



Étude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels

Aude Hyardin

► To cite this version:

Aude Hyardin. Étude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2008. Français. NNT : 2008INPL038N . tel-01749749

HAL Id: tel-01749749

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749749>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale – Ressources Procédés Produits Environnement

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Nutrition

Par

Aude HYARDIN

Soutenue le 25 septembre 2008

CONFIDENTIEL

Etude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels

Membres du Jury

DE LAMBALLERIE ANTON Marie, Professeur, ENITIAA, Nantes,
ROCK Edmond, Directeur de Recherche, INRA-Université de Clermont-Ferrand,

Rapporteur
Rapporteur

GHOUL Mohamed, Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy,
MARTIN Ambroise, Professeur, Faculté de médecine de Lyon,
MEJEAN Luc, Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy,
VERDELLET Pierre, Consultant sénior en Recherche et Développement, Paris,

Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires – 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy
Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités de Produits Animaux

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu Monsieur le Professeur **Luc Méjean**, pour m'avoir confié ce sujet passionnant et avoir assuré la direction scientifique de cette thèse. Sans qui, non seulement cette thèse n'aurait jamais eu lieu, mais qui a insufflé à ce travail tout son intérêt tant dans sa réalisation que dans son environnement. Merci pour cette formation, pour cet enthousiasme que vous m'avez transmis, merci de m'avoir donné les clés pour conduire ce travail à son terme, merci d'avoir été le « maître à penser ». Par nos discussions animées et vos qualités humaines, vous m'avez permis de mieux appréhender l'intérêt d'une recherche appliquée. Je vous remercie très sincèrement pour votre soutien et surtout la confiance dont vous avez fait preuve à mon égard.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur **Mohamed Ghoul** du laboratoire Biocatalyse et Bioprocédés de l'ENSAIA qui m'a accueillie pour la partie expérimentale de ce travail. Par vos qualités scientifiques, vous m'avez guidée à travers la complexité du domaine des polyphénols. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour l'intensité de son partage et de son soutien.

Je remercie tout particulièrement, Madame **Sylvie Breton**, pour ses qualités humaines, et son enthousiasme. Elle m'a permis de m'intégrer dans l'équipe Recherche et Développement de l'entreprise. Merci d'avoir été un exemple en tant que manager !

Je tiens également à remercier la société **Marie**, qui a financé ce projet de thèse. J'exprime mes sincères remerciements à l'ensemble de l'équipe Recherche et Développement, et notamment merci à Mesdames et Monsieur **Pierre Verdellet, Marie-Dominique Quignon et Marie –Pierre Kaffel**. Merci d'avoir animé l'ensemble des réunions et d'avoir donné cet intérêt à cette thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'examiner ce travail, notamment

Monsieur Rock, Directeur de Recherche de l'INRA de Clermont-Ferrand, pour m'avoir très largement conseillé dans la rédaction de ce mémoire,

Madame De Lamballerie Anton, Maître de conférences Hdr à l'ENITIA de Nantes,

Monsieur Ghoul, Professeur à l'ENSAIA de Nancy,

Monsieur Martin, Professeur à la Faculté de médecine de Lyon,

Monsieur Méjean, Professeur à l'ENSAIA de Nancy,

Monsieur Verdellet, Consultant sénior en Recherche et Développement à Paris.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES	15
 AVANT-PROPOS	 17
 PARTIE I : LA FONCTIONNALITE ALIMENTAIRE	 20
 CHAPITRE 1 : DEFINITION DE LA FONCTIONNALITE ALIMENTAIRE	 22
1 Définition des propriétés de l'aliment	22
2 La fonctionnalité : un concept qui s'est formalisé durant le siècle passé	23
3 Début de l'ère de la fonctionnalité	24
4 La fonctionnalité : un concept et un outil	25
 CHAPITRE 2 : RECHERCHE DE LA FONCTIONNALITE D'UN ALIMENT	 27
1 Du nutriment à l'aliment	27
2 Fonctionnalité positive	30
3 Fonctionnalité négative	32
4 Multifonctionnalité	35
 CHAPITRE 3 : FONCTIONS CIBLES	 36
1 Les fonctions gastro-intestinales	36
2 Les systèmes redox et antioxydants	37
3 Le métabolisme des macronutriments	37
4 Le système osseux	38
5 La nutrition du fœtus et son développement	38
6 Fonction comportementale, humeur et performances cognitives et physiques	38
 CHAPITRE 4 : FACTEURS DE MODULATION DE LA FONCTIONNALITE	 39
1 Modes de conservation et traitements alimentaires modulant la fonctionnalité	39
2 Influence des processus physiques sur la fonctionnalité	40
3 Influence des procédés chimiques sur la fonctionnalité	43
4 Influence des procédés biologiques sur la fonctionnalité	43
5 Intérêt de leur utilisation en nutrition humaine	45

