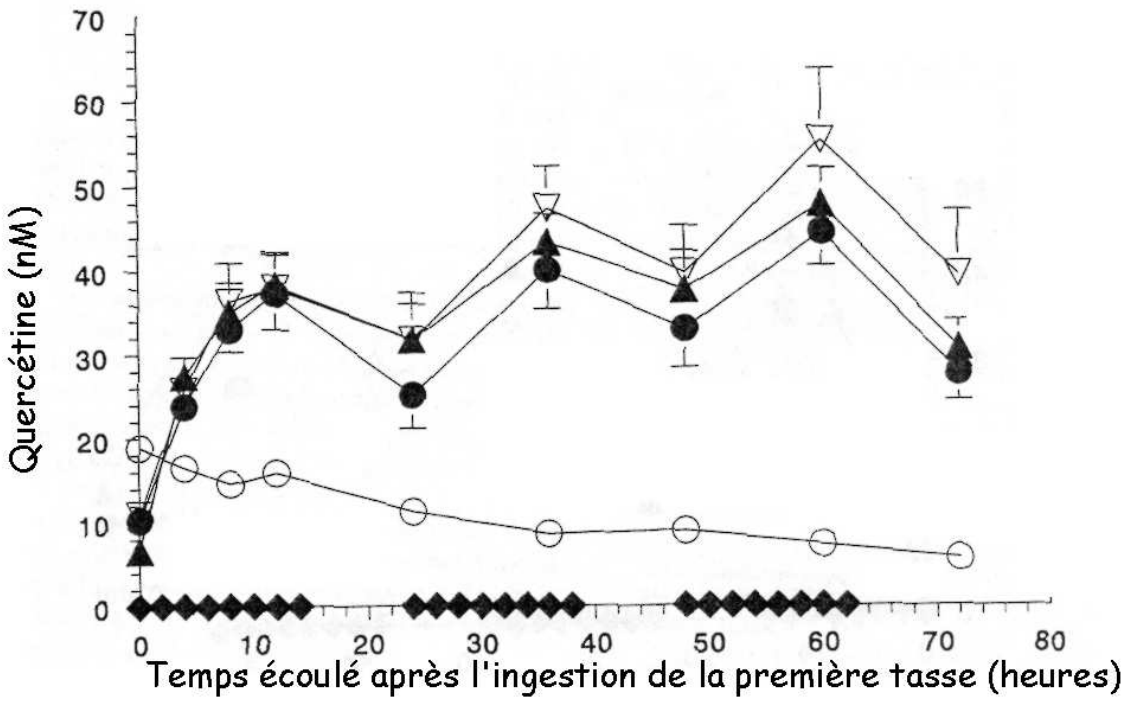


Figure 40 : Concentration en quercétine dans le plasma de 9 sujets humains ayant ingéré du thé noir , du thé noir avec 10 % de lait , du thé vert ou de l'eau, mesurée par CLHP/UV (d'après Hollman *et al.*, 2000)
-▲- : thé noir, -▽- : thé noir avec 10% de lait, -●- : thé vert, -○- : eau.
-◆- indique la consommation d'une tasse de thé ou d'eau

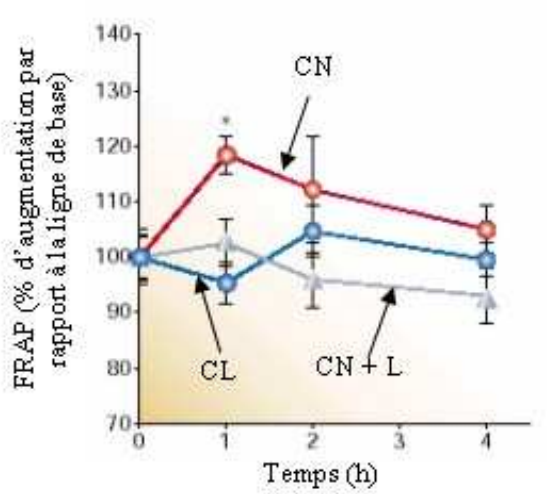
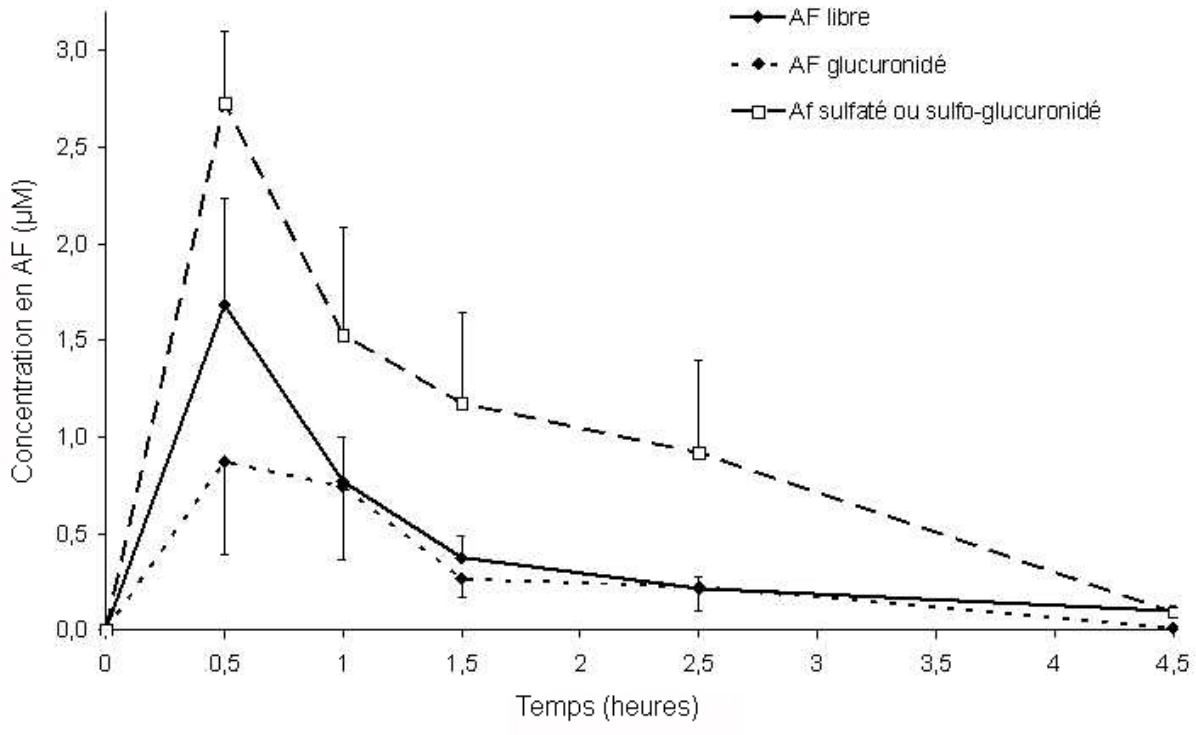


Figure 41 : Activité antioxydante moyenne du plasma humain exprimée en potentiel à réduire les ions ferriques (FRAP) après la consommation de chocolat noir, de chocolat noir avec du lait et de chocolat au lait (d'après Serafini *et al.*, 2003)

Doses : 100 g de chocolat noir (CN), 100 g de chocolat noir et 200 mL de lait (CN + L) et 200 g de chocolat au lait (CL). Les doses à consommer lors de cette étude se sont basées sur le fait que l'extrait de polyphénols de chocolat au lait est *in vitro* deux fois moins antioxydant que l'extrait de chocolat noir (chocolat provenant d'un même batch, délipidation à l'hexane, extraction à l'acétone/eau/acide acétique (70/29,8/0,2 v/v/v),

(a)



(b)

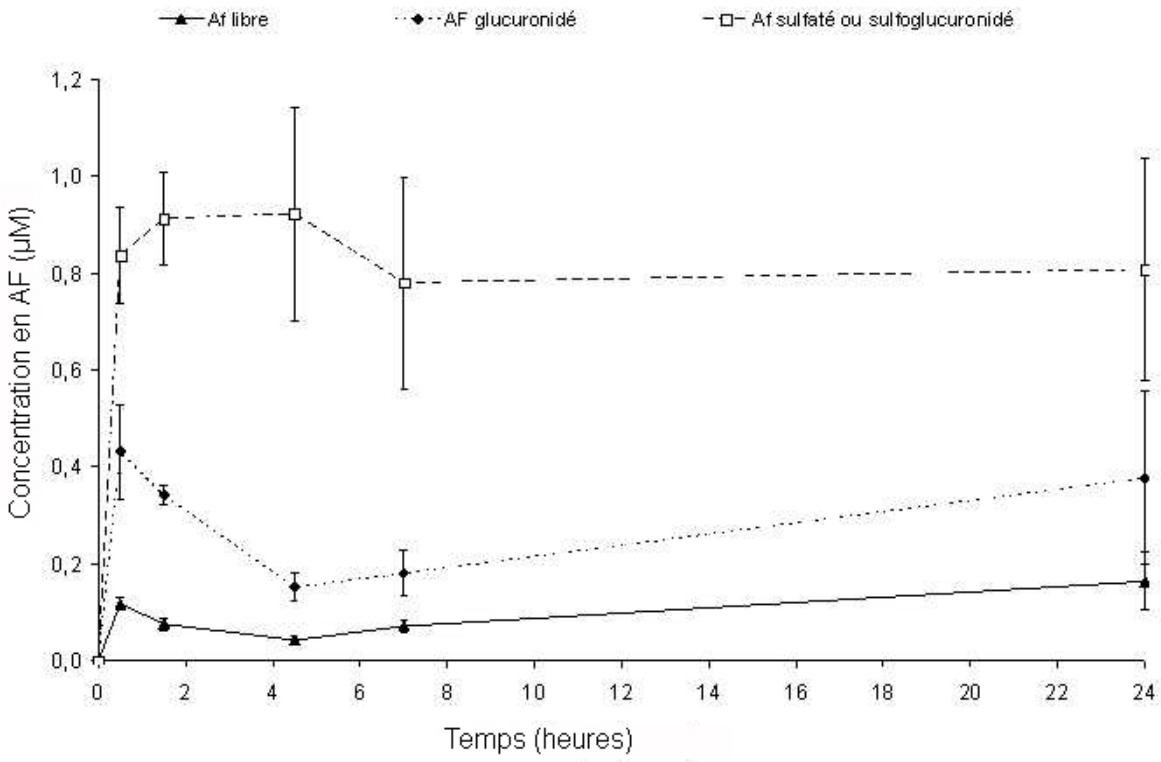
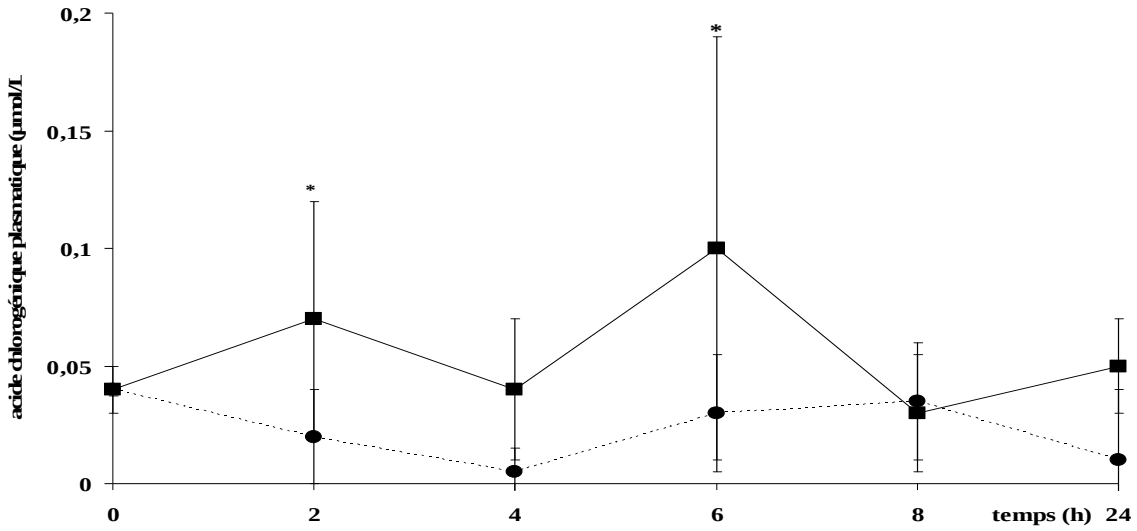


Figure 42 : Cinétiques d'apparition de l'acide férulique et de ses métabolites dans la circulation sanguine après ingestion (a) : de 5,15 mg/kg de masse corporelle d'acide férulique pur ou de (b) d'un aliment contenant 26 % de son de blé apportant 4,04 mg/kg de masse corporelle d'acide férulique (AF), chez le rat (d'après Rondini *et al.*, 2002 ; Rondini *et al.*, 2004)

(a)



(b)

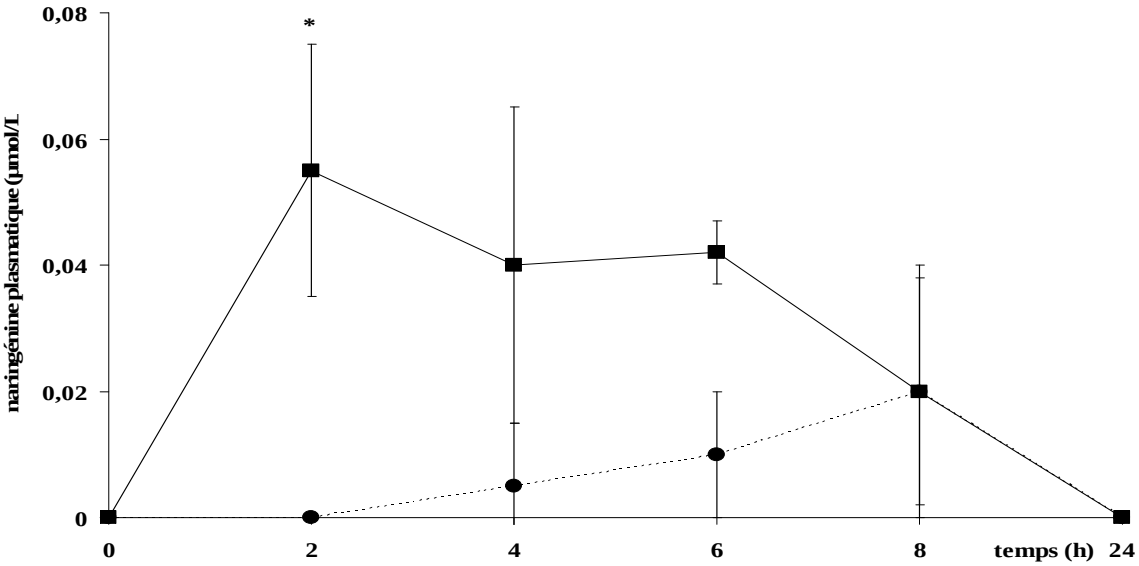


Figure 43 : Quantités d'acide chlorogénique (a) et de naringénine (b) retrouvées dans le plasma chez l'homme, après consommation de 500 g de tomates cerise crues (trait pointillé) ou cuites (15 minutes dans l'eau bouillante, trait plein) dans le cadre d'un repas à base de pâtes (d'après Bugianesi *et al.*, 2004)

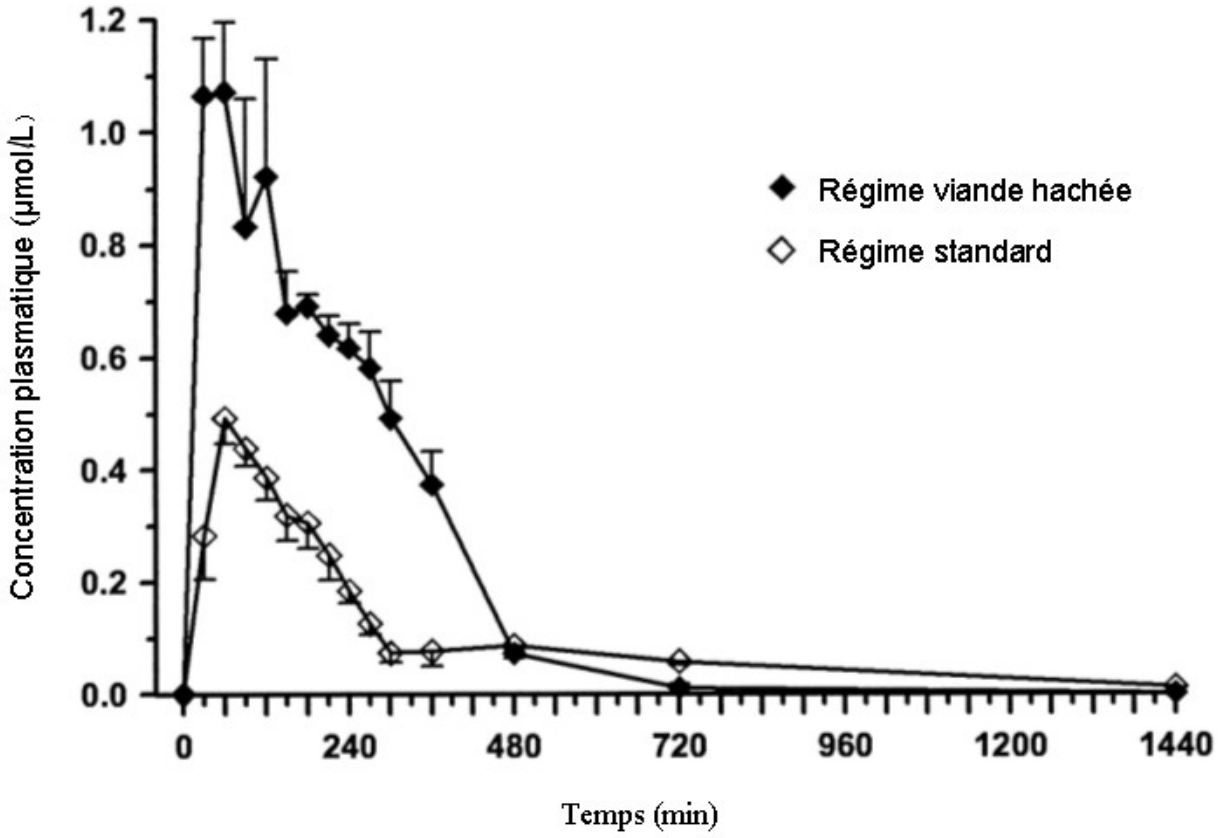


Figure 44 : Concentration plasmatique de la quercétine après ingestion de quercétine-3-O-glucoside avec un repas standard ou avec le même repas contenant 15 g de viande de bœuf hachée contenant 9,5 % de matière grasse chez le porc (d'après Cermak et al., 2003)

n = 3.

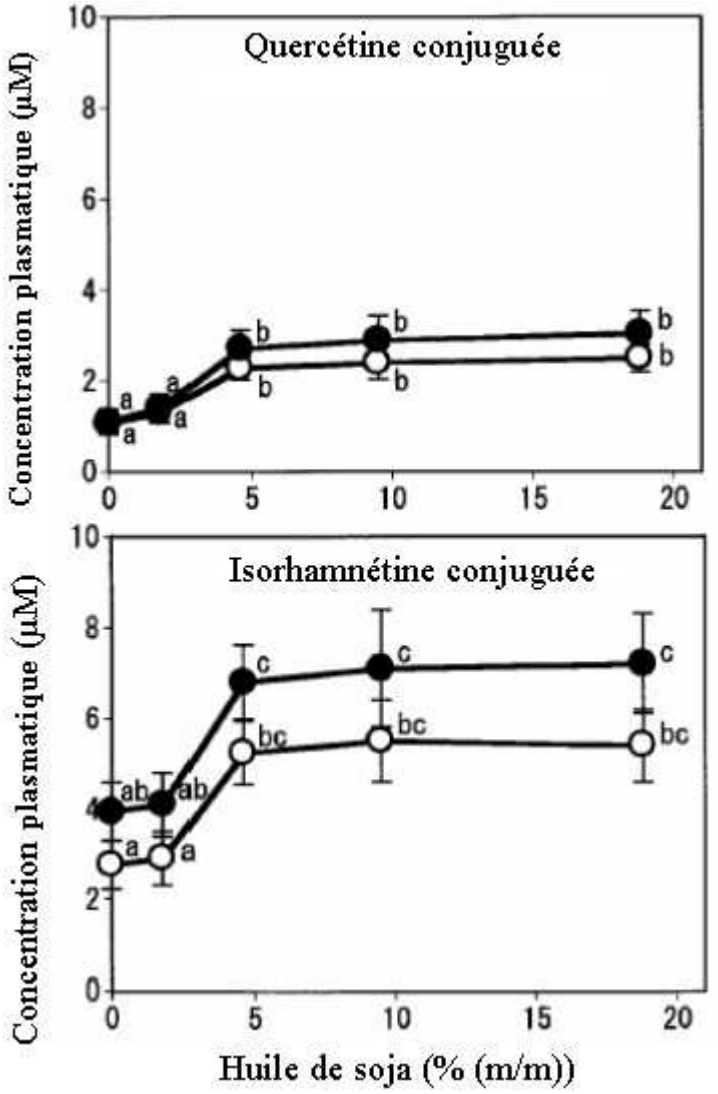


Figure 45 : Concentration plasmatique de la quercétine et de l'isorhamnétine après ingestion chronique d'oignons dans un repas standard contenant des quantités variables d'huile de soja (d'après Azuma *et al.*, 2003)

n = 5, ronds blancs : 1 semaine de régime, ronds noirs : 2 semaines de régime. Tous les échantillons ont subi une hydrolyse enzymatique. ; les lettres indiquent une différence significative lorsqu'elles ne sont pas communes à deux valeurs.