CHAPITRE 5 : FACTEURS DE MODULATION DE LA FONCTIONNALITE DUS A LA FORMULATION ALIMENTAIRE	45
1 Principe des interactions entre ingrédients constitutifs de l'aliment	46
2 Mécanismes de modulation de la fonctionnalité entre ingrédients	46
2.1 Diminution de la biodisponibilité	47
2.2 Régulation de la biodisponibilité	48
2.3 Augmentation de la biodisponibilité	49
CHAPITRE 6 : FACTEURS PROPRES A L'INDIVIDU MODULANT LA FONCTIONNALITE	49
CHAPITRE 7 : LE THEOREME DE BLOCK	51
1 Problématique	51
2 Intérêt du théorème de Block en nutrition humaine	52
3 Théorème de Block et stratégie nutritionnelle	52
CHAPITRE 8 : LA FONCTIONNALITE, DE SON INTERET A SON UTILISATION	53
1 Définir les caractéristiques d'un aliment	54
2 Mise en évidence l'effet physiologique d'un aliment	55
3 Les critères d'une bonne étude clinique visant à démontrer une propriété fonctionnelle d'un aliment.	56
4 Evaluation du bénéfice allégué lorsqu'il ne peut être mesuré directement dans les études cliniques ?	57
CONCLUSION	58
PARTIE 2 : LA FONCTION ANTIOXYDANTE	59
CHAPITRE 1 : LE STRESS OXYDANT	61
1 Définition des espèces réactives de l'oxygène (ERO)	61
2 Origines des espèces réactives de l'oxygène	62
2.1 Paradoxe de l'O ₂	62
2.2 Production endogène des radicaux libres	63
2.3 Formation de radicaux libres par voie exogène	65
3 Dommages induits par les ERO	66
3.1 Modification de l'ADN	67
3.2 Modifications des protéines	68
3.3 Modification des lipides	69
4 Maladies humaines liées à un stress oxydant	69
CHAPITRE 2 : MOYENS DE DEFENSES CONTRE LES RADICAUX LIBRES : SYSTEMES ANTIOXYDANTS	72

1 Les mécanismes naturels de protection in vivo	72
1.1 Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes	72
1.2 Antioxydants non –enzymatique endogènes	74
1.3 Antioxydants non –enzymatique exogènes	74
1.4 Oligoéléments : antioxydants alimentaires non piègeurs de radicaux directs	75
2 Antioxydants alimentaires : Piégeurs de radicaux	76
2.1 Mécanismes d'action	76
2.2 Cas des Vitamines	78
2.3 Interrelation vitaminique	83
3 Antioxydants alimentaires non essentiels : piègeurs de radicaux	84
3.1 Ensemble des microconstituants bioactifs	84
3.2 Principales structures phénoliques	86
3.3 Cas des flavonoïdes	87
3.4 Propriétés des polyphénols	89
 CHAPITRE 3 : SOURCE ET CONSOMMATION DES DIFFERENTS ANTIOXYDANTS ALIMENTAIRES NON ESSENTIELS	 91
1 Remarques sur les teneurs publiées	91
2 Source et consommation journalière des polyphénols	92
3 Exemple de polyphénols spécifiques	94
4 Caroténoïdes	96
5 Glucosinolates	96
6 Phytostérols	97
 CHAPITRE 4 : VARIABILITES DES QUALITES NUTRITIONNELLES DES ANTIOXYDANTS ALIMENTAIRES	 98
1 Principaux facteurs de variation	98
2 Sources de variation biologique d'ordre physiologique et génétique	99
2.1 Variations physiologiques	99
2.2 Variations génétiques	100
3 Sources de variations biologiques d'ordre agronomique et environnemental	100
3.1 Effet des facteurs de l'environnement	101
3.2 Effet des techniques et modes de culture au sens large	101
4 Variations dans la conservation et la transformation	102
4.1 La conservation du végétal vivant	103
4.2 Impact du traitement thermique	104
4.3 La conservation par le froid	106
 CHAPITRE 5 : LE POUVOIR ANTIOXYDANT DES PHYTONUTRIMENTS	 108
1 Relation entre structure moléculaire et pouvoir antioxydant : cas des polyphénols	108
2 Comparaison des pouvoirs antioxydants	111
3 Phénomènes de synergie entre antioxydants	112
4 Au-delà du pouvoir antiradicalaire	112
5 Interaction moléculaire pouvant jouer sur le pouvoir antioxydant	114
6 Antioxydants et pro-oxydant	115
7 Comparaison des pouvoirs antioxydants d'aliments	116
 CHAPITRE 6 : ASPECTS TOXICOLOGIQUES	 117

1 Antioxydants et radicaux libres : des composés “ambigus”	117
2 Les risques des antioxydants à fortes doses	118
3 Modulation de la défense antioxydante par les aliments	119
 PARTIE 3 : ETUDE DE LA FONCTIONNALITE ANTIOXYDANTE DE PLATS INDUSTRIELS	 123
 CHAPITRE 1 : PARAMETRES AFFECTANT L’EXTRACTION DES COMPOSES ANTIOXYDANTS	 125
1 Paramètres affectant l’extraction	125
1.1 Influence de la matrice sur l’extraction	126
1.2 Effet du solvant	127
2 Autres paramètres jouant sur l’efficacité de l’extraction	128
2.1 Agitation	129
2.2 Taille des particules	129
2.3 Effet Temps - Température	129
 CHAPITRE 2 : METHODES PERMETTANT LA MESURE DU POUVOIR ANTI-RADICALAIRE	 130
1 Choix de la méthode de mesure du pouvoir anti radicalaire	131
1.1 Différence entre transfert d'atome d'hydrogène et transfert d'électron unique	131
1.2 Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'hydrogène	132
1.2.1 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	132
1.2.2 TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)	133
1.3 Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'électron	134
1.3.1 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	134
1.4 Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'électron ou d'hydrogène	134
1.4.1 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity) utilisant ABTS ^{•+}	135
1.4.2 TEAC utilisant le radical DPPH [•]	135
2 Pourquoi a-t-on besoin d'une méthode standardisée de calcul d'activité antioxydante totale?	136
2.1 Standardisation d'une méthode de mesure de la capacité antioxydante totale	137
2.2 Choix de la méthode du dosage des phénols totaux	137
 CHAPITRE 3 : AMELIORATION DE CERTAINS PARAMETRES D’EXTRACTION ET VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE	 138
 MATERIEL ET METHODE	 138
1 Sources et description des échantillons	138
2 Préparations des échantillons	139
3 Mode opératoire du dosage de pouvoir antiradicalaire	140
3.1 Principe de la méthode TEAC	140
3.2 Dosage et interprétation	140
4 Dosage des phénols totaux	143
4.1 Principe	143
4.2 Dosage et interprétation	143

RESULTATS	144
1 Sélection de solvants	144
2. Plan d'expérience : amélioration de certains paramètres d'extraction	145
2.1 Matrice des résultats du plan d'expérience	146
2.2 Matrice des coefficients et des interférences entre les différents paramètres	147
2.3 Courbes d'iso-réponse	148
3 Validation du protocole de dosage	149
3.1 Effet Méthanol/Ethanol	150
3.2 Test de l'effet volume solvant	152
3.3 Comparaison avec des aliments simples de la littérature	153
3.4 Répétabilité intra-échantillon	154
3.5 Répétabilité inter-échantillons	155
DISCUSSION	157
1 Sur la préparation des échantillons	157
2 Extraction au solvant	158
2.1 Interférences possibles	158
2.2 Choix de l'éthanol	159
2.3 Optimisation de l'extraction	159
CHAPITRE 4 : ETUDE COMPARATIVE DE LA CAPACITE ANTIRADICALAIRE D'ALIMENTS SIMPLES ET COMPLEXES, EFFET DE LA FORMULATION ET DU TRAITEMENT INDUSTRIEL	160
MATERIEL ET METHODE COMPLEMENTAIRE	160
1 Sources et description des échantillons	160
1.1 Aliments dits « simples » ou « potentiels ingrédients »	160
1.2 Plats préparés	161
2 Mode opératoire dosage	162
RESULTATS	162
1. Aliments dits « simples » ou potentiels ingrédients	162
2 Corrélation entre la TEAC et la TPC d'ingrédients	165
3 Effet de la combinaison de différents aliments sur la TEAC et la TPC	166
4 Dosages de plats complexes	170
5 Corrélation entre capacité antioxydante et phenols totaux des aliments complexes	174
6 Effet Procédés	175
6.1 Effet du stockage	175
6.2 Effet réchauffage	178
CHAPITRE 5 : INDEX DE CAPACITE ANTIOXYDANTE ET CONSOMMATION	180
MATERIEL ET METHODE COMPLEMENTAIRE	181

1. Description des échantillons	181
2. Préparation des échantillons	181
RESULTATS	181
1 Résultats selon les méthodes DPPH, ABTS et ORAC	181
2 Corrélation entre les différentes méthodes	182
3 Index global de capacité antiradicalaire	184
4 Index de consommation	186
4 Estimation des consommations	187
4.1 Comparaison des consommations selon la méthode ABTS	187
4.2 Différents objectifs de consommation	190
CHAPITRE 6 : BIODISPONIBILITE DES COMPOSANTS ANTIOXYDANTS ET LEUR ACTIVITE	193
PARTIE 4 : FONCTIONNALITE ET COMMUNICATION AU CONSOMMATEUR	195
CHAPITRE 1 : FONCTIONNALITE, CONSOMMATEUR ET INDUSTRIEL	197
1 Fonctionnalité et équilibre alimentaire	197
2 Rôle de l'industrie agroalimentaire	198
CHAPITRE 2 : REGLEMENTATION	199
1 Situation des allégations nutritionnelles et de santé avant 2007	199
2 Nouvelles mesures	200
2.1 Plan d'action de lutte contre l'obésité	200
2.2 Proposition de règlement sur les allégations nutritionnelles et de santé du 16 juillet 2003	200
2.3 Règlement de décembre 2006	201
CHAPITRE 3 : CRITERES POUR ALLEGUER	203
1 Etablissement de la base scientifique légale des allégations santé	203
2 Les différents types d'allégations concernées par le règlement	203
3 Profils nutritionnels et allégations : les « bons et les mauvais régimes »	204
4 Quelles démonstrations scientifiques ?	206
5 Le PASSCLAIM, un outil de validation des allégations et d'information du consommateur	207
6 Problématique de la valorisation des antioxydants	209
CONCLUSION	212
REFERENCES	216

PUBLICATIONS ET COMMUNICATION	229
ANNEXE	231
RESUME	236

LISTE DES ABREVIATIONS

- $^1\text{O}_2$: Oxygène singulet
- AAPH : 2,2 azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride
- ABTS: Sel d'ammonium de l'acide 2, 2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AGPI : Acide gras poly insaturés
- AJR: Apports Journaliers Recommandés
- AOC: Antioxidant capacity (activité antioxydante)
- AUC: Air under the curb (Aire sous la courbe)
- BDE : Energie de dissociation des liaisons (BDE) et le
- $\text{ClO}^\cdot$: Hypochlorite
- ERO : Espèces Réactives de l'oxygène
- FADH_2 : Flavin adenine dinucleotide (FAD)
- FMNH_2 : reduced form of flavin mononucleotide (flavine mononucléotide réduite)
- FRAP: Ferric reducing antioxidant power
- GAE : Gallic acid equivalent (Equivalent acide gallique)
- H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
- HAT : Transfert d'hydrogène
- $\text{HOO}^\cdot$: Radical Hydroperoxyle
- HPLC: High performance liquid chromatography
- IP : Potentiel d'ionisation
- M_2B_2 : 2-méthyl-2-butanol
- NADH-déshydrogénase : Quinone oxidoreductase
- $\text{NO}^\cdot$: Radical Oxyde nitrique
- $\text{O}_2^{\cdot-}$: Anion superoxyde
- $\text{OH}^\cdot$: Radical hydroxyle
- $\text{ONOO}^\cdot$: Peroxynitrite
- ORAC: Oxygen radical absorbance capacity
- $\text{ROO}^\cdot$: Radical peroxyde
- ROOH : Hydroperoxyde
- ROS : Reactive oxygen species (Espèces réactives de l'oxygène)