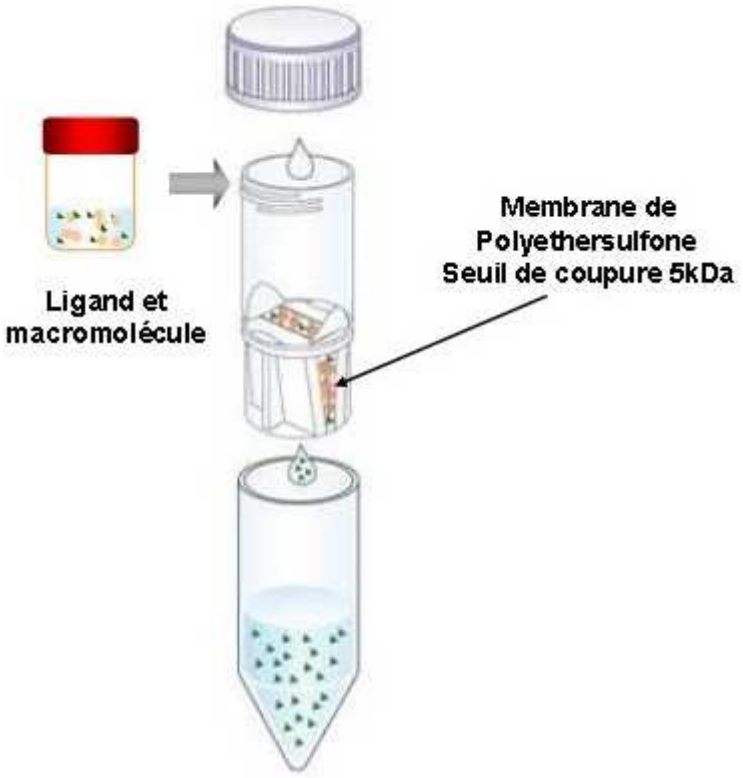


Figure 46 : Schéma du concentrateur Vivaspin 20

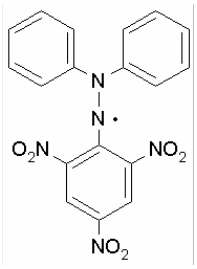


Figure 47 : Structure chimique du 2,2-diphényl 1-pycrilhydrazyl (DPPH°)

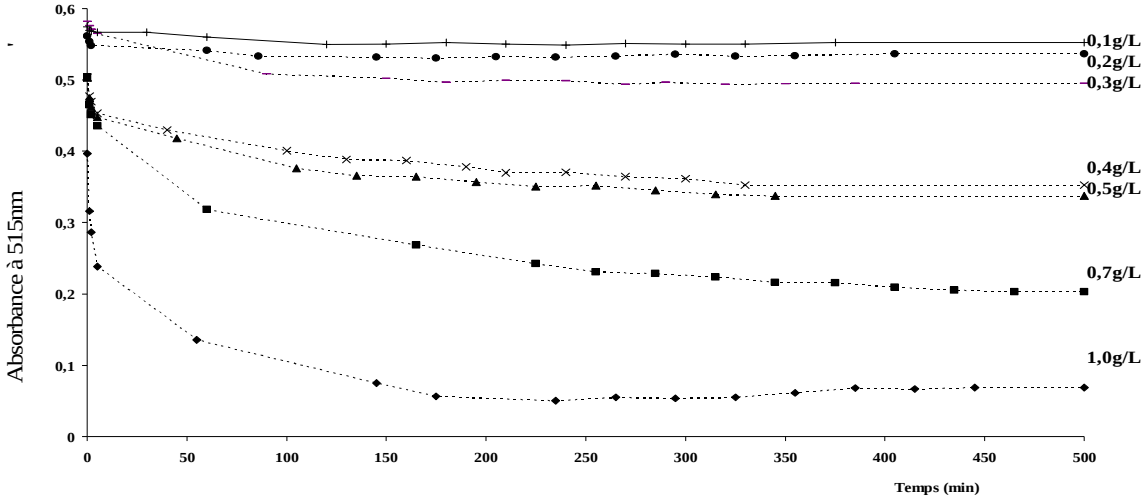


Figure 48 : Evolution de l'absorbance à 515 nm en fonction du temps de solutions contenant du DPPH et différentes concentrations de café

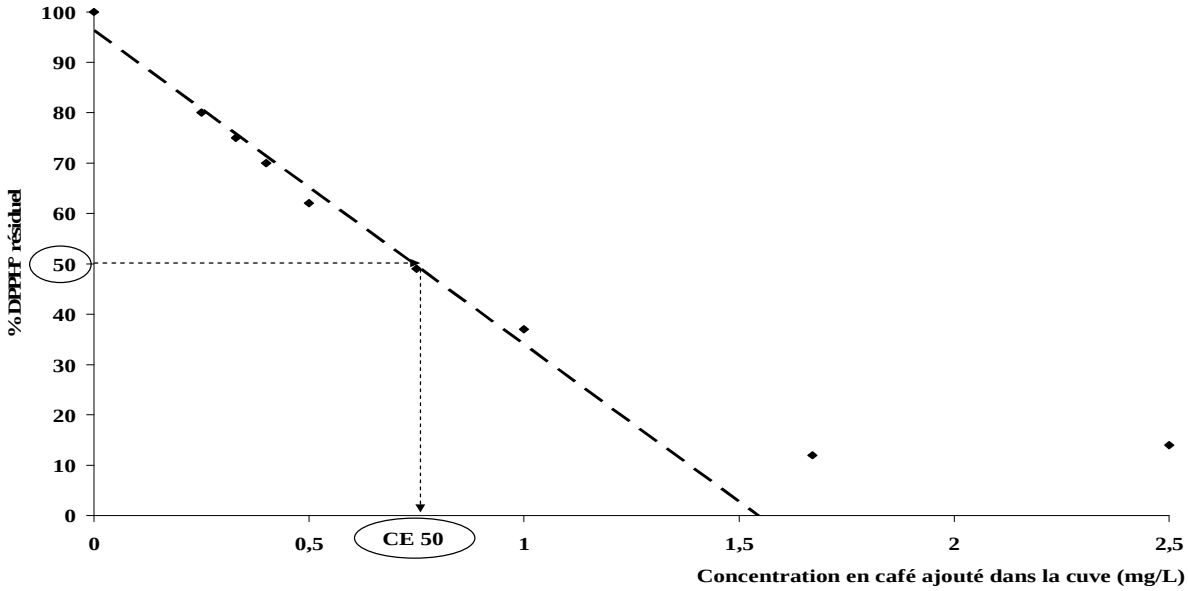


Figure 49 : Courbe effet-dose obtenue pour la mesure du pouvoir antioxydant par le test DPPH

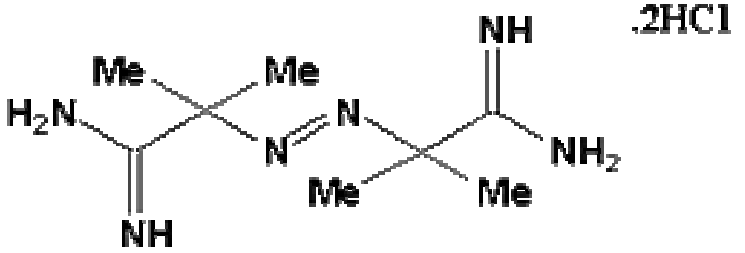


Figure 50 : Structure chimique du 2,2'azo-bis-(2 méthylpropionamide) dihydrochloride (APPH)

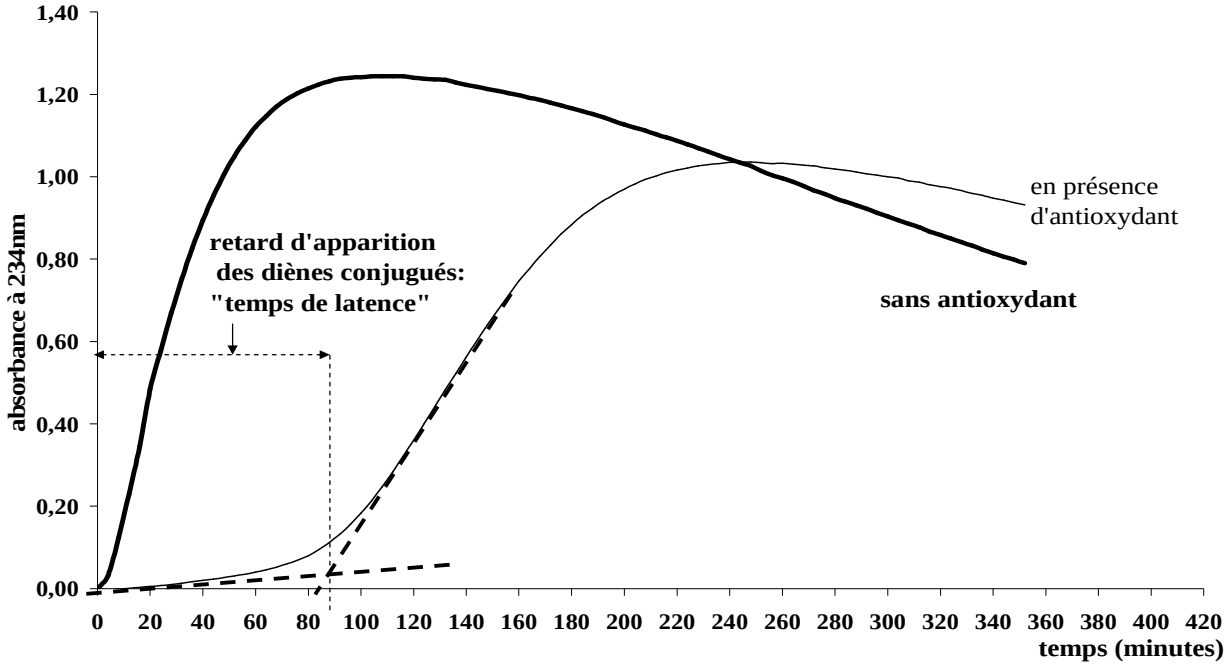


Figure 51 : Cinétiques d'apparition des dienes conjugués dans le test AAPH

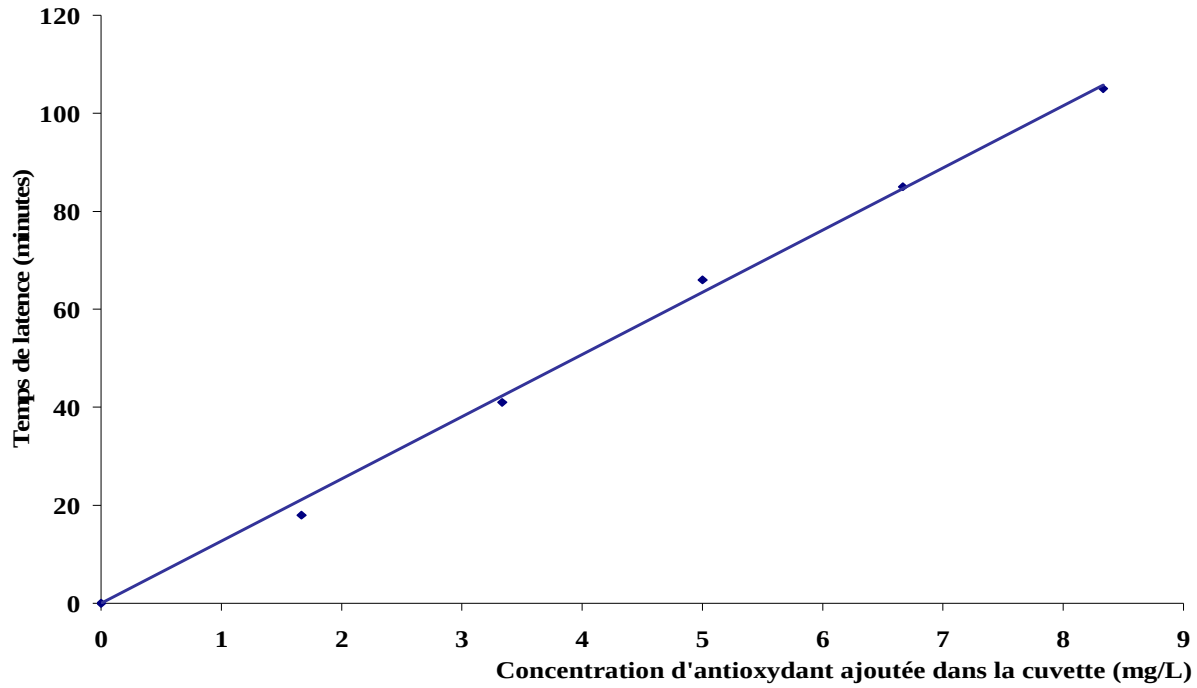


Figure 52 : Courbe dose-réponse obtenue à l'aide de la méthode des tangentes dans le test AAPH

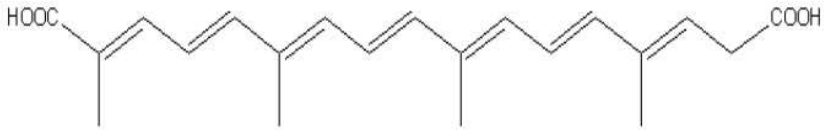


Figure 53 : Structure chimique de la crocine

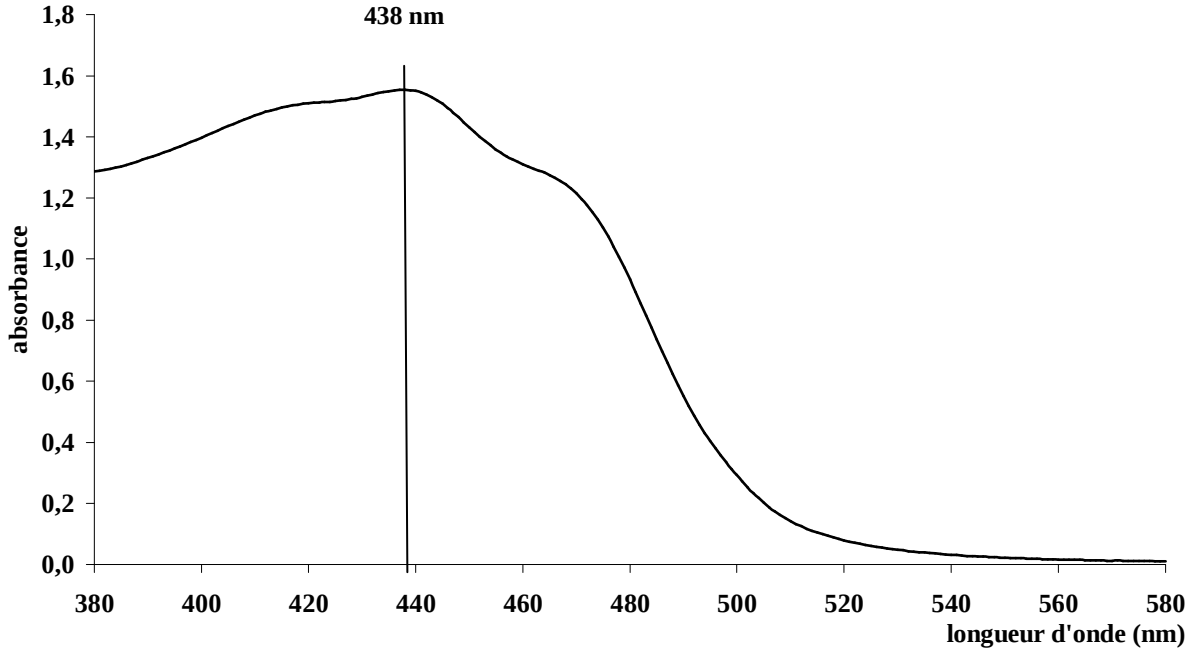


Figure 54 : Spectre d'absorption de l'extrait de crocine dilué dans du tampon phosphate de sodium 10 mmol/L pH 7,4

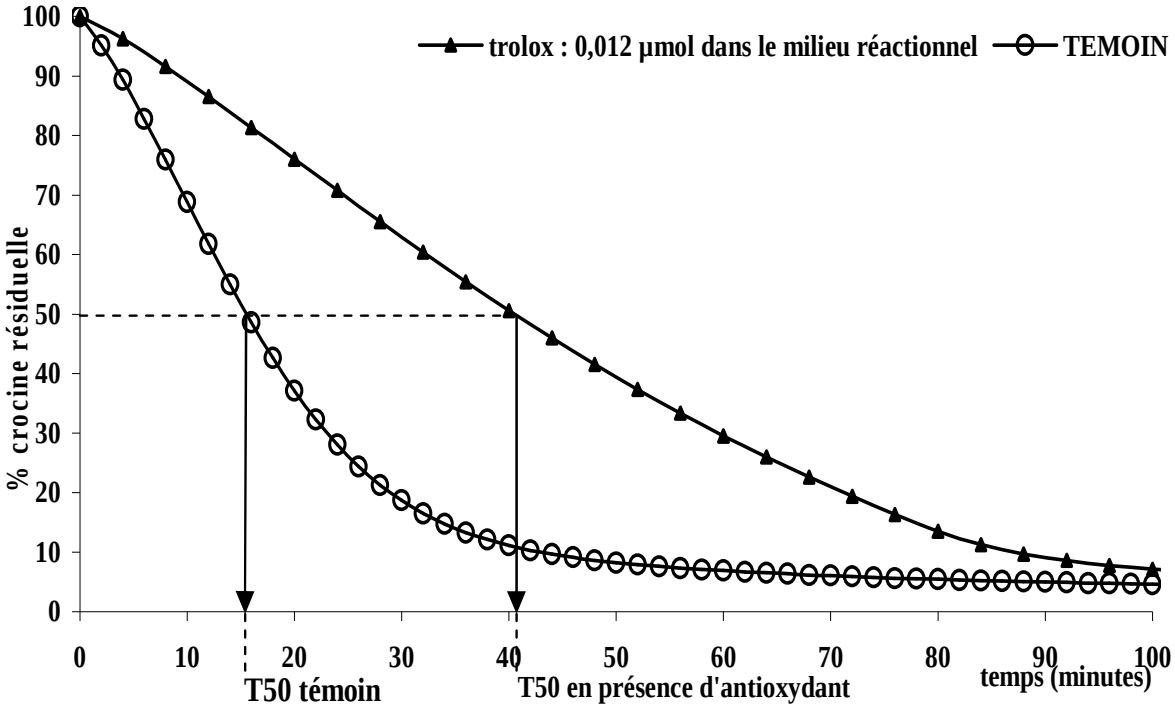


Figure 55 : Cinétique d'oxydation de la crocine (10 µmol/L) par l'AAPH (18,4 mmol/L) en présence d'antioxydant (λ = 438 nm)

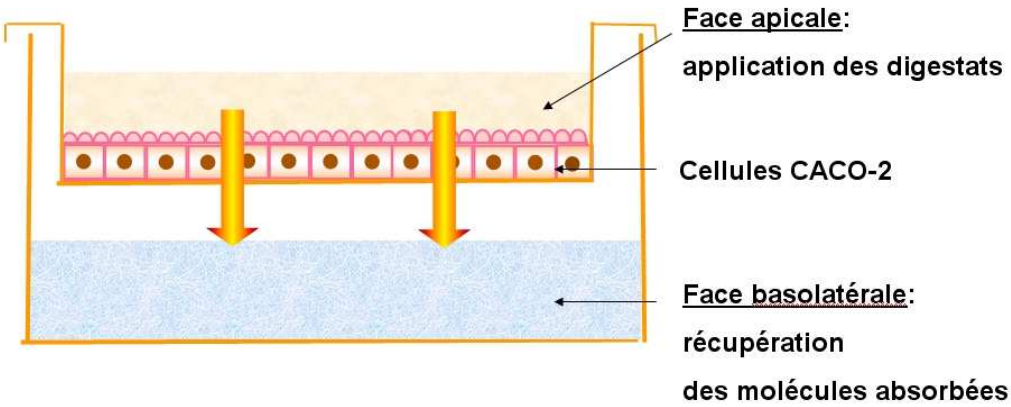


Figure 56 : Puits de culture des cellules Caco-2

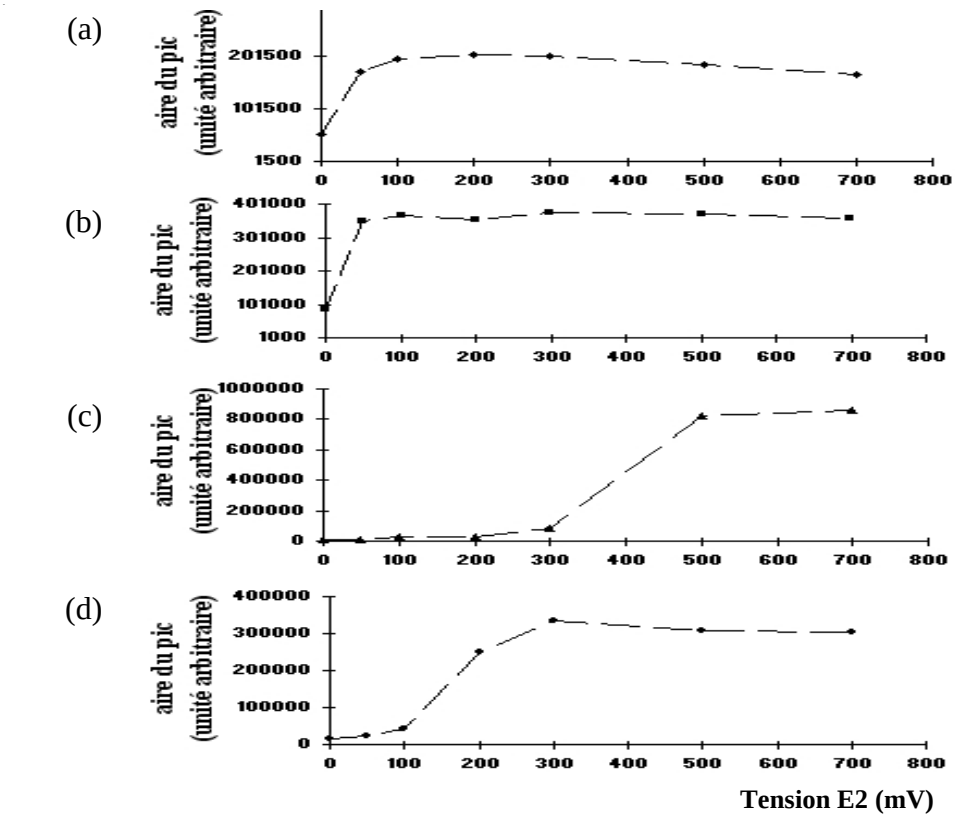


Figure 57 : Voltamogrammes des acides phénoliques dans les conditions d'analyse du café

Acide chlorogénique ; (b) acide caféique ; (c) acide *p*-coumarique ; (d) acide férulique
Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250 x 4,6 mm d.i. ; diamètre des particules 10 µm) ; Phase mobile : mélange acétonitrile / NaH_2PO_4 25 mmol/L pH 2,4 15/85 (v/v) , débit : 1 mL/min.; Conditions de détection électrochimique sur Coulochem II (ESA) : E1 = 300 mV (10 µA) et E2 = 600 mV (10 µA)

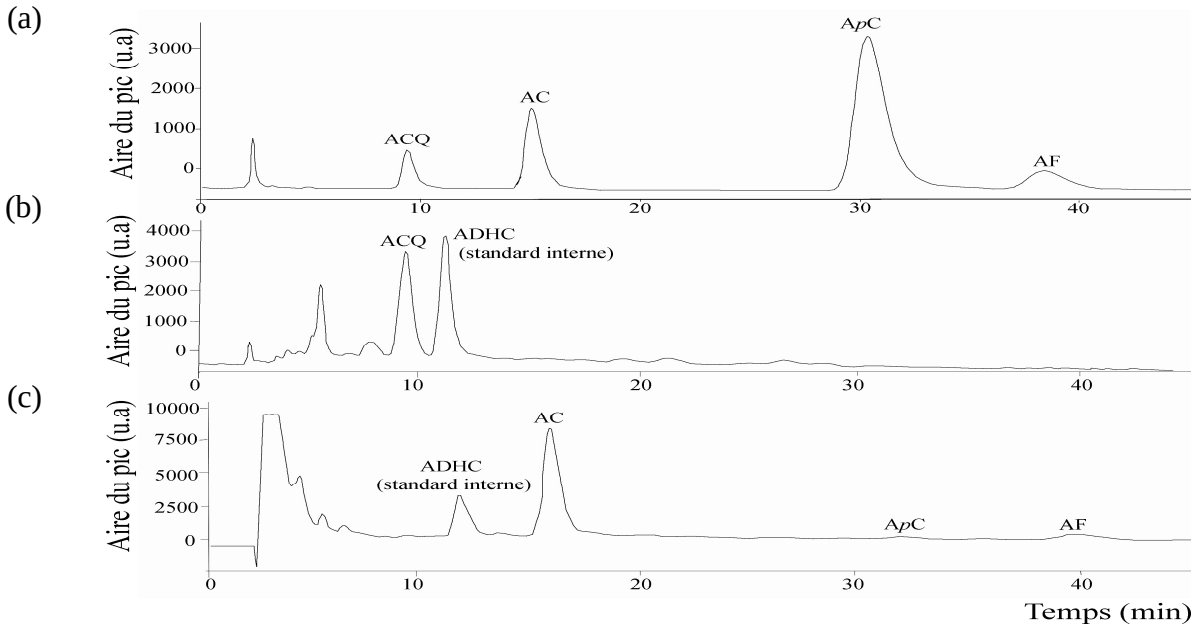


Figure 58 : Chromatogrammes des Cafés expérimentaux extemporanés.