SET : Transfert d'électron

SOD: Super Oxyde Dismutase

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity (Capacité antioxydante en equivalent trolox)

TPC : Total Phenol Content (Composés phénoliques totaux)

TRAP: Total radical trapping antioxidant potential (Potentiel antioxydant en tant que piègeur de radicale)

Trolox : Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés fonctionnelles des aliments les plus couramment observées et étudiées d'après Hasler (2002).	29
Tableau 2 : Exemples de composants antinutritifs dans les végétaux.	34
Tableau 3 : Principaux radicaux libres oxygénés et autres formes actives.	62
Tableau 4 : Relations entre les maladies et le stress oxydant (Favier, 2006).	71
Tableau 5 : Types de réactions faisant intervenir les antioxydants.	77
Tableau 6 : Apports nutritionnels conseillés en vitamine C pour la population Française (Martin et al., 2001).	79
Tableau 7 : Sources alimentaires de vitamine C (Feinberg <i>et al.</i> , 1995).	80
Tableau 8 : Apports nutritionnels conseillés en vitamine E pour la population Française (Martin et al., 2001).	82
Tableau 9 : Sources alimentaires de vitamine E (Feinberg <i>et al.</i> , 1995).	82
Tableau 10 : Principales classes de composés phénoliques (Macheix <i>et al.</i> , 2006).	87
Tableau 11 : Teneurs en polyphénols totaux de fruits et légumes et leur rang dans les apports de la population française rangé par ordre décroissant des concentrations (Brat <i>et al.</i> , 2006).	93
Tableau 12 : Exemples de teneurs en flavonoïdes (mg/kg ou mg/l) de divers aliments ou boissons (King & Young, 1999).	94
Tableau 13 : Teneurs (en mg) de divers flavonoïdes dans des doses usuelles d'aliments et de boisson (Scalbert & Williamson, 2000).	95
Tableau 14 : Quelques exemples de teneurs en glucosinolates (en mmol / kg ms), d'après Mithen (2000).	97
Tableau 15 : Apport journalier en fruits et légumes aux USA d'après (Cao <i>et al.</i> , 1998a)	120
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des tests de solvants effectués.	145
Tableau 17 : Matrice des résultats du plan d'expérience.	147
Tableau 18 : Matrices des coefficients et des interférences entre différents paramètres d'extraction.	147
Tableau 19 : Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature.	153
Tableau 20 : Pouvoir antioxydant et Phénols Totaux de différents types d'aliments classé par ordre décroissant de leur pouvoir anti-radicalaire.	163

Tableau 21 : TEAC et Phénols totaux de 26 plats préparés.	171
Tableau 22 : Capacité antioxydante (en $\mu\text{mol trolox/g}$) de 7 aliments selon les 3 méthodes DPPH, ABTS et ORAC.	182
Tableau 23 : Index global d'activité antiradicalaire établi à partir de trois types de dosage	185
Tableau 24 : Index global de capacité antioxydante établi à partir de la teneur en phénol totaux et de la capacité antiradicalaire.	186
Tableau 25 : Répartition de l'activité antiradicalaire et de la teneur en phénols totaux de chaque aliments dosés du régime méditerranéen (Saura-Calixto & Goni, 2006).	188
Tableau 26 : Apport (en $\mu\text{mol de Trolox}$) par portion de différents plats dans 3 méthodes de dosages.	191

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Addition de HO• sur la guanine.	67
Figure 2 : Les différentes formes chimiques dérivant de l'acide L-ascorbique.	79
Figure 3 : Structure de α -tocophérol.	81
Figure 4 : Structure du β -carotène et de la lutéine.	83
Figure 5 : Classification de l'ensemble des microconstituants bioactifs antioxydants.	85
Figure 6 : Structure du phénol le plus simple des composés phénoliques.	86
Figure 7 : Structure de base d'un flavonoïde.	88
Figure 8 : Exemple de structures de quelques composés phénoliques.	88
Figure 9 : Différents facteurs de variabilités de la teneur en microconstituants.	98
Figure 10 : Structure de base des flavonoïdes et structure de la quercétine.	108
Figure 11 : Structures moléculaires et pouvoirs antioxydant de deux flavonols.	109
Figure 12 : Désactivation des radicaux libres lipidiques R• par les groupes phénols des antioxydants.	115
Figure 13 : Schématisation de différentes étapes d'extraction d'un composé.	126
Figure 14: Allure générale des courbes d'extraction (Perrut, 1999).	128
Figure 15 : Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H ⁺	141
Figure 16 : Exemple de courbe d'étalonnage du Trolox.	142
Figure 17 : Courbes d'iso réponse du plan d'expériences.	149
Figure 18 : Activité antiradicalaire en fonction du solvant d'extraction utilisé (méthanol ou éthanol).	151
Figure 19 : Quantité de phénols totaux en fonction du solvant d'extraction utilisé (méthanol ou éthanol).	151
Figure 20 : TEAC en fonction du volume de solvant utilisé.	152
Figure 21 : Phénols totaux en fonction du volume de solvant utilisé.	152
Figure 22 : Test de la répétabilité intra-échantillon sur la valeur TEAC (n=5).	154
Figure 23 : Test de la répétabilité intra-échantillon sur la teneur en phénols totaux (n=5).	155
Figure 24 : Test de la répétabilité inter-échantillons sur la valeur TEAC (n=5).	156
Figure 25 : Test de la répétabilité inter-échantillons sur la teneur en phénols totaux (n=5).	156
Figure 26 : Comparaison de l'apport de chaque portion d'aliment (en équivalent μ mol de Trolox).	164
Figure 27 : Capacité antiradicalaire totale en fonction du taux de phénols totaux sur différents aliments dits « simples ».	165