(a) standards d'acides phénoliques dans la phase mobile ; (b) café Carte Noire à 20g/L, non hydrolysé, en présence d'acide dihydrocaféique (standard interne) ; (c) café Carte Noire à 20g/L, après hydrolyse, en présence d'acide dihydrocaféique (standard interne) ; u.a. : unités arbitraires.

Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250 x 4,6 mm d.i. ; diamètre des particules 10 µm) ; Phase mobile : mélange acétonitrile / NaH2PO4 25 mmol/L pH 2,4 15/85 (v/v) , débit : 1 mL/min.; Conditions de détection électrochimique sur Coulochem II (ESA) : E1 = 300 mV (10 µA) et E2 = 600 mV (10 µA)

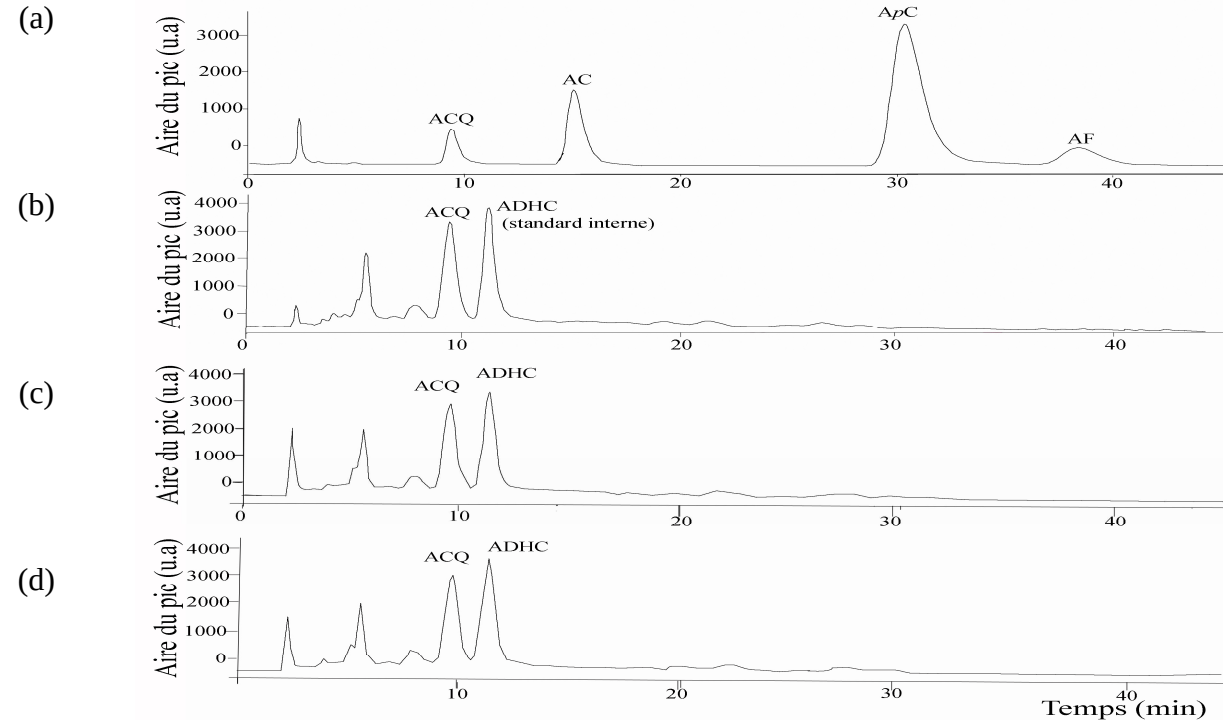


Figure 59 : Chromatogrammes des Cafés expérimentaux, sans hydrolyse alcaline.
standards d'acide chlorogénique dans la phase mobile ; (b) café Carte Noire à 20g/L en présence d'acide dihydrocaféique (standard interne) ; (c) café atomisé à 20g/L en présence d'acide dihydrocaféique (standard interne) ; (d) café au lait atomisé à 15g/L en présence d'acide dihydrocaféique (standard interne) ; u.a. : unités arbitraires. Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250 x 4,6 mm d.i. ; diamètre des particules 10 µm) ; Phase mobile : mélange acétonitrile / NaH2PO4 25 mmol/L pH 2,4 15/85 (v/v) , débit : 1 mL/min.; Conditions de détection électrochimique sur Coulochem II (ESA) : E1 = 300 mV (10 µA) et E2 = 600 mV (10 µA)

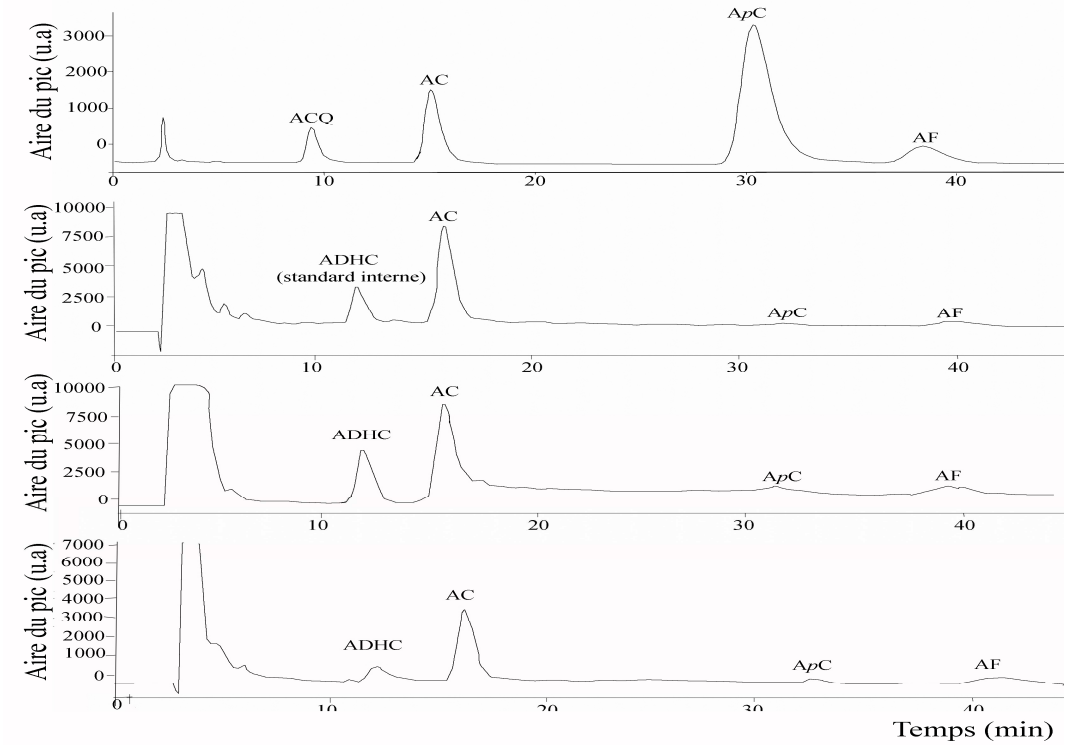


Figure 60 : Chromatogrammes des Cafés expérimentaux, avec hydrolyse alcaline

standards d'acides phénoliques dans la phase mobile ; (b) café Carte Noire à 20g/L en présence d'acide dihydrocaféique (standard interne) ; (c) café atomisé à 20g/L en présence d'acide dihydrocaféique (standard interne) ; (d) café au lait atomisé à 15g/L en présence d'acide dihydrocaféique (standard interne) ; u.a. : unités arbitraires.

Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250 x 4,6 mm d.i. ; diamètre des particules 10 µm) ; Phase mobile : mélange acétonitrile / NaH2PO4 25 mmol/L pH 2,4 15/85 (v/v) , débit : 1 mL/min.; Conditions de détection électrochimique sur Coulochem II (ESA) : E1 = 300 mV (10 µA) et E2 = 600 mV (10 µA)

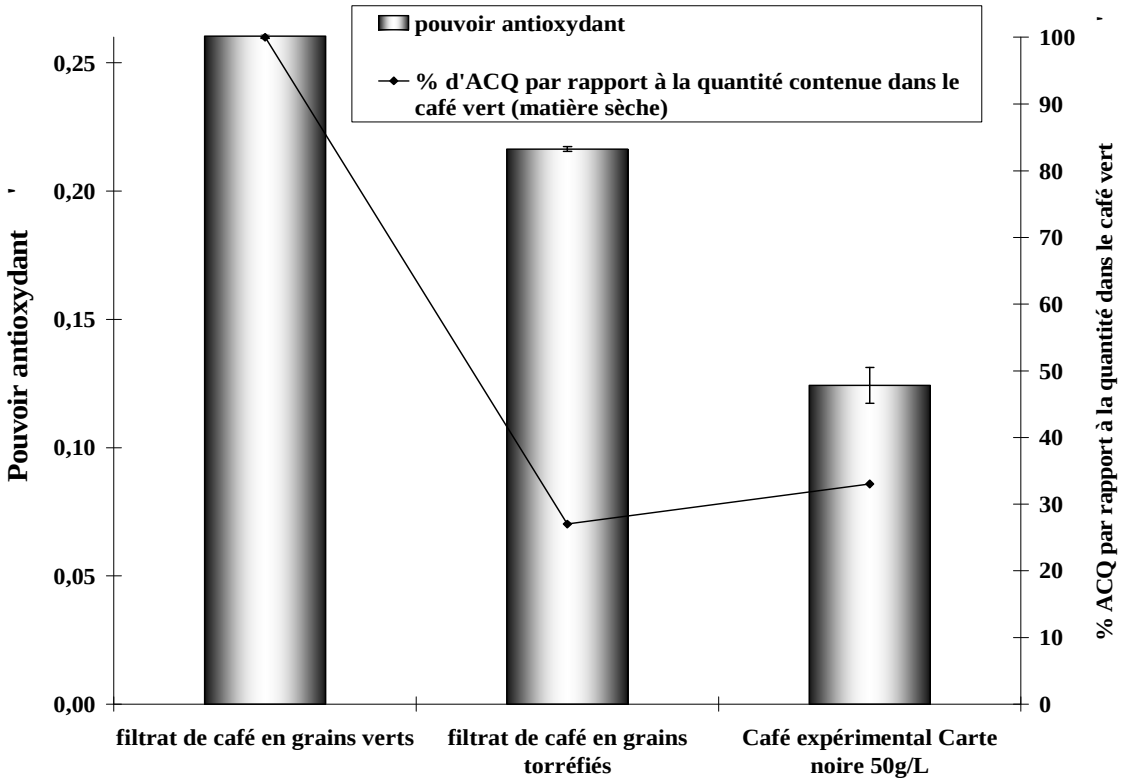


Figure 61 : Pouvoir antioxydant du café expérimental et de café vert ou torréfié préparé par filtration déterminé par le test TAC, et contenu en acide chlorogénique des boissons

Le pouvoir antioxydant est exprimé par la pente de la droite obtenue dans le test TAC, en rapportant la quantité ajoutée dans la cuve à la matière sèche contenue dans la boisson.

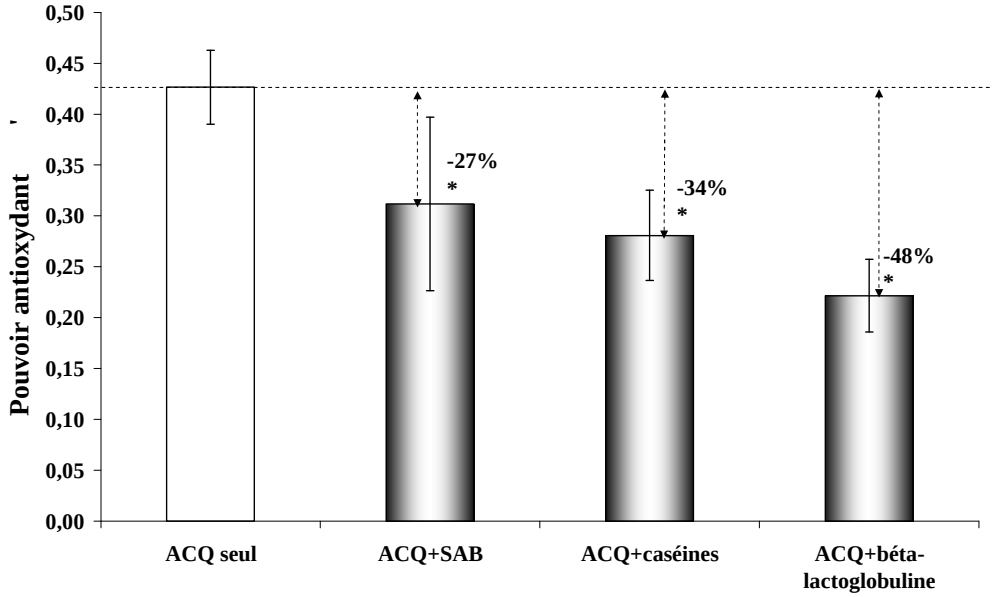


Figure 62 : Effet de la formation de complexes de nature covalente entre des protéines et de l'acide chlorogénique sur le pouvoir antioxydant de l'acide chlorogénique (test TAC)

Le pouvoir antioxydant est exprimé par la pente de la droite dose réponse obtenue dans le test TAC.

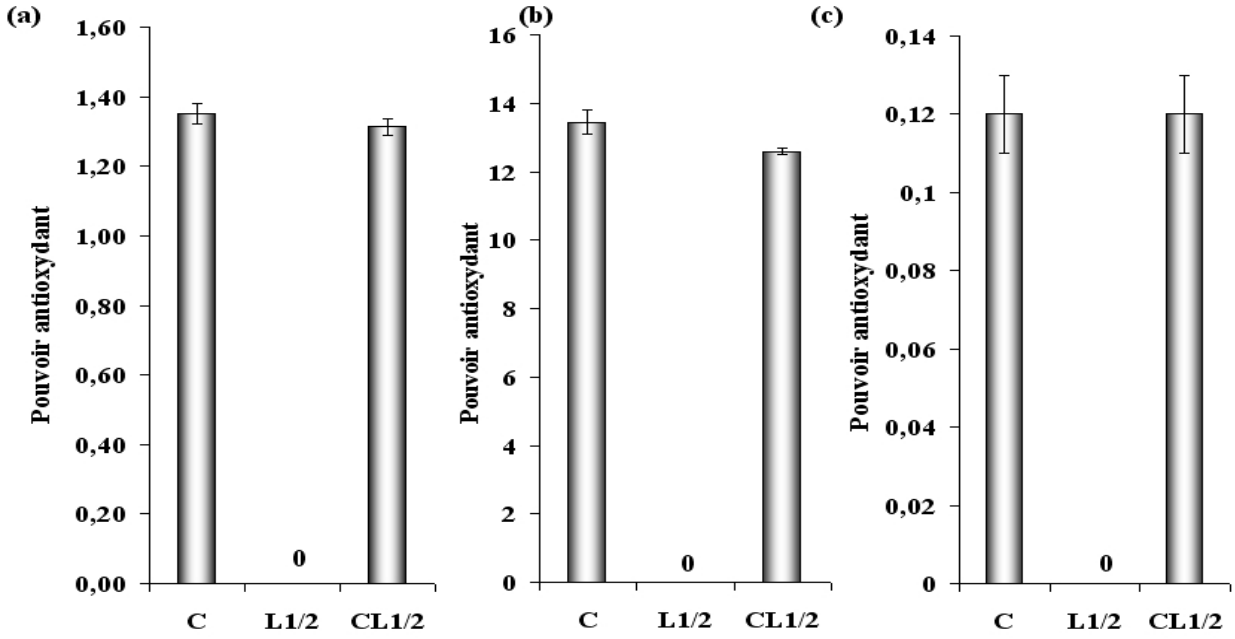


Figure 63 : Effet de l'ajout extemporané de lait sur le pouvoir antioxydant des cafés expérimentaux

(a) test DPPH (PAO exprimé en unités de pouvoir anti-radicalaire : 1/CE50) ; (b) test AAPH (PAO exprimé par la pente de la droite dose réponse), (c) test TAC (PAO exprimé par la pente de la droite dose réponse rapportée à la quantité de matière sèche dans la boisson)

C : solution de café Carte Noire soluble 50g/L ; $L_{1/2}$: solution de lait demi-écrémé 250g/L ; $CL_{1/2}$: solution de café Carte Noire soluble 50g/L contenant 250g/L de lait demi-écrémé.

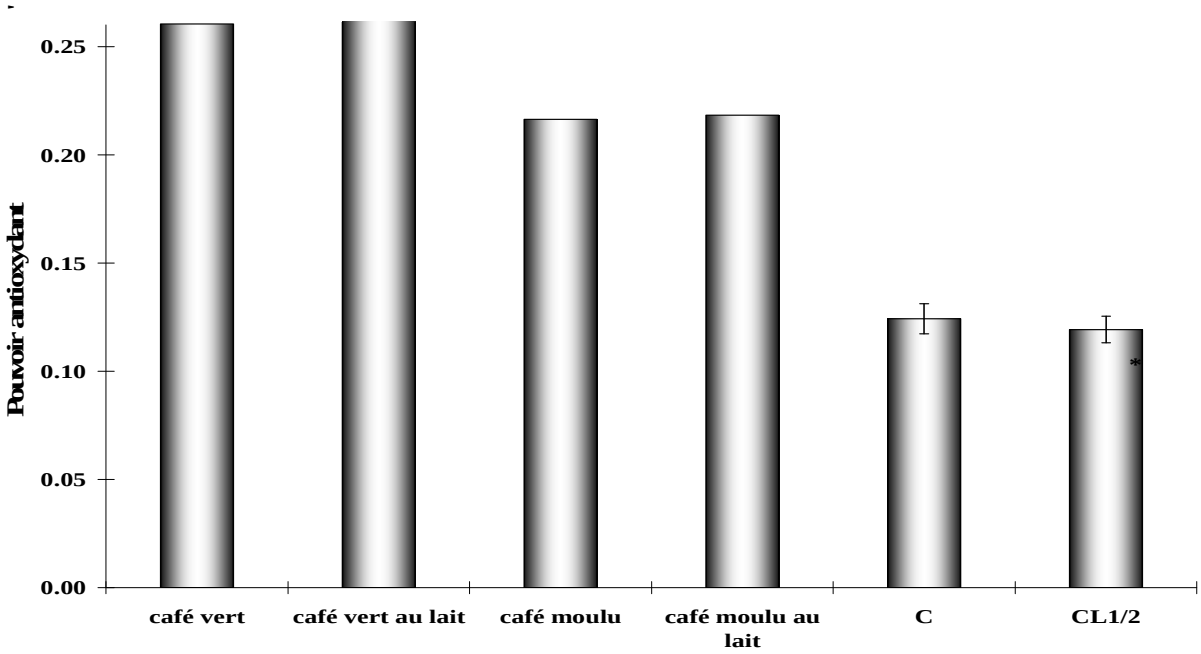


Figure 64 : Effet de l'ajout extemporané de lait demi-écrémé sur le pouvoir antioxydant de différentes solutions de café, déterminé par le test TAC

C : solution de café Carte Noire soluble 50g/L ;

$CL_{1/2}$: solution de café Carte Noire soluble 50g/L contenant 250g/L de lait demi-écrémé 250g/L .

PAO mesuré par le test TAC (exprimé par la pente de la droite dose réponse rapportée à la quantité de matière sèche dans la boisson)

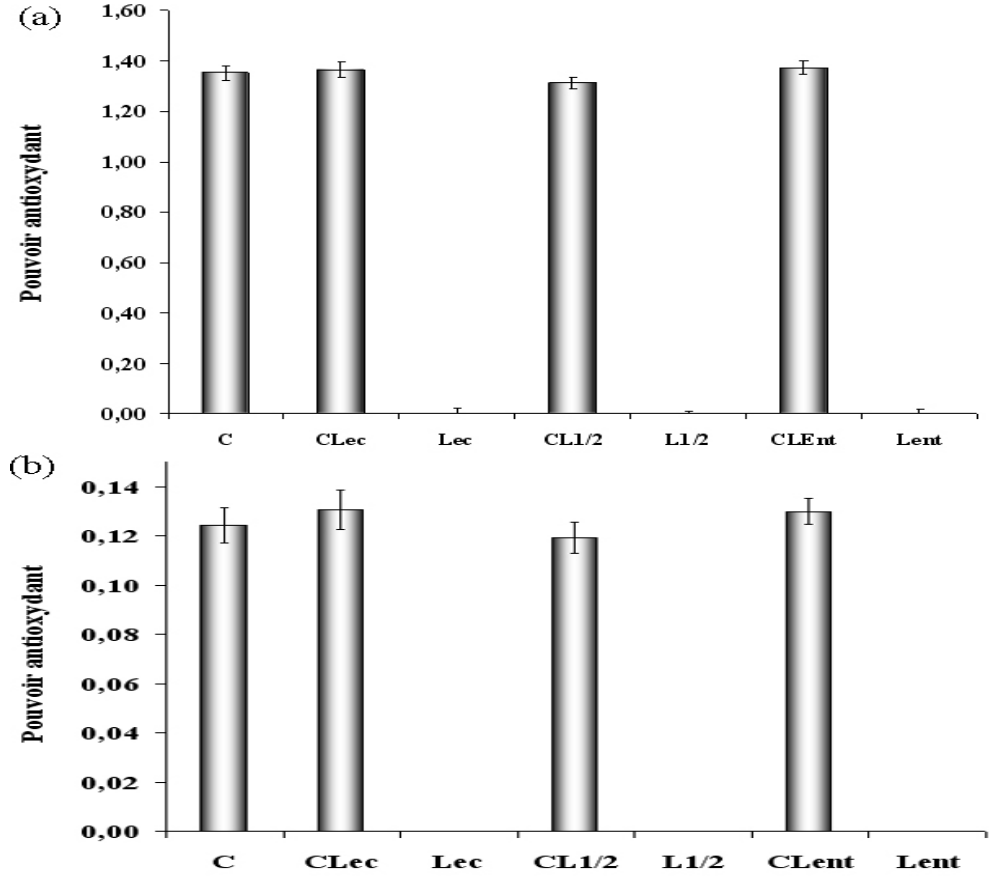


Figure 65 : Effet de la quantité de matière grasse du lait sur le pouvoir antioxydant de différentes solutions de café au lait

(a) test DPPH (PAO exprimé en unités de pouvoir anti-radicalaire : 1/CE50) ; (b) test TAC (PAO exprimé par la pente de la droite dose réponse rapportée à la quantité de matière sèche dans la boisson)

C : solution de café carte noire soluble 50g/L ; CLec : solution de café carte noire soluble 50g/L contenant 250g/L de lait écrémé ; Lec : solution de lait écrémé 250g/L ; $CL_{1/2}$: solution de café carte noire soluble 50g/L contenant 250g/L de lait demi-écrémé 250g/L ; $L_{1/2}$: solution de lait demi-écrémé 250g/L ; CLent : solution de café carte noire soluble 50g/L contenant 250g/L de lait entier ; Lent : solution de lait entier 250g/L.