Figure 28 : Identification de la part (en μmol de trolox) de chaque composé dans l'assemblage Tarte-Persil.	167
Figure 29 : Identification de la part (en mg d'Acide Gallique) de chaque composé dans l'assemblage Tarte-Persil.	167
Figure 30 : Comparaison des activités antioxydantes et de la teneur en phénols totaux entre les valeurs estimées et les valeurs réelles de 2 types de Mix alimentaires.	168
Figure 31 : Corrélation entre la TEAC et la TPC de plats complexes.	175
Figure 32 : Evolution de la TEAC (μmol trolox/g) en fonction du temps de conservation d'une préparation culinaire.	177
Figure 33 : Evolution des phénols totaux (mg d'équivalent acide gallique/100g) en fonction du temps de conservation d'une préparation culinaire.	177
Figure 34 : Diagramme des mesures de TEAC des 5 plats cuisinés avant et après réchauffage.	179
Figure 35 : Diagramme des mesures de TPC des 5 plats cuisinés avant et après réchauffage.	179
Figure 36 : Corrélation entre les méthodes DPPH et ABTS établie à partir de 7 aliments.	183
Figure 37 : Corrélation entre les méthodes DPPH et ORAC établie à partir de 7 aliment.	183
Figure 38 : Corrélation entre les méthodes ABTS et ORAC établie à partir de 7 aliments.	184
Figure 39 : Echelle permettant de comparer le pouvoir antiradicalaire (en μmol de trolox) de 5 plats complexes à des groupes d'aliments couramment consommés dans le régime méditerranéen espagnol selon la publication de Saura –Calisto et Goni (2006).	189
Figure 40 : Echelle permettant de comparer la teneur en phénols totaux de 5 plats complexes à des groupes d'aliments couramment consommés dans le régime méditerranéen espagnol selon la publication de Saura –Calisto et Goni (2006).	189

AVANT-PROPOS

Depuis le temps où les premiers hommes vivaient du fruit de leur cueillette et de la chasse, consommant sur place baies, racines et viande crue, la nutrition a bien changé ! L'aliment dont le rôle premier était la survivance, s'est peu à peu vu attribuer une fonction de plaisir et de satisfaction des sens olfactifs, gustatifs et visuels, ainsi qu'un rôle social et d'échanges.

Mais au-delà de ces caractéristiques, une relation étroite liant l'aliment à la santé et au bien être est également apparue ces cinquantes dernières années. Le concept n'est pourtant pas nouveau, puisque dès l'antiquité, Hippocrate affirmait « Que l'alimentation soit ta première médecine ! ». Soutenue par la croissance des cas de pathologies chroniques, dont l'incidence sur la qualité de vie, la mortalité et les frais de santé publique sont importants, la notion de fonctionnalité alimentaire est de plus en plus prégnante.

Pour faire progresser les connaissances en science nutritionnelle et asseoir leur utilisation en Nutrition humaine, les recherches se sont donc attachées à identifier les composants ou ingrédients actifs sur certaines fonctions cibles de l'organisme et à essayer de définir les apports optimaux à l'expression de cette fonctionnalité. Le soutien actuel accordé à la promotion de produits alimentaires comme les fruits et les légumes ou les céréales complètes dans la prévention des maladies et les dernières recherches sur les antioxydants et les substances phytochimiques spécifiques ont donné un véritable élan au domaine de la fonctionnalité alimentaire.

Les propriétés fonctionnelles sont désormais employées au sein de l'industrie agro-alimentaire à l'élaboration de nouvelles denrées porteuses d'allégations santé et au niveau de la politique nutritionnelle nationale à la mise en place de recommandations alimentaires.

Si les études ont permis d'identifier certains constituants alimentaires physiologiquement actifs sur l'organisme et les mécanismes d'action potentiellement impliqués, elles se sont néanmoins beaucoup moins intéressées aux facteurs de variation de l'expression de cette fonctionnalité au sein de l'aliment (associations alimentaires, procédés de préparation et transformation alimentaire) et entre l'aliment et l'individu.

Du point de vue strictement moléculaire, les propriétés organoleptiques ou physico-chimiques ne sont pas immuables. La fonctionnalité d'un aliment subit les mêmes restrictions. Les constituants alimentaires sont soumis, comme toute molécule, à des interactions avec les autres nutriments et composants de la matrice alimentaire, mais aussi aux traitements

physiques, chimiques et biologiques, réalisés lors des transformations industrielles, aux conditions de conservation et de préparation culinaire. Ce sont donc autant d'éléments pouvant moduler, modifier, annuler ou potentialiser la fonctionnalité initiale d'un constituant.

Pour tenter de répondre au mieux à cette problématique, nous nous attacherons tout d'abord, dans une première partie, à expliciter le terme de fonctionnalité alimentaire.

Après avoir posé les quelques généralités et fondements de la fonctionnalité (Partie 1), nous étudierons dans une seconde partie une fonctionnalité particulière : la fonctionnalité antioxydante (Partie 2). En effet, si les mécanismes précis de l'effet protecteur des fruits et légumes sont loin d'être encore élucidés, il n'en demeure pas moins qu'une hypothèse intéressante est liée à la présence d'antioxydants en grande quantité dans ces aliments.

Puis nous verrons dans quelle mesure cette fonctionnalité antioxydante peut être étudiée à l'échelle industrielle (Partie 3), et enfin si elle peut être communiquée au consommateur (Partie 4).

Dans le cadre de la connaissance des propriétés de l'aliment, l'étude de la valeur nutritionnelle des plats industriels utilisés a été étudiée au préalable via les tables de composition des aliments (création et suivi d'une base de données des valeurs nutritionnelles) mais également via le système Gerbaulet (système permettant une visualisation simple en groupe d'aliments, permettant une meilleure éducation nutritionnelle du consommateur). L'explication de cette exploration de la valeur nutritionnelle ne sera pas incluse dans ce mémoire.