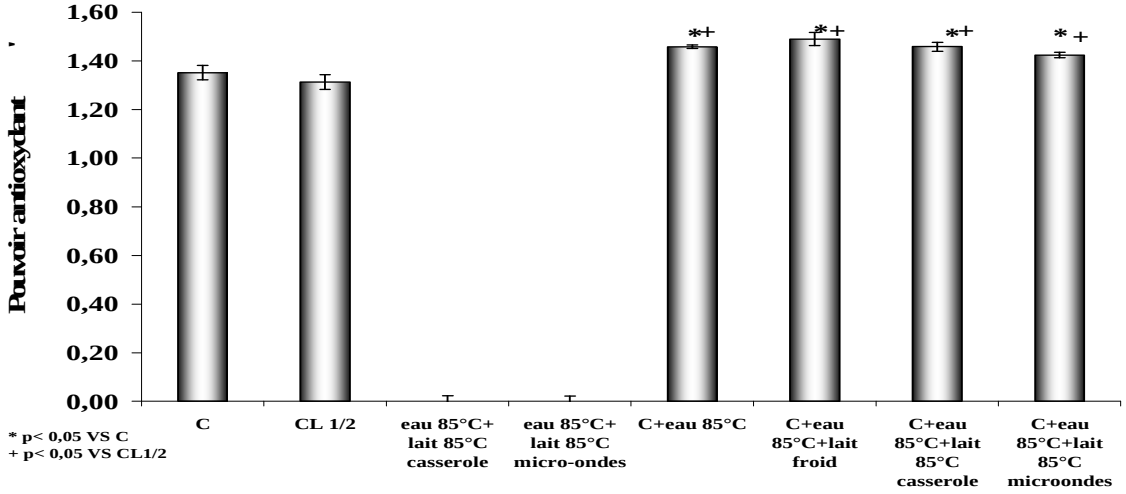


Figure 66 : Effets du mode de préparation sur le pouvoir antiradicalaire de différentes solutions de café au lait demi-écrémé, déterminé par le test DPPH

(PAO exprimé en unités de pouvoir anti-radicalaire : 1/CE50) ; C : solution de café carte noire soluble 50g/L ; CL1/2 : solution de café carte noire soluble 50g/L contenant 250g/L de lait demi-écrémé 250g/L

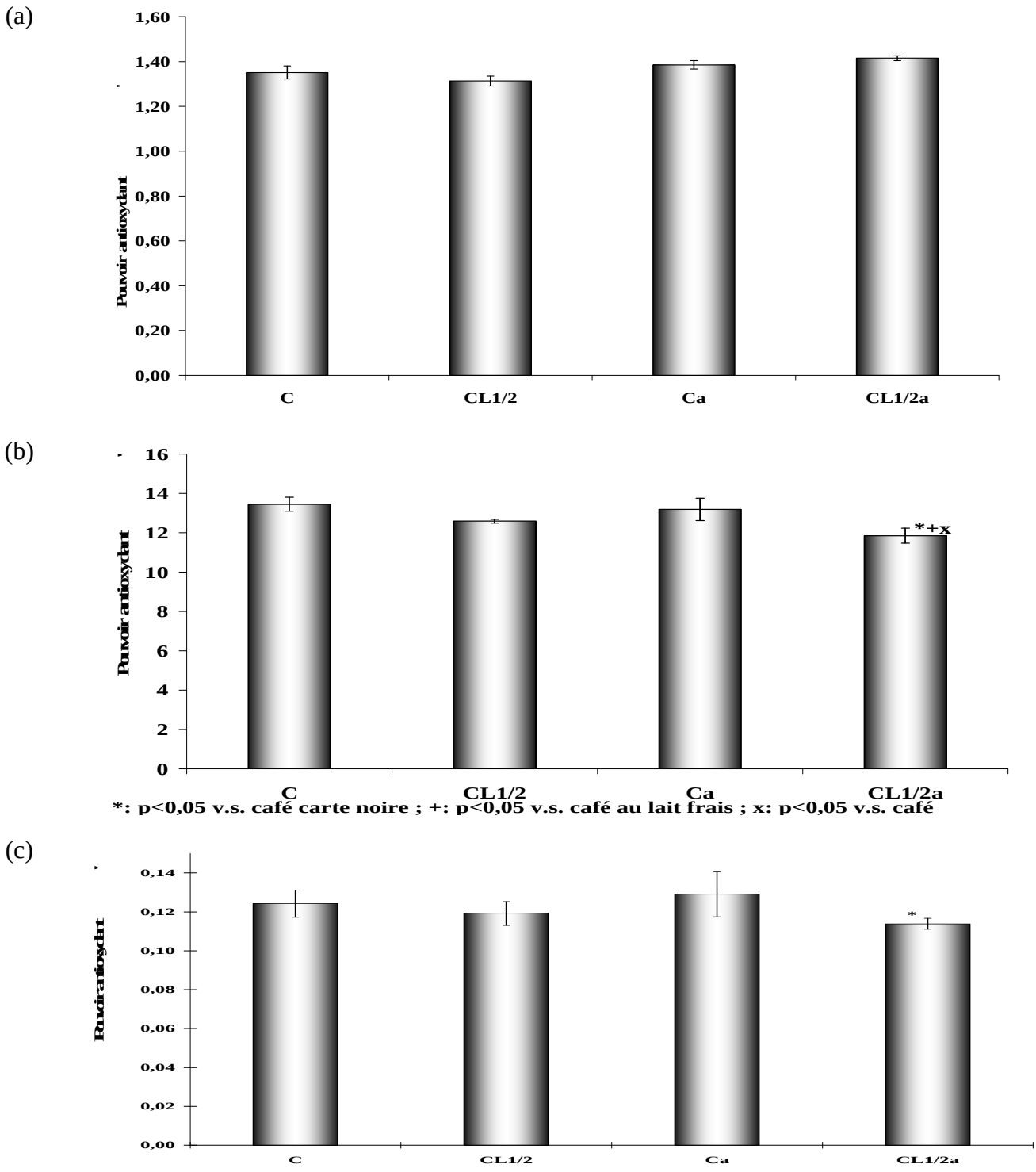


Figure 67 : Effets de l'ajout de lait et de l'atomisation sur le pouvoir antiradicalaire de différentes solutions de café.

(a) test DPPH (PAO exprimé en unités de pouvoir anti-radicalaire : 1/CE50) ; (b) test AAPH (PAO exprimé par la pente de la droite dose réponse), (c) test TAC (PAO exprimé par la pente de la droite dose réponse rapportée à la quantité de matière sèche dans la boisson)

C : solution de café Carte Noire soluble 50g/L ; $CL_{1/2}$: solution de café Carte Noire soluble 50g/L contenant 250g/L de lait demi-écrémé ; C_a : solution de café atomisé 50g/L ; $CL_{1/2a}$: solution à 76,025g/L de café au lait demi-écrémé atomisé (quantité de poudre donnant l'équivalent du café $CL_{1/2}$ après remise en suspension)

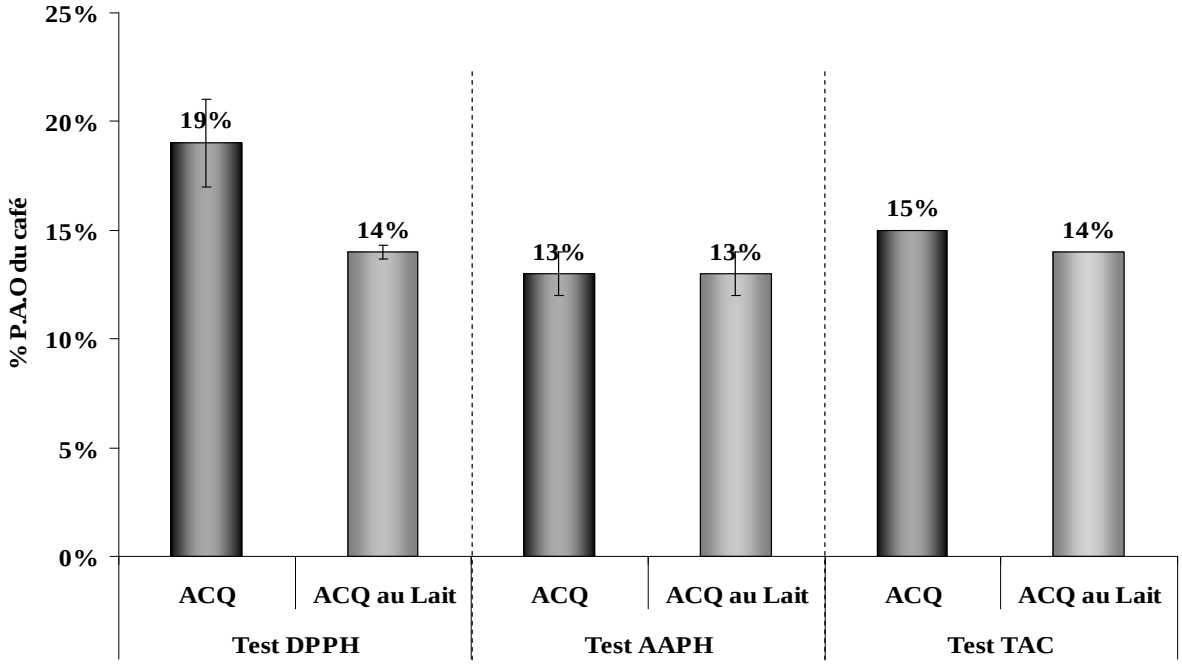


Figure 68 : Part de l'acide chlorogénique dans le pouvoir antioxydant du café évalué par les différents tests de mesure du pouvoir antioxydant (DPPH, AAPH et TAC)

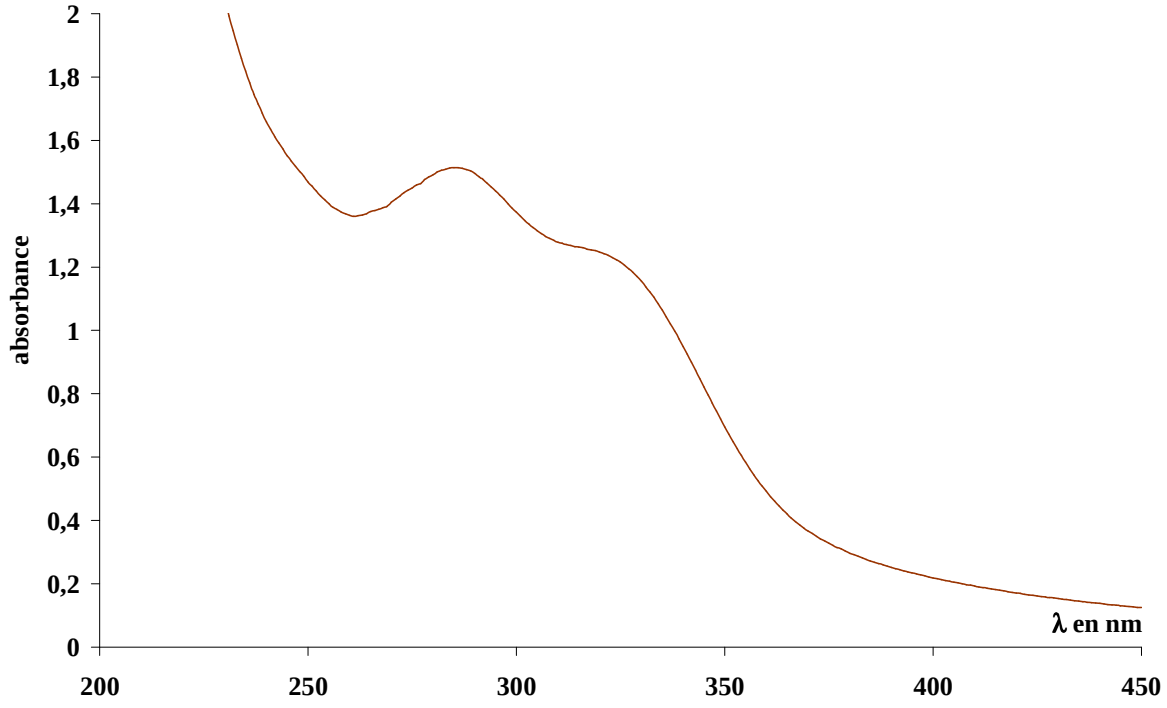


Figure 69 : Spectre d'absorption du café Carte Noire soluble dans l'eau
(solution à 50g/L diluée au 1/200e)

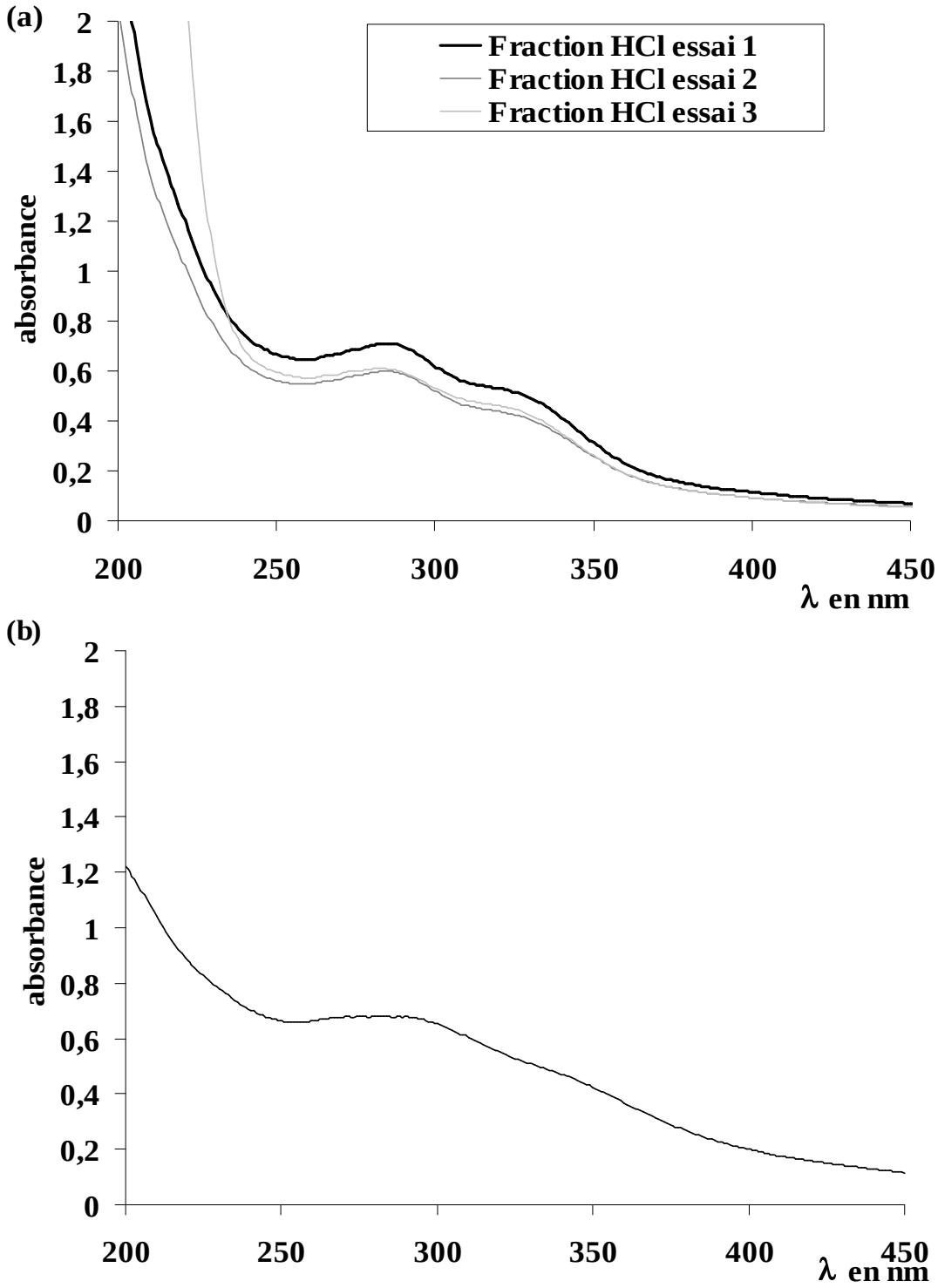


Figure 70 : Spectres de la « fraction PRM » éluée par la solution acide pendant la séparation du café sur colonne chromatographique LH-20, et étalon de PRM

(a) fraction éluée par la solution acide pendant la séparation du café sur colonne LH-20

(b) solution de PRM diluée au 1/2500e dans de l'eau pH 3;

PRM préparés par incubation d'un mélange glucose 0,8 mol/L et Lysine 0,5 mol/L à 103°C pendant 92 heures.

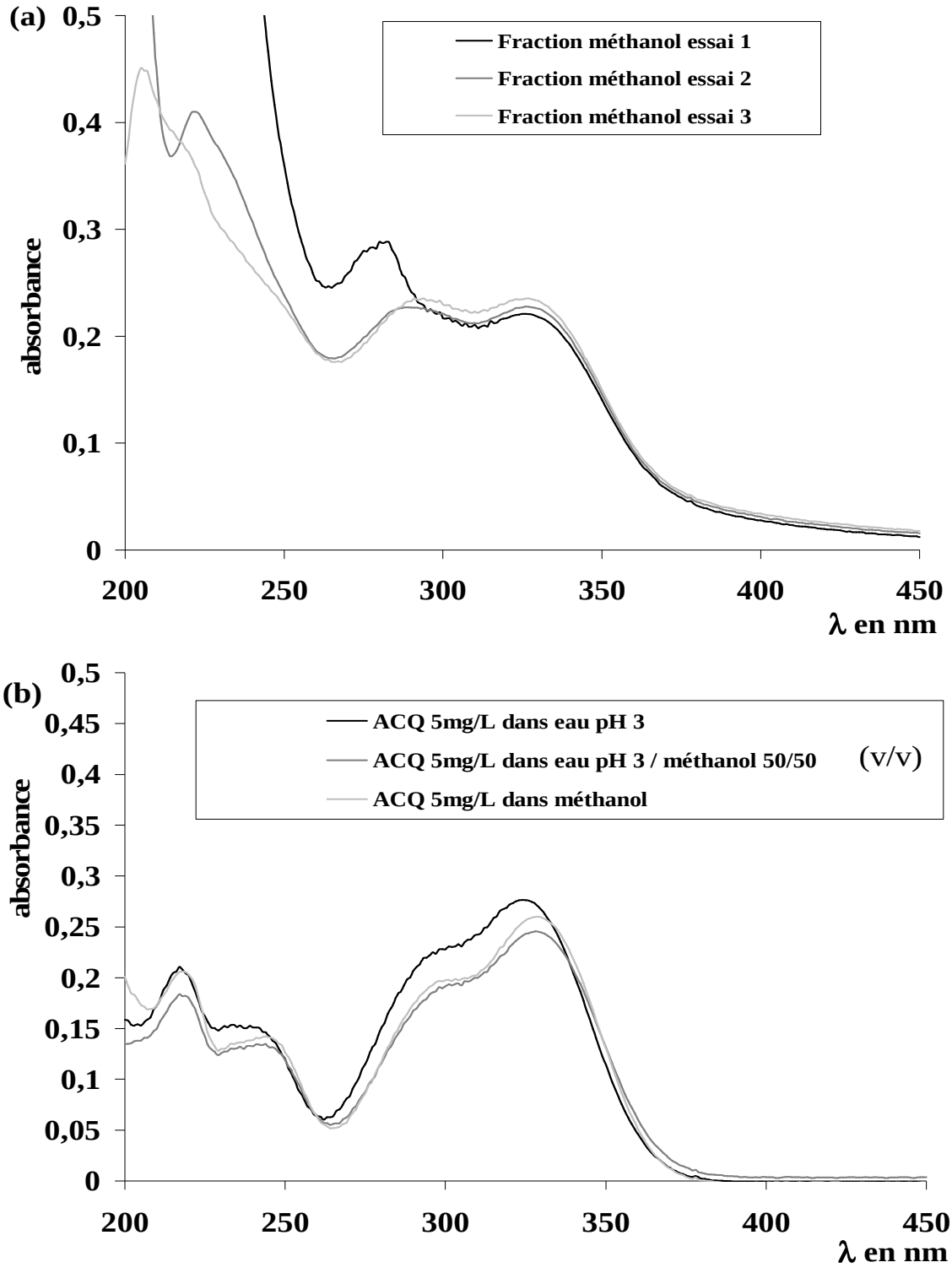


Figure 71 : Spectres de la fraction méthanolique du café séparée sur colonne LH-20 et standards d'ACQ

(a) fraction méthanolique après séparation du café en LH-20
(b) solutions d'ACQ dans différents milieux

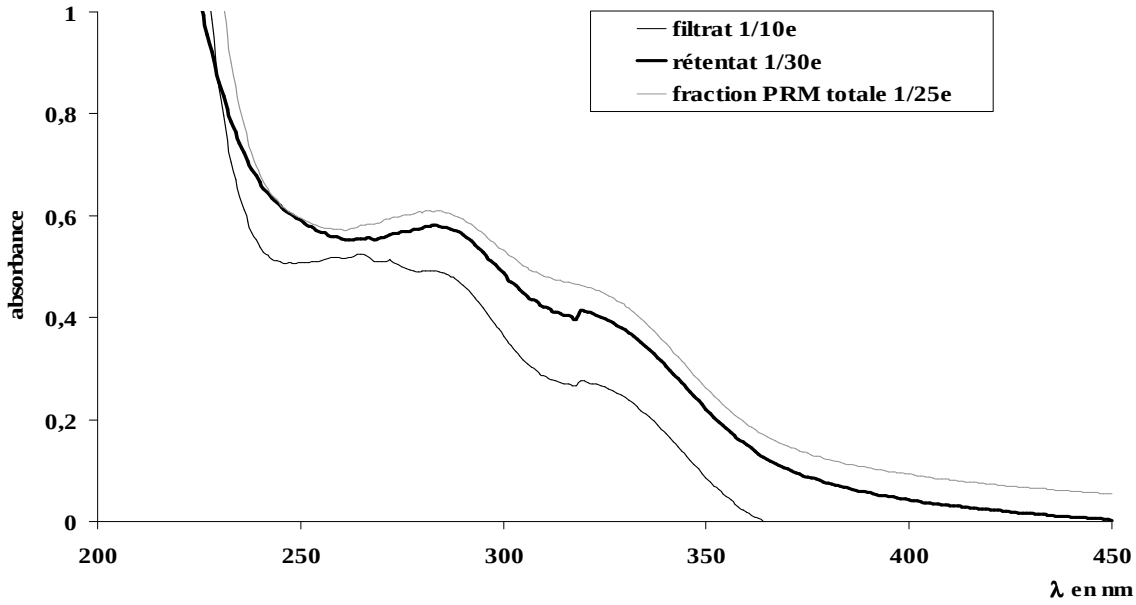
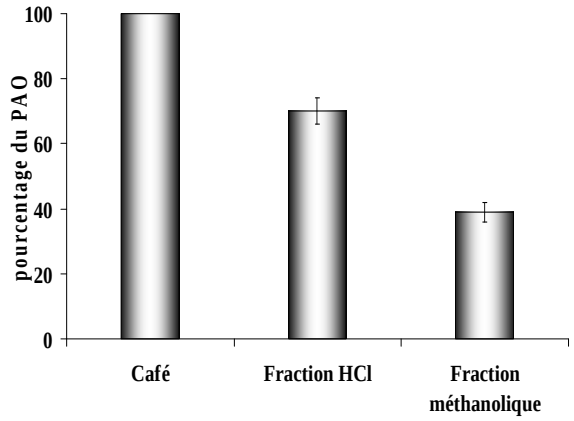
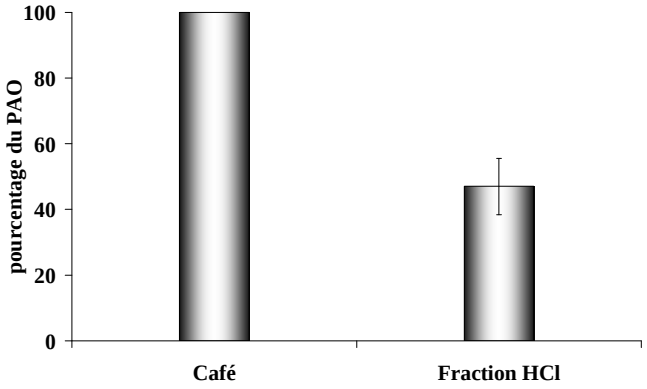


Figure 72 : Spectres obtenus après séparation par ultrafiltration de la fraction PRM obtenue par chromatographie sur colonne Sephadex LH-20
(seuil de coupure : 3000Da)

(a)



(b)



(c)

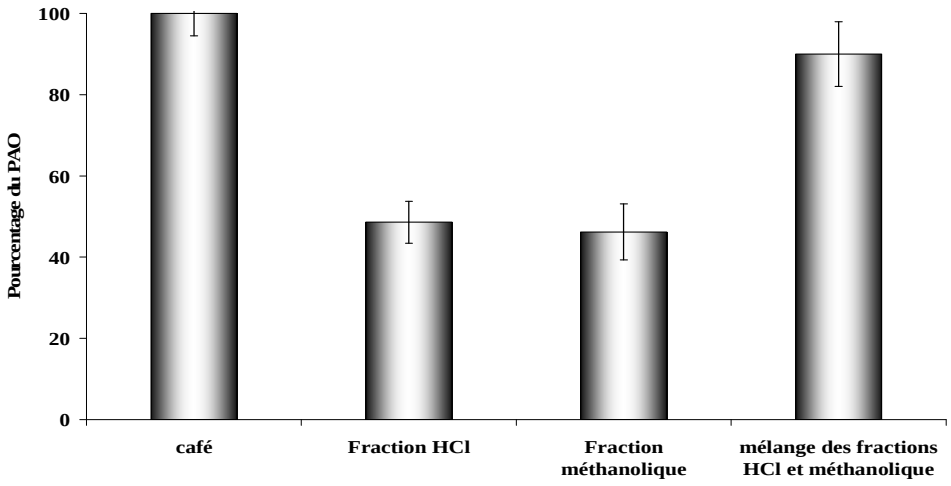


Figure 73 : Pourcentage du pouvoir antioxydant du café Carte Noire soluble à 50 g/L dû aux fractions du café séparées sur colonne LH-20

(a) Test DPPH, (b) Test AAPH, (c) Test TAC; le PAO de la fraction méthanolique n'a pas été déterminé dans le test AAPH.

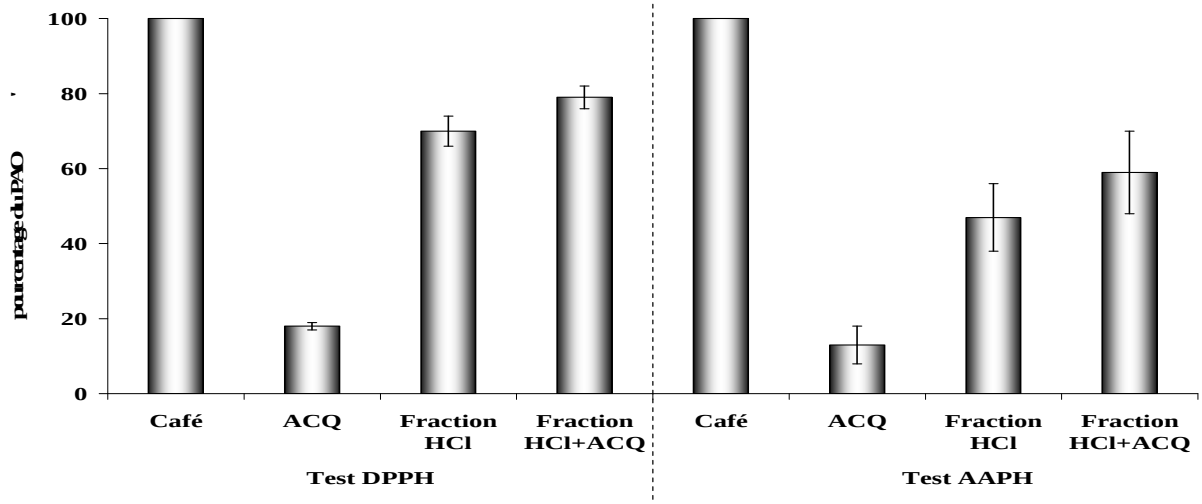


Figure 74 : Recherche de synergies entre les fractions HCl du café et l'acide chlorogénique

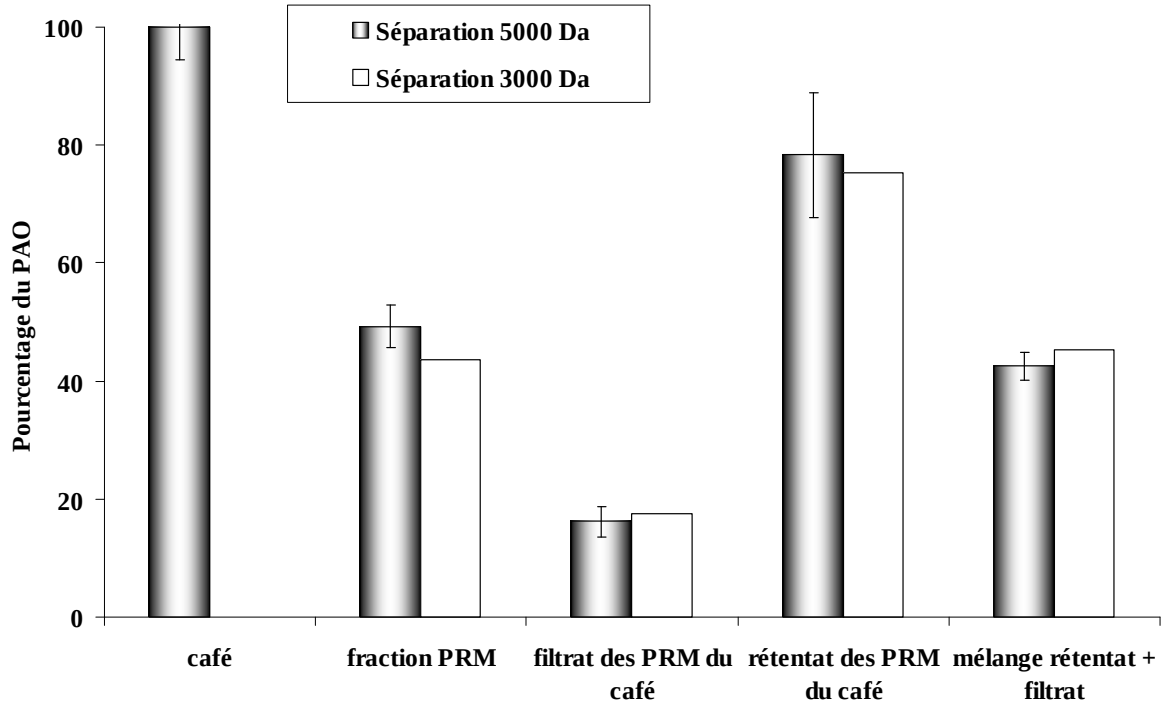


Figure 75 : Pourcentages du pouvoir antioxydant du café Carte Noire dus aux produits de la réaction de Maillard, après séparation sur colonne chromatographique Sephadex LH-20 puis par ultrafiltration.

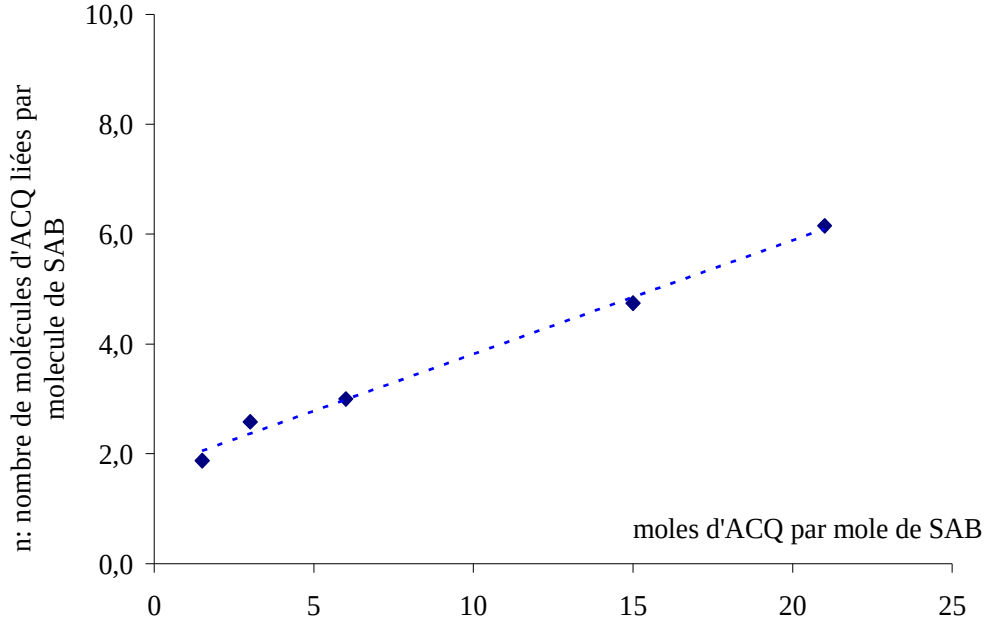


Figure 76 : Validation de l'ultrafiltration pour l'étude des interactions acide chlorogénique/protéines

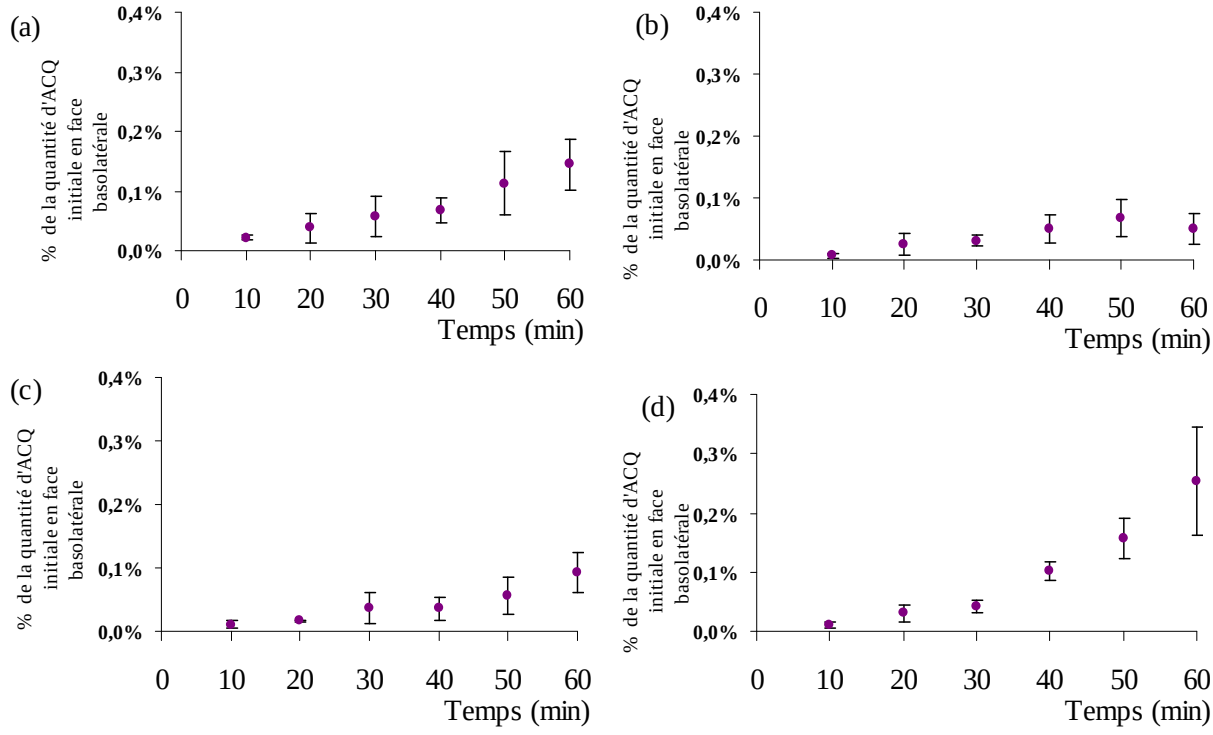


Figure 77 : Cinétiques d'absorption sur cellules Caco-2 de l'acide chlorogénique après digestion *in vitro*, (a) seul (b) en présence de produits de la réaction de Maillard, (c) en présence de β-lactoglobuline, (d) en présence d'un mélange de caséines extraites du lait

PRM préparés par incubation d'un mélange glucose 0,8 mol/L et Lysine 0,5 mol/L à 103°C pendant 92 heures.

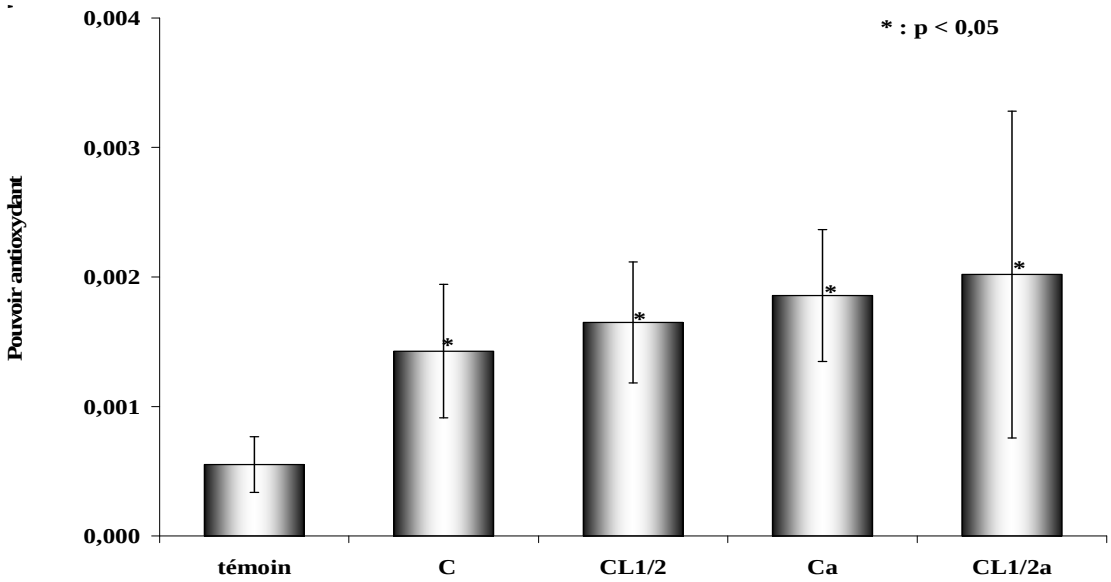


Figure 78 : Statut antioxydant plasmatique des animaux après consommation des régimes expérimentaux pendant trois semaines

Les résultats ont été rapportés à la quantité de régime expérimental consommée : pouvoir antioxydant mesuré par le test TAC, exprimé en taux d'inhibition / µL de plasma / g du régime consommé

Régimes reçus par les animaux (contenant tous la même quantité de sucre) :

Témoin : eau sucrée ; C : solution de café Carte Noire soluble 50g/L ; $CL_{1/2}$: solution de café Carte Noire soluble 50g/L contenant 250g/L de lait demi-écrémé ; C_a : solution de café atomisé 50g/L ; $CL_{1/2a}$: solution de café au lait demi-écrémé atomisé (quantité de poudre donnant l'équivalent du café $CL_{1/2}$ après remise en suspension)

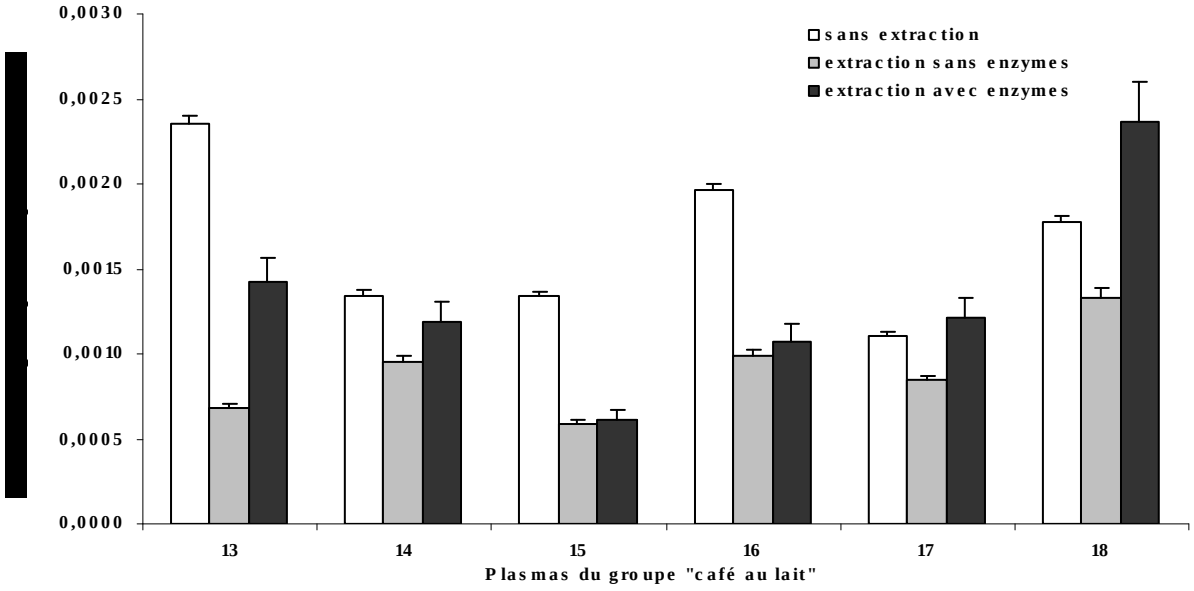


Figure 79 : Comparaison du statut antioxydant plasmatique du groupe « café au lait » analysé directement au test TAC ou après extraction à l'acétone, avec ou sans hydrolyse par un mélange sulfatase/β-glucuronidase

Les résultats sont exprimés en taux d'inhibition de l'oxydation de 10 µmol/L de crocine par 18,4 mmol/L d'AAPH par µL de plasma et par g de boisson consommée moyenne sur les 22 jours d'étude, en tenant compte des taux de récupération avec et sans hydrolyse.

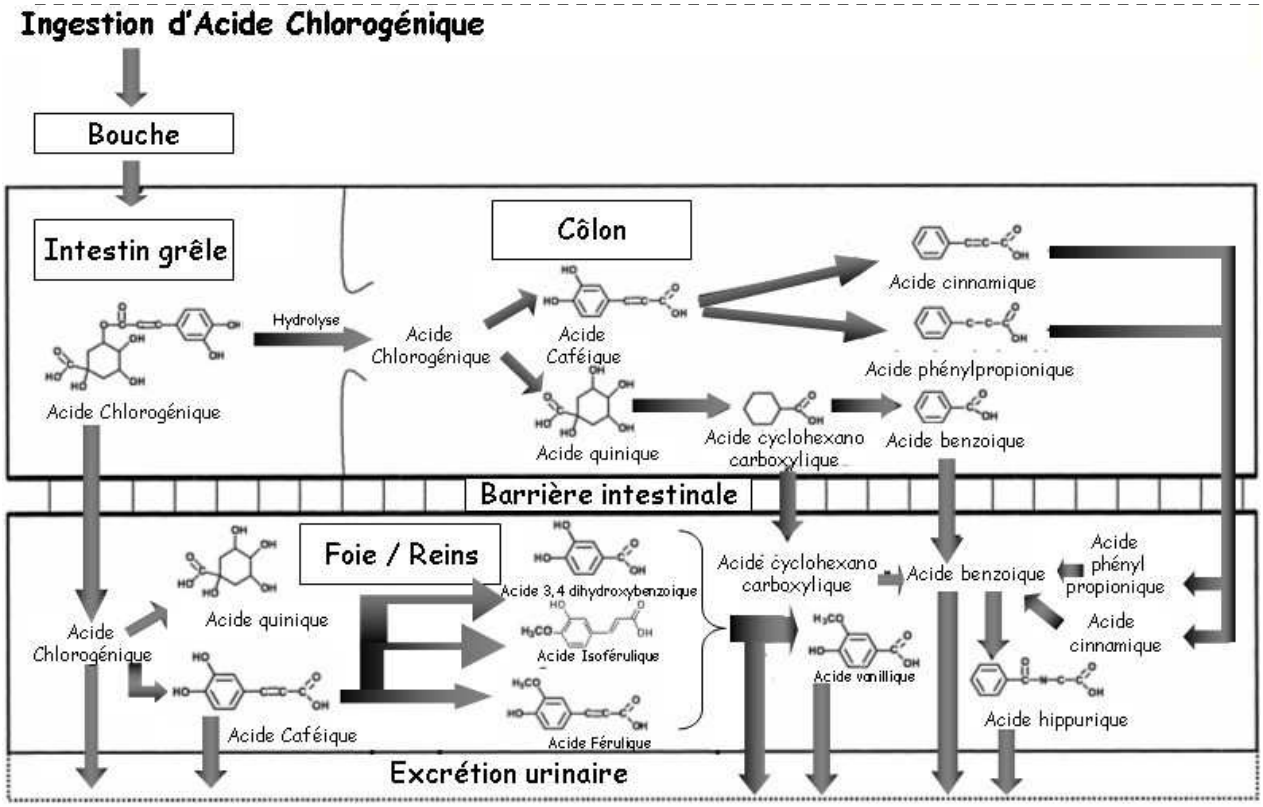


Figure 80 : Voie métabolique supposée des acides hydroxycinnamiques dans l'organisme (adapté de Rechner *et al.*, 2001 ; Olthof *et al.*, 2003)
(les formes conjuguées ne sont pas indiquées)