**PARTIE I : LA FONCTIONNALITE
ALIMENTAIRE**

Depuis toujours, l'alimentation est considérée par l'homme comme assurant la couverture des besoins physiologiques, permettant la croissance, le développement et le maintien en vie des tissus et de l'organisme (c'est la valeur nutritionnelle de l'aliment). A cet aspect s'ajoute le sentiment de satisfaction et de bien-être qu'elle procure au consommateur, constituant un élément tout aussi fondamental à l'équilibre physiologique et psychique de chaque individu (c'est la valeur sensorielle de l'aliment). Toutefois, les connaissances scientifiques récentes montrent qu'au-delà de la couverture des besoins nutritionnels, l'alimentation peut également moduler certaines fonctions de l'organisme et ainsi jouer un rôle bénéfique ou délétère sur la santé humaine (c'est la valeur fonctionnelle de l'aliment).

Le concept de nutrition s'enrichit d'une approche où l'alimentation n'est plus seulement un élément de survie (la satisfaction alimentaire et la prévention des effets néfastes dus aux carences ou aux excès alimentaires) : elle vise à améliorer la santé, le bien-être, et à réduire le risque de développer diverses pathologies. Ces nouvelles données ouvrent des horizons potentiellement intéressants dans le contexte actuel, marqué par l'augmentation des coûts de santé et le désir toujours plus présent des consommateurs à améliorer la qualité de leur vie.

Chapitre 1 : Définition de la fonctionnalité alimentaire

Les premiers hommes, nos ancêtres, tiraient du fruit de leur cueillette et de leur chasse la couverture de leurs besoins physiologiques, leur permettant un maintien en « santé » ; situation qui était fréquemment interrompue par des événements dévastateurs de type famine ou conflits. Le XX^{ème} siècle nous a progressivement légué une situation nouvelle : dans les pays économiquement développés, et en l'absence de conflit majeur, la disponibilité alimentaire est à présent accessible à chacun. Le développement de la production et des échanges et celui de l'industrie agro alimentaire et des circuits de distribution, ont ajouté à cette disponibilité la diversité alimentaire : l'homme du XX^{ème} siècle, héritier génétique des « résistants à la famine » (Junien, 2002) , choisit son alimentation avant de la consommer, et ce, dans une situation sociétale toute nouvelle, en particulier vis-à-vis des conditions de vie (diminution de l'activité physique et baisse des dépenses de thermogénèse) et de l'état de santé (augmentation de l'espérance de vie et modification des causes de décès).

Pour décrire les conditions de ce choix, interrogeons nous sur le rôle de l'aliment...

1 Définition des propriétés de l'aliment

L'aliment doit couvrir les besoins physiologiques : Jean TREMOLIERE avait défini sous deux phrases ce rôle de l'aliment : « L'homme a besoin d'énergie pour croître, se réparer donc s'entretenir, se reproduire, se relier à l'extérieur, maintenir sa température stable ». « Il ne suffit pas que la machine humaine reçoive (...) l'énergie nécessaire à son fonctionnement, il faut que les tissus se construisent puis se renouvellent et que les pièces usagées soient changées ». Cette capacité à apporter des carburants et des substances indispensables confère à l'aliment ses **propriétés nutritionnelles**. Pour demeurer en bonne santé, notre corps a besoin de 40 nutriments différents. Ces propriétés, décrites il y a un siècle, sont aujourd'hui résumées dans les tables de compositions d'aliments.

A partir du moment où la disponibilité alimentaire est la règle, le choix de l'aliment se fait non seulement sur la base de ses propriétés nutritionnelles mais aussi celles de ses **propriétés sensorielles**. A l'aliment, on attribue une fonction « plaisir » liée, entre autres, à la satisfaction des sens olfactifs : il doit être beau à la vue, bon au goût, avoir une odeur et une

palatabilité caractéristiques et estimées du consommateur ; et même être agréable à l'oreille. (L'ouïe n'est-elle pas largement utilisée dans les messages publicitaires visant à promouvoir tel produit alimentaire ? ...)

Au-delà de ces caractéristiques, une relation étroite, liant la prise alimentaire au maintien de l'état de bonne santé, est également apparue ces cinquantes dernières années. Le concept n'est pourtant pas nouveau, puisque dès l'antiquité, Hippocrate affirmait « Que l'alimentation soit ta première médecine ! ». La notion de **propriété fonctionnelle** de l'aliment est un concept large dont la définition est liée à l'ensemble des fonctions physiologiques de l'organisme humain : de façon restrictive, ces propriétés fonctionnelles sont, le plus souvent, associées aux fonctions détériorées dans les pathologies à forte incidence sur la qualité de vie, la mortalité et les frais de santé publique. Leur intérêt les font rechercher dans le cadre de la prévention des pathologies « dominantes », aujourd'hui les maladies cardio-vasculaires ou tumorales, demain, les troubles de la conduction nerveuse.

Ces 3 propriétés font parties intégrantes de l'aliment, et ce tout au cours de son évolution : de la cueillette à notre table. Elles peuvent être définies dans tous les états de l'aliment, qu'il soit cru ou cuit, brut ou transformé, seul ou associé.

2 La fonctionnalité : un concept qui s'est formalisé durant le siècle passé

Historiquement d'abord...