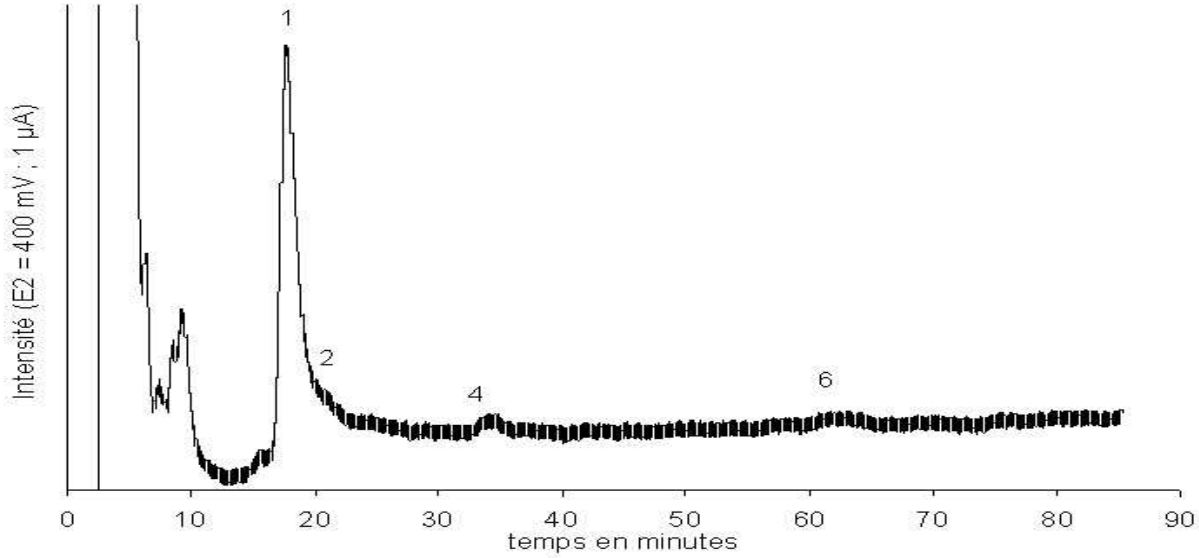


Figure 81 : Chromatogramme d'un plasma témoin (rat n°4) traité par la méthode d'extraction, en présence du mélange sulfatase/β-glucuronidase
Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250x4,6 mm d.i. ; diamètre des particules 10 µm) ; Phase mobile : mélange eau / méthanol / acide acétique 88/10/2 (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium ; débit, 1 mL/min ; Conditions de détection électrochimique sur Coulochem II (ESA) : E1 = 300 mV (1 µA) et E2 = 400 mV (1 µA)
Les pics numérotés correspondent à des pics non identifiés

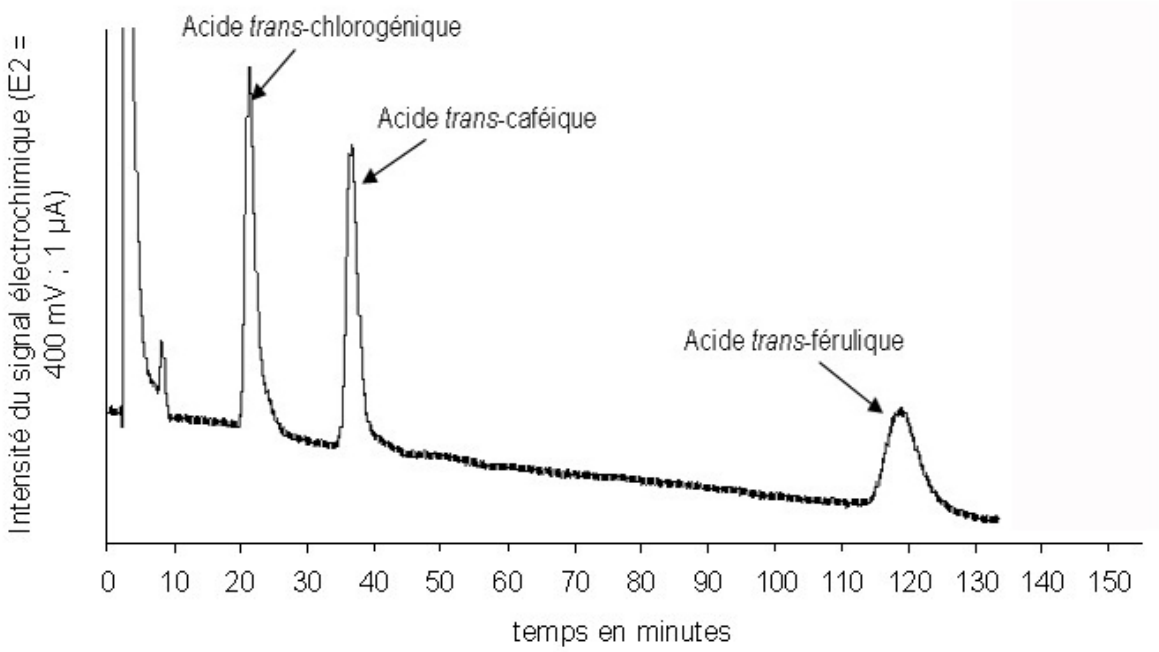


Figure 82 : Chromatogramme d'un mélange étalon composé d'acide *trans*-chlorogénique (1 µmol/L), d'acide *trans*-caféique (1 µmol/L) et d'acide *trans*-férulique (1 µmol/L)

Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250x4,6 mm d.i.; diamètre des particules 10 µm); Phase mobile, mélange eau / méthanol / acide acétique 88/10/2 (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium ; débit, 1 mL/min ; Conditions de détection électrochimique sur Coulochem II (ESA) : E1 = 300 mV (1 µA) et E2 = 400 mV (1 µA)

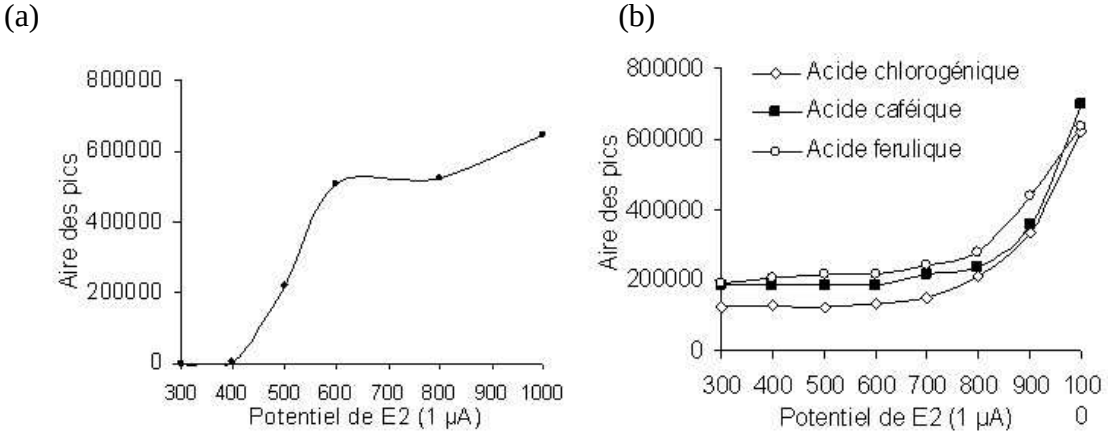


Figure 83 : Voltamogrammes du composé non identifié issu plasma témoin (a) et des acides chlorogénique, caféique et férulique (b) et pour E1 = 300 mV (1 µA) et E2 variant entre 300 et 1000 mV (1 µA)

Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250 x 4,6 mm d.i.; diamètre des particules 10 µm); Phase mobile, mélange eau / méthanol / acide acétique 88/10/2 (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium; débit, 1 mL/min

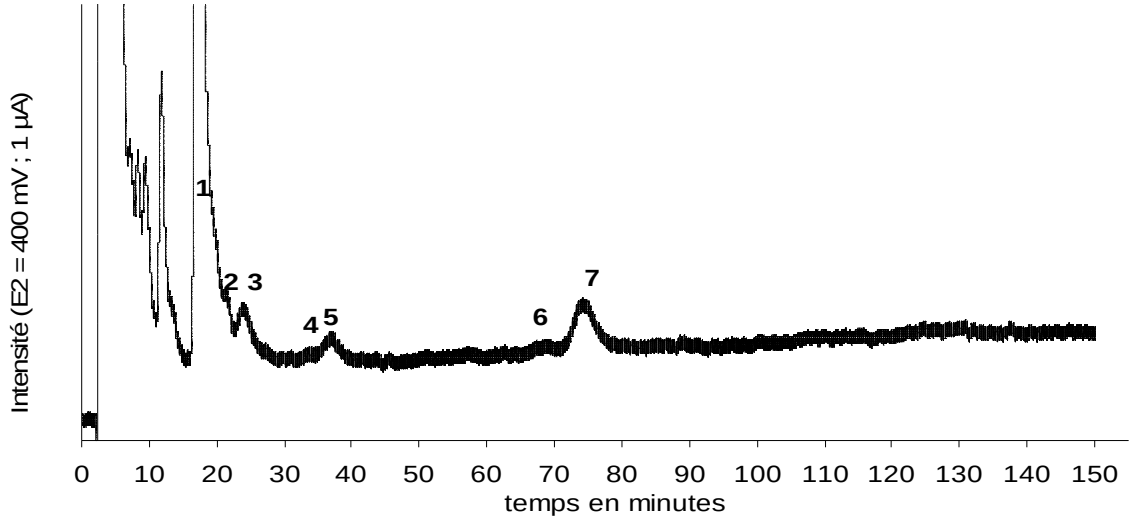


Figure 84 : Chromatogramme d'un plasma « café au lait » (rat n°13) traité par la méthode d'extraction mise au point sans hydrolyse par le mélange sulfatase/β-glucuronidase

Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250 x 4,6 mm d.i. ; diamètre des particules 10 µm) ; Phase mobile : mélange eau / méthanol / acide acétique 88/10/2 (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium ; débit, 1 mL/min ; Conditions de détection électrochimique sur Coulochem II (ESA) : E1 = 300 mV (1 µA) et E2 = 400 mV (1 µA)

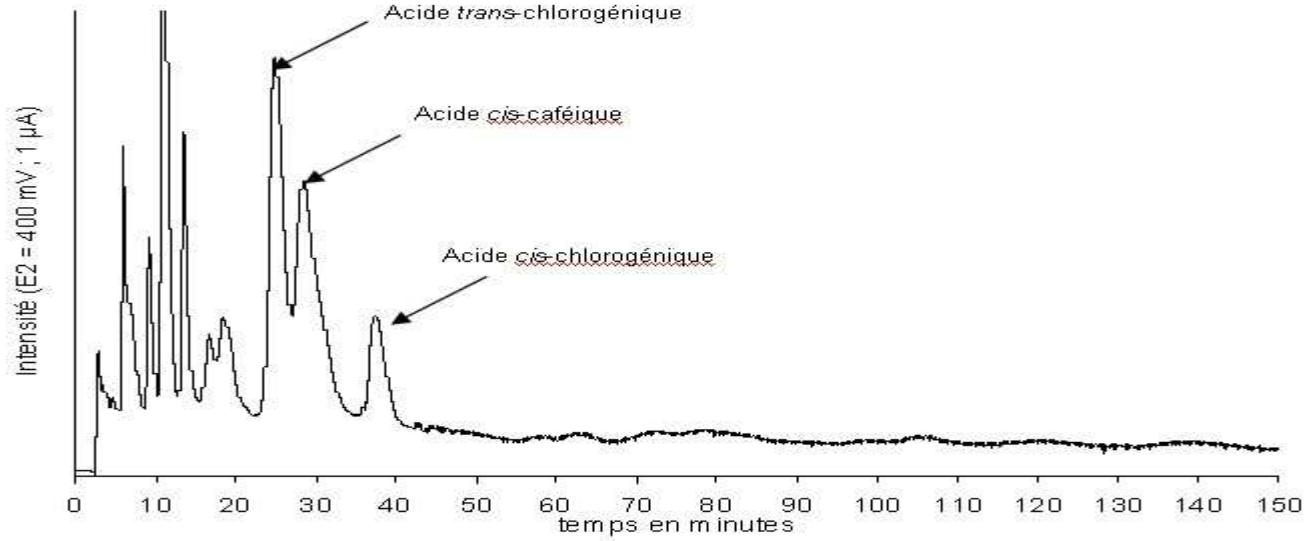


Figure 85 : Chromatogramme d'un café Carte Noire à 20 g/L après extraction à l'acétate d'éthyle

Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250 x 4,6 mm d.i. ; diamètre des particules 10 µm) ; Phase mobile : mélange eau / méthanol / acide acétique 88/10/2 (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium ; débit, 1 mL/min ; Conditions de détection électrochimique sur Coulochem II (ESA) : E1 = 300 mV (1 µA) et E2 = 400 mV (1 µA)

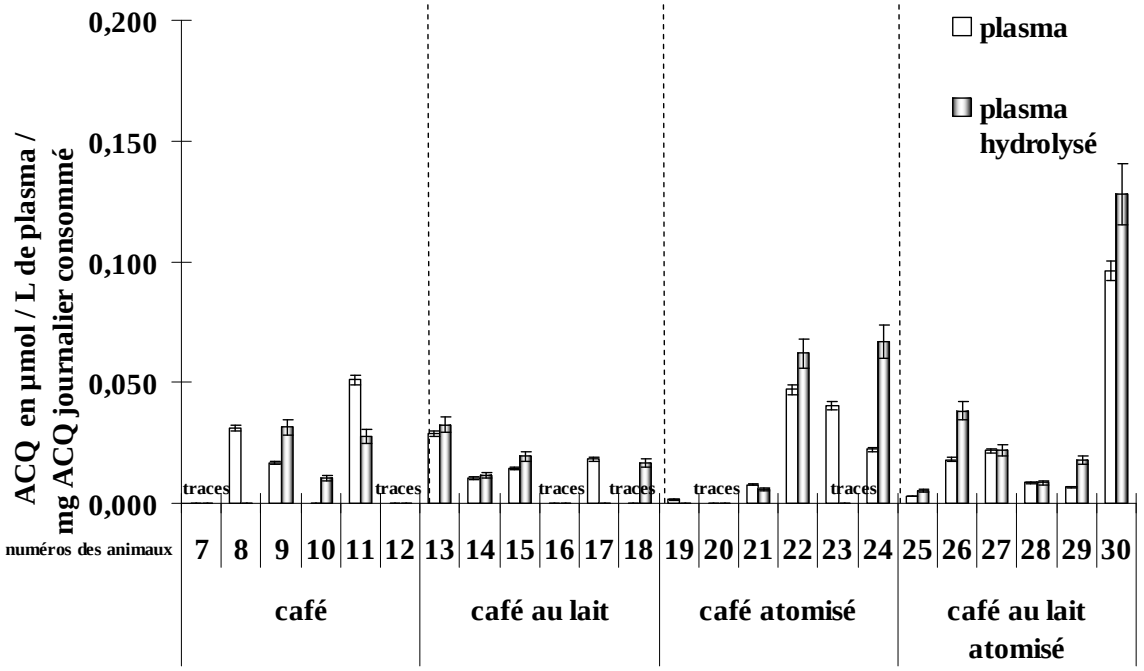


Figure 86 : Concentration plasmatique en acide chlorogénique (ACQ, *cis* + *trans*) pour les différents groupes, avec ou sans hydrolyse par le mélange sulfatase/β-glucuronidase et extraction selon le protocole d'extraction retenu

« traces » : rapport signal/bruit inférieur à 3

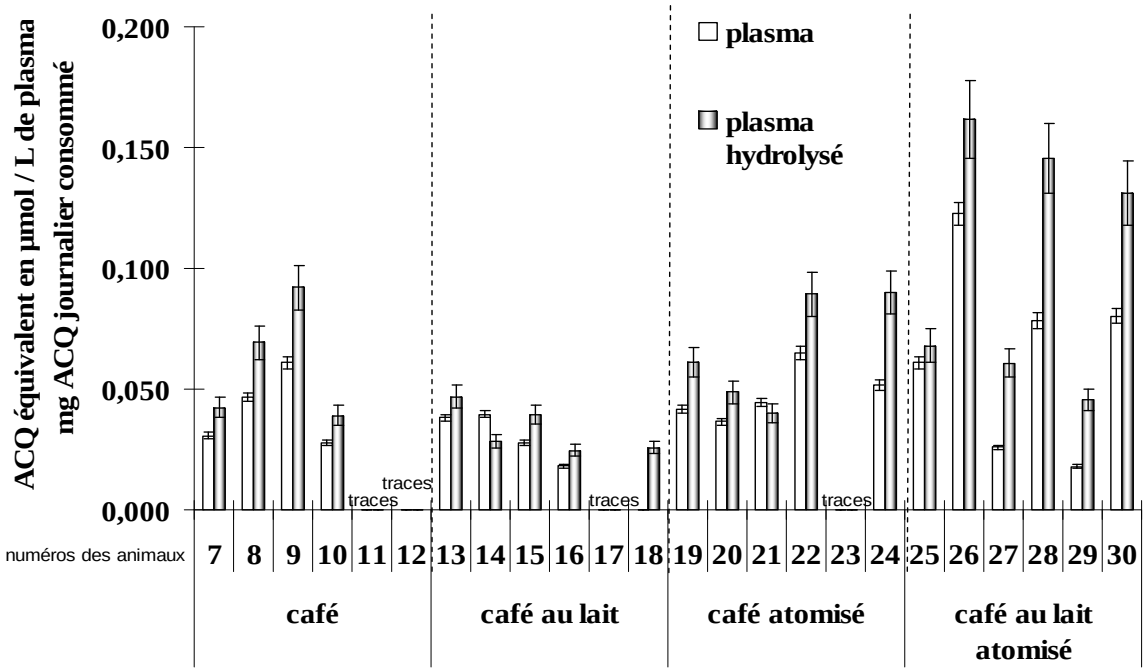


Figure 87 : Concentration plasmatique en composé 7 exprimé en équivalent acide chlorogénique (ACQ) pour les différents groupes, avec ou sans hydrolyse par le mélange sulfatase/β-glucuronidase et extraction selon le protocole d'extraction retenu

« traces » : rapport signal/bruit inférieur à 3

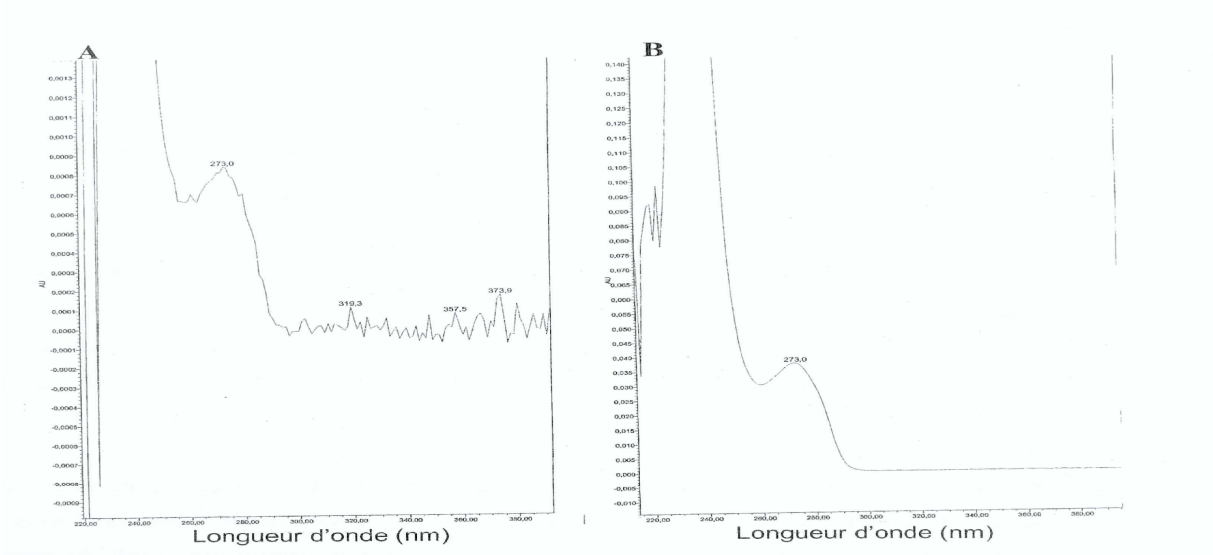


Figure 88 : Spectres du composé n°7 obtenu par analyse CLHP/UV à barrettes de diodes à partir de plasmas des groupes café ou café au lait (A) et spectre de l'acide benzoïque (B)

Conditions chromatographiques : Colonne C18 Interchrom (250x4,6 mm d.i. ; diamètre des particules 10 µm) ; Phase mobile : mélange eau / méthanol / acide acétique 88/10/2 (v/v/v) contenant 50 mmol/L d'acétate de lithium ; débit, 1 mL/min ; Conditions de détection spectrophotométrique : balayage spectral de 200 nm à 400 nm

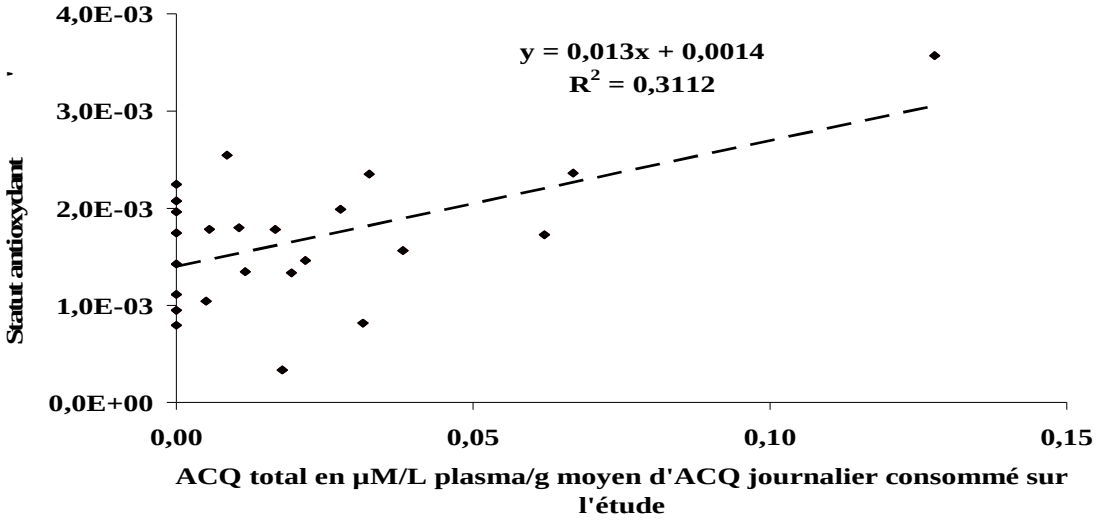


Figure 89 : Recherche d'une corrélation entre les quantités d'acide chlorogénique retrouvées dans les plasmas et le pouvoir antioxydant observé par le test TAC dans ces mêmes plasmas

Statut antioxydant exprimé en taux d'inhibition / µL de plasma / g d'alimentation consommée (test TAC)

BIBLIOGRAPHIE

Adam A., Crespy V., Levrat-Verny M.-A., Leenhardt F., Leuillet M., Demigné C. et Rémésy, C. (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *Journal of Nutrition, 132,* 1962-1968.

Ader P., Wessman A. et Wolffram S. (2000). Bioavailability and metabolism of flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology and Medicine, 28*(7), 1056-1067.

Allerdings E., Ralph J., Schatz P. F., Gniechwitz D., Steinhart H. et Bunzel M. (2005). Isolation and structural identification of diarabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre. *Phytochemistry, 66*(1), 113-124.

Ameer B., Weintraub R. A., Johnson J. V., Yost R. A. et Rouseff R. L. (1996). Flavone absorption after naringin, hesperidin and citrus administration. *Clinical Pharmacology and Therapeutics, 60,* 34-40.

Andreasen M. F., Kroon P. A., Williamson G. et Garcia-Conesa M.-T. (2001a). Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxicinnamates is distributed along the intestin of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(11), 5679-5684.

Andreasen M. F., Kroon P. A., Williamson G. et Garcia-Conesa M. T. (2001b). Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biology and Medicine, 31*(3), 304-314.

Anese M. et Nicoli M. C. (2003). Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(4), 942-6.

Arts I. C., Hollman P. C. H., Bueno de Mesquita B. H., Feskens E. J. et Kromhout D. (2001a). Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen Elderly Study. *International Journal of Cancer, 92*(2), 298-302.

Arts I. C., Hollman P. C. H., Fesken E. J. M., Bueno de Masquita B. H. et Kromhout D. (2001b). Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. *European Journal of Clinical Nutrition, 55,* 76-81.

Arts I. C., Hollman P. C. H., Fesken E. J. M., Bueno de Masquita B. H. et Kromhout D. (2001c). Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: The Zutphen Elderly Study. *American Journal of Clinical Nutrition, 74,* 227-232.

Arts M. J. T. J., Haenen G. R. M. M., Voss H. P. et Bast A. (2001d). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology, 39,* 787-791.

Arts M. J. T. J., Haenen G. R. M. M., Wilms L. C., Beestra S. A. J. N., Heijnen C. G., Voss H.-P. et Bast A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect of the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50,* 1184-1187.

Asquith T. N., Uhlig J., Mehansho H., Putman L., Carlson D. M. et Butler L. (1987). Binding of condensed tannins to salivary proline-rich glycoproteins: the role of carbohydrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35,* 331 - 334.

Azuma K., Ipposhi K., Nakayama M., Ito H., Higashio H. et Terao J. (2000). Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,* 5496-5500.

Azuma K., Ippoushi K., Ito H., Higashio H. et Terao J. (2002). Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(6), 1706-1712.

Azuma K., Ippoushi K., Ito H., Horie H. et Terao J. (2003). Enhancing effect of lipids and emulsifiers on the accumulation of quercetin metabolites in blood plasma after the short-term ingestion of onion by rats. *Bioscience Biotechnology Biochemistry, 67*(12), 2548-55.

Baba S., Osakabe N., Yasuda A., Natsume M., Takizawa T., Nakamura T. et Terao J. (2000). Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radical Research, 33,* 635-641.

Bacon J. et Rhodes M. J. C. (2000). Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,* 838-843.

Bartholome B., Estrella I. et Hernandez M. T. (2000). Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). *Food and Chemical Toxicology, 65*(4), 617-621.

Baxter N. J., Lilley T. H., Haslam E. et Williamson M. P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry, 18,* 5566-5577.

Beauvieux M.-C., Gin H. et Peuchant E. (2002). Le stress oxydant et ses marqueurs biologiques. *Cahiers de la Nutrition et de la Diététique, 37*(1), 45-51.

Belgendouz L. (1997). *Effets protecteurs des polyphénols du vin contre la modification oxydative des lipoprotéines légères plasmatiques*. Thèse de doctorat. U.F.R. Scientifique, Orsay. 128p.

Bell J. R. C., Donovan J. L., Wong R., Waterhouse A. L., German J. B., Walzem R. L. et Kasim-Karanzas S. E. (2000). (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *American Journal of Clinical Nutrition, 71,* 103-108.

Beveridge T. (1997). Haze and clouds in apple juices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 37*(1), 75-91.

Bianco A., Chiacchio U., Rescifina A., Romeo G. et Uccella N. (1997). Biomimetic supramolecular biophenol-carbohydrate and biophenol-protein models by NMR experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*(11), 4281-4285.

Bitsch R., Netzel M., Carle E., Strass G., Kesenheimer B., Herbst M. et Bitsch I. (2001). Bioavailability of antioxidative compounds from Brettacher apple juice in humans. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 1*(4), 245-249.

Block G., Patterson B. et Subar A. (1992). Fruit, vegetable, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer, 1, 8*1-29.

Bok S.-H., Lee S.-H., Park Y.-B., Bae K.-H., Son K.-H., Jeong T.-S. et Choi M.-S. (1999). Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activies of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl-CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or mixture of citrus bioflavonoids. *Journal of Nutrition, 129,* 1182-1185.

Borrelli R. C., Visconti A., Mennella C., Anese M. et Fogliano V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(22), 6527-33.

Bourne L. C. et Rice-Evans C. (1998a). Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 253,* 222-227.

Bourne L. C. et Rice-Evans C. (1998b). Urinary detection of hydroxycinnamates and flavonoids in humans after high dietary intake of fruit. *Free Radical Research, 28,* 429-438.

Boyer J. et Liu R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, *3*(1), 5.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, *56*(11), 317-333.

Bravo L., Manas E. et Saura-Calixto F. (1993). Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds: effects on faecal weight, and protein and fat excretion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *63*, 63-68.

Brown P. J. et Wright W. B. (1963). An Investigation of the interactions between milk proteins and tea polyphenols. *Journal of Chromatography A*, *11*, 504-514.

Bub A., Watzl B., Heeb D., Rechkemmer G. et Briviba K. (2001). Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *European Journal of Nutrition*, *40*(3), 113-120.

Buchanan C. J., Wallace G., Fry S. C. et Eastwood M. A. (1996). *In vivo* release of ^{14}C-labelled phenolic groups from intact dietary spinach cell walls during passage through the rat intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *71*(4), 459-469.

Bugianesi R., Salucci M., Leonardi C., Ferracane R., Catasta G., Azzini E. et Maiani G. (2004). Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and beta-carotene in cherry tomatoes. *European Journal of Nutrition*, *43*(6), 360-366.

Bunzel M., Allerdings E., Sinwell V., Ralph J. et Steinhart H. (2002). Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica L.*) insoluble dietary fibre. *European Food Research and Technology*, *214*(6), 482-488.

Bunzel M., Ralph J., Funk C. et Steinhart H. (2003). Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *European Food Research and Technology*, *217*(2), 128-133.

Bunzel M., Ralph J., Lu F., Hatfield R. D. et Steinhart H. (2004). Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 6496-6502.

Bunzel M., Ralph J., Marita J., Hatfiel R. D. et Steinhart H. (2001a). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*, 653-660.

Bunzel M., Ralph J., Marita J. M., Hatfield R. D. et Steinhart H. (2001b). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(7), 653-660.

Bunzel M., Ralph J. et Steinhart H. (2005). Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus L.*) dietary fiber. *Molecular Nutrition and Food Research*, *49*(6), 551-559.

Busti P., Gatti C. A. et Delorenzi N. J. (1998). Some aspects of beta-lactoglobulin structural properties in solution studied by fluorescence quenching. *International Journal of Biological Macromolecules*, *23*(2), 143-8.

Butler L. G., Riedl D. J., Lebryk D. G. et Blytt H. J. (1984). Interaction of proteins with Sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *61*(5), 916-620.

Caccia F., Dispenza R., Fronza G., Fuganti C., Malpezzi L. et Mele A. (1998). Structure of neohesperidin dihydrochalcone/beta-cyclodextrin inclusion complex: NMR, MS, and X-ray spectroscopic investigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(4), 1500-1505.

Castelluccio C., Bolwell G. P., Gerrish C. et Rice-Evans C. (1996). Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituent relation to its potential as an antioxidant. *Biochemical Journal*, *316*, 691-694.

Cermak R., Landgraf S. et Wolffram S. (2003). The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary Factors. *Journal of Nutrition*, *133*2802-2807.

Charlton A. J., Baxter N. J., Khan M. L., Moir A. J. G., Haslam E., Davies A. P. et Williamson M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1593-1601.

Chesson A., Provan G. J., Russell W. R., Scobbie L., Richardson A. J. et Stewart C. (1999). Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(3), 373-378.

Cheynier V. (2000). Compte rendu de la journée ACIA: rôle des polyphénols en alimentation et santé humaine. *Industries Agro Alimentaires, 12,* 20-24.

Chobert J. M (1995). Thermal modifications of structure and co-denaturation of alpha-lactalbumine and beta-lactoglobulin. In *Avances in food and nutrition research*; Taylor, S. E., Ed.; Boston : Elsevier Academic Press, 35-37.

Choudhury R., Srai S. K., Debnam E. et Rice-Evans C. (1999). Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radical Biology and Medicine, 27*(3-4), 278-286.

Chung K.-T., Wong T. Y., Wei C.-I., Huang Y.-W. et Lin Y. (1998a). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38*(6), 421-464.

Chung K. T., Lu Z. et Chou M. W. (1998b). Mechanism of inhibition of tannic and related compounds on the growth of initial bacteria. *Food and Chemical Toxicology, 36,* 1053-1060.

Clifford M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 1033-1043.

Clifford M. N., Johnston K. L., Knight S. et Kuhnert N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2900-2911.

Comalada M., Camuesco D., Sierra S., Ballester I., Xaus J., Galvez J. et Zarzuelo A. (2005). *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-*kappa*B pathway. *European Journal of Immunology, 35*(2), 584-92.

Cook N. C. et Samman S. (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *7,* 66-76.

Cosgrove D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature, 407*(6802), 321-326.

Crittenden R., Karppinen S., Ojanen S., Tenkanen M., Fagerström R., Mättö J., Saarela M., Mattila-Sandholm T. et Poutanen K. (2002). *In vitro* fermentation of cereal dietary fieber carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 82,* 781-789.

Czeczot H., Tudek B., Kusztelak J., Szymczyk T., Dobrowolska B., Glinkowska G., Malinowski J. et Strzelecka H. (1990). Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. *Mutation Research, 240*(3), 209-216.

Da Silva E. L., Piskula M. K., Yamamoto N. et Moon J.-H. (1998). Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Letters, 430*(3), 405-408.

Dangles O., Dufour C., Manach C. et Rémésy C. (2001). Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods in Enzymology, 335,* 319-333.

Day A. J., Bao Y., Kroon P. A., Morgan M. R. A. et Williamson G. (1999). Deglycosylation and conjugation of flavonol glycosides by humans. *SFRR Europe Winter Meeting, Bioflavonoids and polyphenols in health and diseases, Dinard, France.*

de Lorgeril M. et Salen P. (2001). Mediterranean type of diet for the prevention of coronary heart disease. *International Journal for Vitamin and Nutrition Cancer, 71*(3), 166-172.

de Pascual-Teresa S., Johnston K. L., DuPont M. S., O'Leary K. A., Needs P. W., Morgan L. M., Clifford M. N., Bao Y. et Williamson G. (2004). Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*. *Journal of Nutrition, 134*(3), 552-557.

de Vries J. H. M., Hollman P. C. H., Amersfoort I., Olthof M. R. et Katan M. B. (2001). Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in men. *Journal of Nutrition, 131,* 745-748.

Debry G. (1993). *Le café et la santé*. Montrouge, France: John Libbey Eurotext. 560p.

del Castillo M. D., Ames J. M. et Gordon M. H. (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(13), 3698-703.

Dewanto V., Wu X., Adom K. K. et Liu R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(10), 3010-4.

Donovan J. L., Bell J. R., Kasim-Karakas S., German J. B., Walzem R. L., Hansen R. J. et Waterhouse A. L. (1999). Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *Journal of Nutrition, 129,* 1662-1668.

Dorea J.G. et da Costa T.H. (2005). Is coffee a functional food? *British Journal of Nutrition,* 93 (6), 773-82.

Dooley T. P., Haldeman-Cahill R., Joiner J. et Wilborn T. W. (2000). Expression profiling of human sulfotransferase and sulfatase gene superfamilies in epithelial tissues and cultured cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *277*(1), 236-245.

Dufour C. et Dangles O. (2005). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biophysica Biochimica Acta*, *1721*(1-3), 164-73.

Eggum B. O., Pedersen B. et Jacobsen I. (1983). The influence of dietary tea, coffee and cocoa on protein and energy utilization of soya-bean meal and barley in rats. *British Journal of Nutrition*, *50*, 197-205.

Ekmekcioglu C. (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, *76*(2), 225-230.

Esterbauer H. et Ramos P. (1995). Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, *127*, 31-64.

Fayad N., Marchal L., Billaud C. et Nicolas J. (1997). Comparison of beta-cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(7), 2442-2446.

Feng R., Lu Y., Bowman L. L., Qian Y., Castranova V. et Ding M. (2005). Inhibition of AP-1, NF-*kappa* B and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 27888 - 27895.

Ferguson L. R., Chavan R. R. et Harris P. J. (2001). Changing concepts of dietary fiber : implication for carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, *39*(2), 155-169.

Figueroa-Espinoza M. C. et Villeneuve P. (2005). Phenolic acids enzymatic lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(8), 2779-2787.

Formica J. V. et Regelson W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, *33*(12), 1061-1080.

Frankel E. N., Kanner J., German J. B., Parks E. et Kinsella J. E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, *341*, 454-457.

Freitas V. et Mateus N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 940-945.

Fritz W. A., Coward L., Wang J. et Lamartiniere C. A. (1998). Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*, *19*(12), 2151-2158.

Fuhrman B., Lavy A. et Aviram M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, *61*, 549-554.

Funk C., Ralph J., Steinhart H. et Bunzel M. (2005). Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochemistry*, *66*(3), 363-371.

Gacche R. N., Zore G. B. et Ghole V. S. (2003). Kinetics of inhibition of polyphenol oxidase mediated browning in apple juice by beta-cyclodextrin and L-ascorbate-2-triphosphate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *18*(1), 1-5.

Gao T., Ci Y., Jian H. et An C. (2000). FTIR investigation of the interaction of tumor cells treated with caffeic acid and chlorogenic acid. *Vibrational Spectroscopy*, *24*(2), 225-231.

Geleijnse J. M., Launer L. J., Hofman A., Pols H. A. P. et Witteman J. C. M. (1999). Tea flavonoids may protect against atherosclerosis - The Rotterdam Study. *Archive of Internal Medicine*, *159*, 2170-2174.

Gil-Izquierdo A., Gil M. I. et Ferreres F. (2002a). Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(18), 5107-14.

Gil-Izquierdo A., Zafrilla P. et Tomás-Barberán F. A. (2002b). An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, *214*(2), 155-159.

Gil M. I., Tomás-Barberán F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M. et Kader A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(10), 4581-4589.

Glahn R. P., Wien E. M., Van Campen D. R. et Miller D. D. (1996). Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels *in vivo* studies: use of a novel *in vitro* method for rapid estimation of iron bioavailability. *Journal of Nutrition*, *126*(1), 332-9.

Gokmen V., Acar J. et Kahraman N. (2003). Influence of conventional clarification and ultrafiltration on the phenolic composition of golden delicious apple juice. *Journal of Food Quality, 26,* 257-266.

Goldberg D. M., Yan J. et Soleas G. J. (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry, 36*(1), 79-87.

Gonthier M.-P., Verny M.-A., Besson C., Rémésy C. et Scalbert A. (2003a). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Journal of Nutrition, 133,* 1853-1859.

Gonthier M. P., Cheynier V., Donovan J. L., Manach C., Morand C., Mila I., Lapierre C., Remesy C. et Scalbert A. (2003b). Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *Journal of Nutrition, 33*(2), 461-467.

Graefe E. U., Derendorf H. et Veit M. (1999). Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in human. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 37*(5), 219-233.

Graham H. N. (1992). Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine, 21,* 334-350.

Griffith A. et Moseley G. (1980). The effect of diets containing field beans of high and low polyphenolic content on the activity of five enzymes in the intestines of rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 31,* 255-259.

Gusman J., Malonne H. et Atassi G. (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis, 22*(8), 1111-1117.

Guyot S., Marnet N., Sanoner P. et Drilleau J. F. (2003). Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(21), 6240-6247.

Halliwell B. (2003). Health benefits of eating chocolate? *Nature, 42, 6*787.

Harder H., Tetens I., Let M. B. et Meyer A. S. (2004). Rye bran bread intake elevates urinary excretion of ferulic acid in humans, but does not affect the susceptibility of LDL to oxidation *ex vivo*. *European Journal of Nutrition, 43*(4), 230-236.

Haslam E. et Lilley T. H. (1988). Natural astringency in foodstuffs - A molecular interpretation. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, *27*(1), 1-40.

Haslam E., Lilley T. H., Warminski E., Lio H., Cai Y., Martin R., Gaffney S. H., Goulding P. N. et Luck G. (1992). Polyphenol complexation, a study in molecular recognition. In *Phenolic compounds in foods and their effect on health, I: Analysis, occurence and chemistry*. Ho C. T.,Lee C. Y. et Huan, M. T., Eds. Washington, U.S.A.: ACS Symposium Series, 8-49.

Hendrich S. (2002). Bioavailability of isoflavones. *Journal of Chromatography B, 777*(1-2), 203-210.

Heo Y. H., Kim S., Park J. E., Jeong L. S. et Lee S. K. (2001). Induction of quinone reductase activity by stilbene analogs in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, *24*(6), 597-600.

Herrmann K. (1989). Occurence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *28*(4), 315-347.

Hertog M. G., Feskens E. J., Hollman P. C., Katan M. B. et Kromhout D. (1993a). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet, 342*(8878), 1007-1011.

Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Katan M. B. et Kromhout D. (1993b). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, *20*, 21-29.

Hertog M. G. L., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M., Simic B. S., Toshima H., Fesken E. J. M., Hollman P. C. H. et Katan M. B. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in Seven Countries Study. *Archives of Internal Medicine, 155*, 381-386.

Hirvonen T., Pieten P., Virtamo J., Ovaskainen M.-L., Häkkinen S. et Albanes D. (2001a). Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology*, *12*(1), 62-67.

Hirvonen T., Virtamo J., Korhonen P., Albanes D. et Pieten P. (2000). Intake of flavonoids, carotenoids, vitamin C and E, and risk of stroke in male smokers. *Stroke, 31,* 2301-2306.

Hirvonen T., Virtamo J., Korhonen P., Albanes D. et Pietinen P. (2001b). Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes and Control, 12*, 789-796.

Hollman P. C. H., Van Het Hof K. H., Tijburg L. B. M. et Katan M. B. (2000). Addition of milk does not affect the absorption of flavonols from tea in man. *Free Radical Research, 34*, 297-300.

Hollman P. C. H., van Trijp J. M. P., Buysman M. N. C. P., v.d. Gaag M. S., Mengelers M. J. B., de Vries J. H. M. et Katan M. B. (1997a). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoids quercetin from various food in man. *FEBS Letters, 418,* 152-156.

Hollman P. C. H., Van Trijp J. M. P., Mengelersa M. J. B., de Vries J. H. M. et Katan M. B. (1997b). Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Letters, 114*(1-2), 139-140.

Holt C. et Roginski H. (2001). Milk proteins:biological and food aspects of structure and function. In *Chemical and functional properties of food proteins.* Sikorski Z. E. Ed.; Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc., 271-334.

Hurell R. F., Finot P. A. et Cuq J. L. (1982). Protein-polyphenol reactions: I. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *British Journal of Nutrition, 47,* 191-211.

I.S.L.I. (1999). Safety assesment and health benefites of food components based on selected scientific criteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39*(3), 203.

Igarashi K. et Ohmuma M. (1995). Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59*(4), 595-601.

Ishikawa T. et Noble A. C. (1995). Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference, 6*(1), 27-33.

Iwai Y., Nakaya N., Kawazaki Y. et Matsue H. (2002). Antioxydative fonction of natto, a kind of fermented soybeans: effect on LDL oxidation and lipid metabolism in chlolesterol-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3597-601.

Jacobs D. R., Meyer K. A., Kushi L. H. et Folsom A. R. (1998). Whole-grain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in postmenoposal women : the Iowa Women's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition, 68,* 248-257.

Jacobs D. R., Pereira M. A., Meyer K. A. et Kushi L. H. (2000). Fiber from whole-grain, but not refined grains, is inversely associated with all-cause mortality in older women : the Iowa Women's Health Study. *Journal of the American College of Nutrition, 19*(3), 326S-330S.

Janssen P. M. T. L. K., Mensink R. P., Cox F. J. J., Harryvan J. L., Hovenier R., Hollman P. C. H. et Katan M. B. (1998). Effect of flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volonteers: results from an *in vitro* and a dietary supplement study. *American Journal of Clinical Nutrition, 67,* 255-262.

Jing H. et Kitts D. D. (2004a). Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 429*(2), 154-163.

Jing H. et Kitts D. D. (2004b). Chemical characterization of different sugar-casein Maillard reaction products and protective effects on chemical-induced cytotoxicity of Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology, 42*(11), 1833-1844.

Jouan P. (2002). *Lactoprotéines et lactopeptides. Propriétés biologiques.* Jouy-en Josas, France: Institut National de la Recherche Agronomique. 128p.

Ju Z. et Bramlage W. J. (1999). Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Postharvest Biology and Technology, 16*(2), 107-118.

Kallithraka S., Bakker J. et Clifford M. N. (1997). Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid. *Journal of Food Science, 62,* 416-420.

Kampa M., Nistikaki A., Tsaousis V., Maliaraki N., Notas G. et Castanas E. (2002). A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clinical Pathology, 2*(1), 1-16.

Kang J., Liu Y., Xie M.-X., Li S., Jiang M. et Wang Y.-D. (2004). Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1674(2), 205-214.

Kasai H., Fukada S., Yamaizumi Z., Sugie S. et Mori H. (2000). Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology, 38*(5), 467-471.

Kasum C. M., Nicodemus K., Harnack L. J., Jacobs D. R. et Folsom A. R. (2001). Whole grain intake and incident endometrial cancer : the Iowa Women's Health Study. *Nutrition and Cancer, 39*(2), 180-186.

Keli S. O., Hertog M. G., Feskens E. J. et Kromhout D. (1996). Dietary flavonoids, antioxidant vitamins and incidence of stroke: the Zutphen study. *Archive of Internal Medicine, 156,* 637-642.

Kern S. M., Bennett R. N., Mellon F. A., Kroon P. A. et Garcia-Conesa M. T. (2003). Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(20), 6050-6055.

Kinsella J. E., Frankel E. N., German J. B. et Kanner J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant food. *Food Technology, 4, 7*85-789.

Kitts D. D. et Weiler K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design, 9*(16), 1309-23.

Knekt P., Järvinen R., Reunanen A. et Maatela J. (1996). Flavonoids intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ, 132,* 478-481.

Knekt P., Järvinen R., Seppänen R., Heliövaara M., Teppo L., Pukkala E. et Aromaa A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology, 146*(3), 223-230.

Konishi Y. et Kobayashi S. (2004). Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(9), 2518-2526.

Kroll J., Rawel H. M. et Seidelmann N. (2000). Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of myoglobin-phenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,* 1580-1587.

Kroon P. A., Faulds C. B., Ryden P., Robertson J. A. et Williamson G. (1997). Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*(3), 661-667.

Kroon P. A., Williamson G., Fish N. M., Archer D. B. et Belsham N. J. (2000). A modular esterase from penicillium funiculosum which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *European Journal of Biochemistry, 267,* 6740-6752.

Krul C., Luiten-Schuite A., Tenfelde A., van Ommen B., Verhagen H. et Havenaar R. (2001). Antimutagenic activity of green tea and black tea extacts studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Mutation Research, 474,* 71-85.

Kunhau J. (1976). The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics, 24,* 117-191.

Kuti J. O. et Konuru H. B. (2004). Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidoscolus spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(1), 117-21.

Langley-Evans S. C. (2000). Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential in humans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 51*(5), 309-315.

Lapidot T., Harel S., Granit R. et Kanner J. (1998). Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(10), 4297-4302.

Larrauri J. A., Ruperez P. et Saura-Calixto F. (1997). Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*(10), 4028-4031.

Le Bourvellec C., Guyot S. et Renard C. M. (2004a). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta, 1672*(3), 192-202.

Le Bourvellec C., Le Quere J. M., Sanoner P., Drilleau J. F. et Guyot S. (2004b). Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(1), 122-130.

Lee F. A. (1983). Cocoa and chocolate. In *Basic food chemistry second edition*. Wesport, Connecticut, U.S.A. : AVI inc., pp 448-451.

Léger C. L., Carbonneau M.-A. et Descomps B. (2000). Consommation de vin et prévention contre les maladies cardiovasculaires. In *Alimentation méditerrannéenne et santé: actualité et perspectives.* Montrouge: Eurotext J. L..pp 81-97.