La notion de fonctionnalité alimentaire est très ancienne. Les premiers hommes concevaient certes la nourriture en tant que source indispensable à la couverture des besoins (activité musculaire, résistance au froid), mais en attendaient également des effets supplémentaires. C'est ainsi qu'en consommant certaines proies ou organes particuliers, ils espéraient en acquérir les caractéristiques ou performances. De même, la plupart des plantes consommées étaient choisies pour leurs propriétés spécifiques sur la santé. Les rites et pratiques alimentaires des premiers hommes s'appuyaient sur les observations de qualité de quelques érudits (Demigne. C, 2003).

L'émergence des grandes civilisations, la maîtrise de l'agriculture et la domestication d'espèces animales ont peu à peu altéré la perception de fonctionnalité alimentaire dans la

mesure où l'homme commençait à maîtriser ses sources de nourriture. Cette doctrine selon laquelle les aliments auraient une fonction particulière sur la santé, tombe alors en désuétude par manque de preuve : n'a-t-il pas fallu attendre de XVIII^{ème} siècle pour constater que le citron protégeait le marin contre le scorbut et le XX^{ème} pour en comprendre le mécanisme ?

Le développement de la science nutritionnelle sous l'impulsion de quelques anciens parmi lesquels on peut citer ATWATER (Maynard L.A, 1962), a favorisé les notions de nutriments indispensables et d'équilibre nutritionnel, oubliant quelque peu que l'aliment ne se contente pas d'apporter des lipides, des glucides et des protides, des vitamines, des minéraux et des oligo-éléments. Certes, l'étude de la couverture de ces besoins « primaires » a constitué une avancée en terme de nutrition de santé publique mais elle ne résume pas à elle seule l'intégralité du rôle de l'alimentation de l'homme pour l'homme.

Puis géographiquement...

Les pays asiatiques ont de longues dates développées une tradition alimentaire très riche et complexe, dans laquelle quelques aliments étaient consommés pour leur action sur des fonctions cibles déterminées de l'organisme. La plupart de ces pratiques alimentaires reposaient sur des observations pertinentes, associées à d'autres beaucoup plus proches de la magie ou du culte religieux. Pour pallier l'augmentation croissante des coûts de santé au Japon, l'accroissement de l'espérance de vie et le vieillissement de la population, le gouvernement japonais initia et finança dans les années 1980 de vastes programmes de recherche en nutrition préventive (Roberfroid, 2000). Ceux-ci ont eu pour but de sélectionner et définir les aliments reconnus comme bénéfiques à la préservation et au maintien de la santé, en étudiant l'impact des ingrédients qui les composent sur des fonctions de l'organisme.

3 Début de l'ère de la fonctionnalité

Les modifications démographiques et socio-économiques observées à la fin du XX^{ème} siècle traduisent un besoin plus élevé en produits alimentaires bénéfiques pour la santé. L'augmentation de l'espérance de vie menant à une augmentation du nombre de personnes âgées, le désir d'améliorer la qualité de vie, ainsi que l'augmentation constante des dépenses de santé, ont stimulé les gouvernements, les chercheurs, les professionnels de santé et l'industrie alimentaire à réévaluer leur méthode de penser pour mieux gérer ces changements. La nutrition doit s'adapter à ces nouveaux défis.

En voie de conséquence, à l'aube du XXIème siècle, tout en poursuivant les recommandations édictées au XXème siècle en vue de favoriser une alimentation équilibrée, se profile le concept de « nutrition optimisée ». Une telle nutrition a pour but de maximaliser les fonctions physiologiques de façon à garantir un état de bien-être et de santé optimum tout en réduisant le risque de contracter une pathologie, et cela tout au long de la vie (Roberfroid, 2002b).

Ceci élargit le conception d' « alimentation équilibrée » qui ne consistait qu'en la consommation d'un *mélange approprié d'aliments susceptibles de fournir les quantités minimales requises des différents nutriments et des quelques autres composants alimentaires nécessaires pour soutenir la croissance et le maintien de poids, tout en prévenant le développement des maladies de déficience et en réduisant le risque de développer les maladies associées aux excès alimentaires néfastes* (Roberfroid, 2002b).

L'intérêt porté par la population sur la fonctionnalité alimentaire s'inscrit dans une recherche de prévention à l'égard des maladies, voire de thérapeutique, par des méthodes dites naturelles. Il ne faut pas confondre les concepts de fonctionnalité alimentaire d'une part, d'aliments fonctionnels d'autre part. L'aliment fonctionnel tire d'une fonctionnalité une spécificité exploitée physiologiquement (quelquefois), commercialement (souvent). L'aliment fonctionnel a acquis une fonctionnalité spécifique qui n'est pas forcément innée mais surtout acquise dans le but de sa valorisation.

4 La fonctionnalité : un concept et un outil

La fonctionnalité d'un aliment apparaît donc comme sa capacité à intervenir sur les fonctions de l'organisme, pour en moduler l'activité.

Tout aliment, mélange complexe d'ingrédients, eux-mêmes mélange de molécules variées, est susceptible d'exprimer une ou des fonctionnalités modulant la santé et l'état de bien être d'un individu. Les aliments représentent un facteur environnemental essentiel dans l'expression de la santé et du bien-être. Transformés en nutriments par le système gastro-intestinal qui sont véhiculés ensuite par le système sanguin et lymphatique vers les cellules cibles, ils peuvent potentiellement contribuer au fonctionnement de l'organisme du tissu de la

cellule. Les exemples sont nombreux et les observations témoignent de la multitude de molécules, d'ingrédients, d'aliments actifs sur l'organisme.

Les propriétés fonctionnelles de l'aliment caractérisent cette aptitude de l'aliment à modifier les processus physiologiques ; cette modification peut être positive – et on la dira alors facteur protecteur – ou négative – et la fonctionnalité sera facteur de risque.