Lesser S., Cermak R. et Wolffram S. (2004). Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *Journal of Nutrition, 134*(6), 1508-1511.

Liegeois C., Lermusieau G. et Collin S. (2000). Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*(4), 1129-1134.

López-Galilea I., Andueza S., di Leonardo I., de Peña M. P. et Cid C. (2005). Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee. *Food Chemistry, Article in Press, Corrected Proof - Note to users*.

Lussignoli S., Fraccaroli M., Andrioli G., Brocco G. et Bellavite P. (1999). A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. *Analytical Biochemistry, 269*(1), 38-44.

Macheix J.-J., Fleuriet A. et Billot J. (1990). *Fruits phenolics*. Florida: Boca Raton. 378p.

Maeztu L., Andueza S., Ibanez C., Paz de Pena M., Bello J. et Cid C. (2001). Multivariate methods for characterization and classification of espresso coffees from different botanical varieties and types of roast by foam, taste, and mouthfeel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(10), 4743-4747.

Maillard M.-N. (1996). *Contribution à l'amélioration de la stabilité organoleptique de la bière : suivi du comportement de quelques antioxydants endogènes de l'orge et du malt*. Thèse de doctorat. ENSIA, Massy. 148p.

Maillard M.-N. et Berset C. (1995). Evolution of the antioxidant activity during kilding: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43,* 1789-1793.

Makris D. P. et Rossiter J. T. (2001). Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): effect on flavonol content and antioxidant status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(7), 3216-3222.

Malpezzi L., Fronza G., Fuganti C., Mele A. et Bruckner S. (2004). Crystal architecture and conformational properties of the inclusion complex, neohesperidin dihydrochalcone-cyclomaltoheptaose (beta-cyclodextrin), by X-ray diffraction. *Carbohydrate Research*, *339*(12), 2117-2125.

Manach C. (1998). *Biodisponibilité des flavonoïdes*. Thèse de doctorat. INRA, Clermont Ferrand. 112p.

Manach C., Morand C., Gil-Izquierdo A., Bouteloup-Demange C. et Remesy C. (2003). Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition*, *57*(2), 235-242.

Manach C., Morand C., Texier O., Favier M.-L., Agullo G., Demigné C., Régérat F. et Rémésy C. (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *Journal of Nutrition*, *125*, 1911-1922.

Manach C., Texier O., Morand C., Crespy V., Régénat F., Demigné C. et Rémésy C. (1999). Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, *27*(11/12), 1259-1266.

Marshall K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, *9*(2), 136-156.

Masella R., Vari R., D'Archivio M., Di Benedetto R., Matarrese P., Malorni W., Scazzocchio B. et Giovannini C. (2004). Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *Journal of Nutrition*, *134*(4), 785-91.

Massiot P. et Renard C. M. G. C. (1997). Composition, physico-chemical properties and enzymatic degradation of fibres prepared from different tissues of apple. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, *30*(8), 800-806.

Mehansho H., Clements S., Sheares B. T., Smith S. et Calson D. M. (1985). Induction of proline-rich glycoprotein synthsis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(7), 4418-4423.

Meyer A. S., Donovan J. L., Pearson D. A., Waterhouse A. L. et Frankel E. N. (1998). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46,* 1783-1787.

Mihalev K., Schieber A., Mollov P. et Carle R. (2004). Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(24), 7306-7310.

Missang C. E., Massiot P., Baron A. et Drilleau J. F. (1993). Effect of oxidative browning of apple pulp on the chemical and enzymatic extraction of cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Polymers, 20*(2), 131-138.

Mitaru B. N., Reichert R. D. et Blair R. (1984). The binding of dietary protein by Sorghum tannins in the digestive tract of pigs. *Journal of Nutrition, 114,* 1787-1796.

Moon J.-H., Nakata R., Oshima S., Inakuma T. et Terao J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after a short-term ingestion of onion by women. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 279,* R461-R467.

Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C. et Vincieri F. F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(8), 3509-14.

Mullen W., Graf B. A., Caldwell S. T., Hartley R. C., Duthie G. G., Edwards C. A., Lean M. E. J. et Crozier A. (2002). Determination of flavonols metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-^{14}C]quercetin-4'-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(23), 6902-6909.

Mustafa R. (2005). *Oxydation de composés phénoliques par les laccases de Myceliophthora thermophila et de Trametes sp. en milieu hydroorganique biphasique, application à la synthèse de colorants*. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. 257p.

Naczk M., Oickle D., Pink D. et Shahidi F. (1996). Protein precipitating capacity of crude canola tannins: effect of pH, tannin, and protein concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44,* 2144-2148.

Nardini M., Cirillo E., Natella F. et Scaccini C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*5735-5741.

Nardini M., D'Aquino M., Tomassi G., Gentili V., Di Felice M. et Scaccini C. (1995). Inhibition of human low density lipoproteins oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivates. *Free Radical Biology and Medicine, 19*(5), 541-552.

Natarajan K., Singh S., Burke T. R. Jr., Grunberger D. et Aggarwal B. B. (1996). Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-*kappa* B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93*(17), 9090-9095.

Natella F., Nardini M., Giannetti I., Dattilo C. et Scaccini C. (2002). Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(21), 6211-6216.

Ness A. et Powles J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular diseases: a review. *International Journal of Epidemiology, 26*(1), 1-13.

Netzel M., Strass G., Janssen M., Bitsch I. et Bitsch R. (2000). Bioavailabilities of blackcurrent anthocyanins in humans. In *Dietary anticarcinogens and antimutagens: chemical and biological aspects*; Johnston I. T. et Fenwick G. R., Eds. Cambridge, U.K. : Royal Society of Chemistry. pp 43-53.

Nicolas J. J., Richard-Forget F. C., Goupy P. M., Amiot M.-J. et Aubert S. Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34*(2), 109-154.

Nicoli M. C., Anese M., Manzocco L. et Lerici C. R. (1997). Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 30*(3), 292-297.

Oh H. I., Hoff J. E., Armstrong G. S. et Haff L. A. (1980). Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28,* 394-398.

Ohta T., Yamasaki S., Egashira Y. et Sanada H. (1994). Antioxidative activity of corn bran hemicellulose fragments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*(3), 653-656.

Oliveira M. V. B., Badia E., Carbonneau M.-A., Grimaldi P., Fouret G., Lauret C. et Leger C. L. (2004). Potential anti-atherogenic cell action of the naturally occurring 4-O-methyl derivative of gallic acid on Ang II-treated macrophages. *FEBS Letters, 577*(1-2), 239-244.

Olthof M. R., Hollman P. C. et Katan M. B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition, 131*(1), 66-71.

Olthof M. R., Hollman P. C., Vree T. B. et Katan M. B. (2000). Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *Journal of Nutrition, 130*(5), 1200-1203.

Olthof M. R., Hollman P. C. H., Buijsman M. N. C. P., Van Amelsvoort J. M. M. et Katan M. B. (2003). Chlorogenic Acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *Journal of Nutrition, 133*, 1806-1814.

Paganga G. et Rice-Evans C. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters, 401*, 78-82.

Papadopoulou A., Green R. J. et Frazier R. A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(1), 158-163.

Parr A. J., Ng A. et Waldron K. W. (1997). Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*(7), 2468-2471.

Pedone S., Selvagginni R. et Fantozzi P. (1995). Leaf protein availability in food: significance of the binding of phenolic compounds to ribulose 1-5-diphosphate carboxylase. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 28*, 625-634.

Petzke K. J., Schuppe S., Rohn S., Rawel H. M. et Kroll J. (2005). Chlorogenic acid moderately decreases the quality of whey proteins in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(9), 3714-3720.

Peyrat-Maillard M. N., Cuvelier M.-E. et Berset C. (2003). Antioxidant activity of phenolic compounds in 2-2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation : synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 80*(10), 1007-1012.

Phillips L. G., Whitehead D. M. et Kinsella J. (1994). Structural and chemical properties of β-lactoglobuline. In *Structure-function Properties of food protein*; New York: Academic press inc. pp 75-106.

Pignatelli P., Pulcinelli F. M., Celestini A., Lenti L., Ghiselli A., Gazzaniga P. P. et Violi F. (2000). The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platellet function by

antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *American Journal of Clinical Nutrition, 72,* 1150-1155.

Piskula M. K. et Terao J. (1998a). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *Journal of Nutrition, 128,* 1172-1178.

Piskula M. K. et Terao J. (1998b). Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*(10), 4313-4317.

Plumb G. W., Garcia-Conesa M. T., Kroon P. A., Rhodes M., Ridley S. et Williamson G. (1999). Metabolism of chlorogenic acids by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 79,* 390-392.

Prigent S. V. E., Gruppen H., Visser A. J. W. G., van Koningsveld G. A., de Jong G. A. H. et Voragen A. G. J. (2003). Effects of Non-covalent Interactions with 5-O-Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of Globular Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(17), 5088-5095.

Prior R. L. et Cao G. (1999). *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine, 27*(11-12), 1173-1181.

Ramalakshmi K. et Raghavan B. (1999). Caffeine in coffee: its removal. Why and how?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *39*(5), 441-456.

Rawel H. M., Czajka D., Rohn S. et Kroll J. (2002a). Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules, 30*(3-4), 137-150.

Rawel H. M., Kroll J. et Hohl U. C. (2001a). Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Nahrung*, *45*(2), 72-81.

Rawel H. M., Kroll J. et Rohn S. (2001b). Reactions of phenolic substances with lysozyme — physicochemical characterisation and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chemistry*, *72*(1), 59-71.

Rawel H. M., Meidtner K. et Kroll J. (2005). Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(10), 4228-35.

Rawel H. M., Rohn S., Kruse H.-P. et Kroll J. (2002b). Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. *Food Chemistry, 78*(4), 443-455.

Rechner A. R., Spencer J. P. E., Kuhnle G., Hahn U. et Rice-Evans C. (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(11), 1213-1222.

Reddy N. D. et Pierson M. D. (1985). Dry bean tannins: a review of nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *62*(3), 541-549.

Redgwell R. J., Trovato V. et Curti D. (2003). Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. *Food chemistry*, *80*(4), 511-516.

Reiterer G., Toborek M. et Hennig B. (2004). Quercetin protects against linoleic acid-induced porcine endothelial cell dysfunction. *Journal of Nutrition*, *134*(4), 771-775.

Relkin P. (1996). Thermal unfolding of beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *36*(6), 565-601.

Renard C. M., Baron A., Guyot S. et Drilleau J. F. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, *29*(2), 115-125.

Renaud S. et de Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, *339*, 1523-1526.

Richelle M., Tavazzi I. et Offord E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 3438-3442.

Riedl K. M. et Hagerman A. E. (2001). Tannin-protein complexes as radical scavengers sinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4917-4923.

Rimm E. B., Asherio A., Giovannuci E., Spiegelman D., Stampfer M. J. et Willett W. (1996a). Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *Journal of American Medical Association*, *275*(6), 447-451.

Rimm E. B., Katan M. B., Asherio A., Stampfer M. J. et Willett W. (1996b). Relation between flavanoids and risk for coronary heart disease in Male Health Professionnals. *Annals of Internal Medicine*, *125*(5), 384-389.

Rodis P. S., Karathanos V. T. et Mantzavinou A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(3), 596-601.

Rodriguez-Arcos, R. C., Smith, A. C. et Waldron, K. W. (2002). Effect of storage on wall-bound phenolics in green asparagus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(11), 3197-203.

Rohn S., Rawel H. M. et Kroll J. (2004). Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(15), 4725-4729.

Rondini L. (2002). *Biodisponibilité et pouvoir antioxydant de l'acide férulique et de ses métabolites*. Thèse de doctorat. ENSIA, Massy. 152p.

Rondini L., Dupas C., Marsset-Bagliéri A., Berset C. et Peyrat-Maillard M.-N. (2003). Biodisponibilité des composés phénoliques et de leurs métabolites. *NAFAS, 1*(3), 19-57.

Rondini L., Peyrat-Maillard M.-N., Marsset-Baglieri A. et Berset C. (2002). Sulfated ferulic acid is the man *in vivo* metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50,* 3037-3041.

Rondini L., Peyrat-Maillard M. N., Marsset-Baglieri A., Fromentin G., Durand P., Tome D., Prost M. et Berset C. (2004). Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(13), 4338-4343.

Rubio L. A. et Seiquer I. (2002). Transport of amino acids from *in vitro* digested legume proteins or casein in Caco-2 cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(18), 5202-5206.

Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S. et Yamaji N. (1998). Antiulcer activity of grape seed extract procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*(4), 1460-1464.

Sakamoto W., Isomura H., Fujie K., Nishihira J., Ozaki M. et Yukawa S. (2003). Coffee increases levels of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in rats. *Toxicology*, *183*(1-3), 255-263.

Salvi A., Carrupt P.-A., Tillement J.-P. et Testa B. (2001). Structural damage to proteins caused by free radicals: asessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology, 61*(10), 1237-1242.

Sánchez-González I., Jiménez-Escrig A. et Saura-Calixto F. (2005). *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, *90*(1-2), 133-139.

Sanoner P., Guyot S., Marnet N., Molle D. et Drilleau J. P. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica sp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(12), 4847-53.

Sazuka M., Itoi T., Suzuki Y., Odani S., Koide T. et Isemura M. (1996). Evidence for the interaction between (-)-epigallocatechin gallate and human plasma proteins fibronectin, fibrinogen, and histidine-rich glycoprotein. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60*(8), 1317-1319.

Scalbert A. et Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition, 130,* 2073S-2085S.

Schroeter H., Holt R. R., Orozco T. J., Schmitz H. H. et Keen C. L. (2003). Milk and absorption of dietary flavonols. *Nature, 426,* 787-788.

Serafini M., Bugianesi R., Maiani G., Valtuena S., De Santis S. et Crozier A. (2003). Plasma antioxidants from chocolate. *Nature, 424*(6952), 1013.

Serafini M., Ghiselli A. et Ferro-Luzzi A. (1996). *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition, 50,* 28-32.

Serafini M., Maiani G. et Ferro-Luzzi A. (1997). Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*(8), 3148-3151.

Serafini M., Maiani G. et Ferro-Luzzi A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutrition, 128,* 1003-1007.

Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G. et Morozzi G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A, 1054*(1-2), 113-127.

Sesink A. L. A., O'Leary K. A. et Hollman P. C. H. (2001). Quercetine glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *Journal of Nutrition, 131,* 1938-1941.

Shahkhalili Y., Finot P. A., Hurell R. et Fern E. (1990). Effect of foods rich in polyphenols on nitrogen excretion in rats. *Journal of Nutrition, 120,* 346-352.

Shamanthaka S. M. C. et Narasinga R. M. S. (1990). Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11S protein of sunflower *(Helianthus annus)* seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(12), 2103-2110.

Shirahata S., Murakami H., Nishiyama K., Yamada K., Nonaka G.-i., Nishioka I. et Omura H. (1989). DNA breakage by flavan-3-ols and procyanidins in the presence of cupric ion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*(2), 299-303.

Siebert K. J. (1999). Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(2), 353-362.

Siebert K. J., Troukhanova N. V. et Lynn P. Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(1), 80-85.

Smith C. M. et Reynard A. M. (1995). *Essentials of Pharmacology*. Philadelphia: W.D. Saunders Compagny. 680p.

Somoza V., Lindenmeier M., Wenzel E., Frank O., Erbersdobler H. F. et Hofmann T. (2003). Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using *in vitro* and *in vivo* techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(23), 6861-6869.

Spagna G., Barbagallo R. N., Chisari M. et Branca F. (2005). Characterization of a tomato polyphenol oxidase and its role in browning and lycopene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 2032-2038.

Spencer C. M., Cai Y., Martin R., Gaffney S. H., Goulding P. N., Magnolato D., Lilley T. H. et Haslam E. (1988). Polyphenol complexation - some thoughts and observations. *Phytochemistry*, *27*(8), 2397-2409.

Spencer J. P. E., Schroeter H., Crossthwaithe A. J., Kuhnle G. et Williams R. J. (2001). Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*(9), 1139-1146.

Sun A. Y., Simonyi A. et Sun G. Y. (2002). The "French Paradox" and beyond : neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, *32*(4), 314-318.

Sun T., Tang J. et Powers J. R. (2005). Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(1), 42-48.

Szente L. et Szejtli J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(3-4), 137-142.

Tew B.-y., Xu X., Wang H.-J., Murphy P. A. et Hendrich S. (1996). A diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. *Journal of Nutrition*, *126*, 871-877.

Tijburg L. B. M., Mattern T., Folts J. D., Weisgerber U. M. et Katan M. B. (1997). Tea flavonoids and cardiovascular diseases: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *37*(8), 771-785.

Trichopoulou A., Androniki N. et Vasilopoulou E. (2001). Guidelines for the intake of vegetables and fruits : the Mediterranean approch. *International Journal for Vitamin and Nutrition Cancer*, *71*(3), 149-153.

Tronc J. S., Lamarche F. et Makhlouf J. (1997). Enzymatic browning inhibition in cloudy apple juice by electrodialysis. *Journal of Food Science*, *62*(1), 75-78.

Tubaro F., Ghiselli A., Rapuzzi P., Maiorino M. et Ursini F. (1998). Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*, *24*(7-8), 1228-1234.

Tuck K. L., Freeman M. P., Hayball P. J., Strech G. L. et Stupans I. (2001). The *in vivo* fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intraveinous and oral dosing of labeled compounds to rats. *Journal of Nutrition*, *131*, 1993-1996.

Uehara M., Ohta A., Sakai K., Suzuki K., Watanabe S. et Aldercreutz H. (2001). Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose of genistein and daidzein and affect their urinary excretion and kinetic blood of rat. *Journal of Nutrition*, *131*(3), 787-795.

Van Der Sluis A. A., Dekker M., Skrede G. et Jongen W. M. (2002). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(25), 7211-7219.

Van der Sluis A. A., Dekker M., Skrede G. et Jongen W. M. (2004). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 2. Effect of novel production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(10), 2840-2848.

Van Het Hof K. H., Kivits G. A. A., Westrate J. A. et Tijburg L. B. M. (1998). Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *European Journal of Clinical Nutrition, 52,* 356-359.

Vander A. J., Sherman J. H. et Luciano D. S. (1995). *Physiologie humaine*. Montréal: Mc Graw-Hill.

Vardin H. et Fenercioglu H. (2003). Study on the development of pomegranate juice processing technology: clarification of pomegranate juice. *Nahrung, 47*(5), 300-303.

Vercauteren J., Arnaudinaud V., Mas T., Verge S., Soulet S., Castagnino C. et Cheze C. (1999). Y-a-t-il encore de la place demain pour des aliments sans polyphénols ? *Lettre scientifique de l'institut français pour la nutrition, 68,* 1-8.

Vinson J. A., Dabbag Y. A., Serry M. M. et Jang J. (1995a). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model of heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43*(11), 2800-2802.

Vinson J. A., Hu S.-J., Jung S. et Stanki A. M. (1998). A citrus extract plus ascorbic acid decreases lipids, lipid peroxides lipoprotein oxidative suceptibility, and atherosclerosis in hypercholesterolemic hamster. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*(4), 1453-1459.

Vinson J. A., Jang J., Dabbag Y. A., Serry M. M. et Cai S. (1995b). Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43*(11), 2798-2799.

Vinson J. A., Proch J. et Zubik L. (1999). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(12), 4821-4824.

Visioli F. et Galli C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42*(3), 209-221.

Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F. F. et Galli C. (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(8), 3397-401.

Vissers M. N., Zock P. L. et Katan M. B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition, 58*(6), 955-965.

Willett W. (2000). Diet and cancer. *The Oncologist*, *5*393-404.

Williamson M. P., Trevitt C. et Noble J. M. (1995). NMR studies of dextran oligomer interactions with model polyphenols. *Carbohydrate Research*, *266*(2), 229-235.

Wittemer S. M., Ploch M., Windeck T., Muller S. C., Drewelow B., Derendorf H. et Veit M. (2005). Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. *Phytomedicine*, *12*(1-2), 28-38.

Wong P. Y. et Kitts D. D. (2003). Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity. *Journal of Dairy Science*, *86*(5), 1541-1547.

Wu X., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E. et Prior R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(12), 4026-4037.

Wu X., Cao G. et Prior R. L. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *Journal of Nutrition*, *132*, 1865-1871.

Yamakoshi J., Piskula M. K., Izumi T., Tobe K., Saito M., Katoaka S., Obata A. et Kikuchi M. (2000). Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Nutrition*, *130*, 1887-1893.

Yan J.-J., Cho J.-Y., Kim H.-S., Kim K.-l., Jung J.-S., Huh S.-O., Suh H.-W., Kim Y.-H. et Song D.-K. (2001). Protection against β-amylloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. *British Journal of Pharmacology*, *133*, 89-96.

Yanagimoto K., Lee K. G., Ochi H. et Shibamoto T. (2002). Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(19), 5480-5484.

Yen W. J., Wang B. S., Chang L. W. et Duh P. D. (2005). Antioxidant properties of roasted coffee residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(7), 2658-2663.

Yokozawa T., Nakagawa T. et Kitani K. (2002). Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(12), 3549-3552.

Zafar T. A., Weaver C. M., Jones K., Moore D. R., 2nd et Barnes S. (2004). Inulin effects on bioavailability of soy isoflavones and their calcium absorption enhancing ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(10), 2827-2831.

Zhao Z., Egashira Y. et Sanada H. (2003). Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. *Journal of Nutrition, 133,* 1355-1361.

Zhao Z., Egashira Y. et Sanada H. (2005). Phenolic antioxidants richly contained in corn bran are slightly bioavailable in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(12), 5030 - 5035.

INFLUENCE DES PROTEINES LAITIERES SUR LE POUVOIR ANTIOXYDANT ET LA BIODISPONIBILITE DES POLYPHENOLS DU CAFE

Résumé :

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer l'effet de l'ajout de lait et/ou de l'atomisation sur le pouvoir antioxydant du café, ainsi les effets sur l'organisme de telles préparations.

Des interactions entre les protéines du lait et l'acide chlorogénique du café, ont été mises en évidence, mais n'ont pas d'effet marqué sur le pouvoir antioxydant des boissons. Elles diminuent lors de la digestion. Enfin, tous les groupes ayant reçu du café lors d'une étude de biodisponibilité *in vivo* en chronique, présentent un statut antioxydant plasmatique amélioré, mais qui n'est que faiblement corrélé à la présence d'acides phénoliques dans le plasma. L'ajout de lait ou l'atomisation ne modifient pas ce résultat.

En conclusion, des interactions se forment dans le café au lait, mais ne se répercutent pas sur son effet santé bénéfique.

Mots clés : interactions, biodisponibilité, acide chlorogénique, protéines, café, lait, pouvoir antioxydant.

BIOAVAILIBILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COFFEE POLYPHENOLS : THE EFFECT OF MILK PROTEINS

Abstract :

The aim of this study was to assess the effect of usual coffee consumption conditions, such as the addition of milk and spray-drying, on beverage antioxidant power and health effects. Interactions between caffeoyl-quinic acids and milk proteins of the beverage were shown, but did not seem to have any effect on beverage antioxidant power and proved to be slightly destroyed during digestion

Coffee chronic consumption enhances plasma antioxidant status in the rat, but this effect is weakly correlated with plasma phenolic acids contents, and no milk or spray-drying effect could be assessed.

As a conclusion, some interactions occur in coffee and milk beverage, but have no significant effect on health benefits obtained from coffee drinking.

Keywords: interactions, bioavailability, chlorogenic acid, proteins, coffee, milk, antioxidant power.