Quatre principes fondamentaux à propos de cette fonctionnalité alimentaire :

. La fonctionnalité peut se définir vis-à-vis de tout processus physiologique. Dans l'état actuel des connaissances et des besoins, seuls quelques processus principaux sont envisagés. Les études scientifiques se sont intéressées préférentiellement aux fonctions impliquées dans les problèmes de santé publique les plus courants et représentant des sites potentiels d'apparition de pathologies chroniques. Mais cela n'est pas une règle absolue.

. La fonctionnalité est définie par un ou plusieurs principes actifs présents dans l'aliment : la recherche de ces « principes », généralement de nature moléculaire - mais nous verrons ultérieurement que ce n'est pas toujours le cas - constitue aujourd'hui un pan important de la recherche en matière de fonctionnalité.

. Un aliment peut avoir plusieurs propriétés fonctionnelles : l'origine de cette multiplicité est liée à sa composition ou aux opérations de transformation subies pour l'amener à l'état d'aliment tel que consommé (« process »).

. Enfin, nous avons nommé cela théorème de Block, « la fonctionnalité d'un aliment peut ne pas être la somme des fonctionnalités de ses ingrédients »

Aujourd'hui, considérer l'aliment dans son ensemble est obligatoire, surtout lorsque la formulation de cet aliment devient de plus en plus complexe. Nous ne consommons pas des substances actives isolées mais un ensemble d'ingrédients (« d'aliments ») ayant subi des mélanges, et des traitements technologiques. La matrice alimentaire est une entité en tant que telle, qui, du point de vue strictement moléculaire, a des propriétés organoleptiques ou physico-chimiques qui ne sont pas immuables et qui peuvent être modulées par des interactions.

Chapitre 2 : Recherche de la fonctionnalité d'un aliment

La recherche de la fonctionnalité alimentaire se développe à plusieurs niveaux : un aliment est caractérisé par la juxtaposition de plusieurs ingrédients auxquels ont été appliqués différents types de préparation : au niveau industriel et au niveau « culinaire ». L'ensemble de ces caractéristiques permettent d'énoncer, pour chaque aliment, sa formulation. La recherche d'une fonctionnalité peut puiser ses origines dans la présence d'un ou de plusieurs ingrédients réputés fonctionnellement actif, voire même dans celle d'une ou de molécule(s) présentant une fonctionnalité spécifique. Encore faut-il à tous les niveaux de la préparation vérifier le rôle du « process » dans le maintien de l'activité fonctionnelle envisagée ?

1 Du nutriment à l'aliment

L'aliment, qu'il soit simple ou complexe, n'est autre que la combinaison de différents d'ingrédients, eux-mêmes combinaison de nutriments. Certains vont présenter une fonction particulière à l'égard d'un organe cible donné, d'autres vont contribuer à apporter une valeur gustative au produit fini, des caractéristiques organoleptiques, une consistance particulière, ou encore certains peuvent être employés pour leurs propriétés énergétiques. Tous les ingrédients présents au sein de la denrée alimentaire sont donc susceptibles d'y apporter une valeur spécifique.

Cependant, comme dans toute matrice, des interactions entre les différents constituants de l'aliment peuvent venir moduler les caractéristiques fonctionnelles attendues de la denrée finale, par variation de la biodisponibilité ou des propriétés de l'un des composants alimentaires. Certains nutriments ont le pouvoir d'entrer en compétition avec d'autres, de potentialiser ou d'inhiber les effets des autres constituants présents dans le produit alimentaire. La fonctionnalité de l'aliment en résultant s'en trouve nécessairement changée par rapport à celle initialement attendue et définie par les ingrédients qui le composent.

Il est possible de suspecter puis de décrire une fonctionnalité : la recherche des composés chimiques responsables de cette fonctionnalité est riche d'enseignement. Le miel, aliment glucosé à index glycémique élevé, ne présente-t-il pas, grâce aux flavonoïdes qu'il renferme, des fonctionnalités antimicrobiennes, anticarcinogènes ou antioxydantes (Davis, 1995) ? Et l'allicine de l'ail ne confère-t-elle pas à cet ingrédient plusieurs propriétés vis-à-vis de la prévention d'atteintes cardio-vasculaires (Cho *et al.*, 2006) ?

Les observations scientifiques et nutritionnelles relatives à l'action positive des aliments sur la santé et le bien être des individus ne cessent de se multiplier, tant vis-à-vis des substances potentiellement actives que des cibles explorées. Les exemples d'aliments sont nombreux et le relevé du tableau I est loin d'être exhaustif. Le degré de mise en évidence de ce tableau est établi à partir d'ensemble de publications relatant d'effets plus ou moins prouvés à partir des différents modes d'observation : un degré de mise en évidence très important se réfère à de nombreuses études cliniques bien conçues convergeant vers les mêmes résultats (par exemple pour le soja , le nombre d'études clinique est supérieur à 40), un degré de mise en évidence faible, reflète des résultats basés sur des travaux *in vitro* ou des résultats d'études cliniques pouvant être contradictoires.

Ce tableau, nous permet d'insister sur l'importance qu'il y a à :

1. identifier correctement la source de fonctionnalité : des composés protéiques pour le soja, agent hypocholestérolémiant, les β -glucanes pour les produits céréaliers à base d'avoine complet, les proanthocyanidines pour le jus de canneberge, les omégas 3 des poissons gras (saumon, maquereau, sardine, hareng, thon), le lycopène pour la tomate et les produits alimentaires dérivés, le resveratrol contenu dans le vin rouge mais aussi dans le jus de raisin, des composés organosulfurés, l'allicine de l'ail, la lutéine de l'épinard, l'acide linoléique conjugué contenu dans les viandes d'agneau, de dinde, de bœuf voire dans le lait lorsqu'on veut envisager, sur la bases de résultats partiels un effet protecteur contre le cancer du sein.
2. s'assurer à partir de travaux cliniques et ou épidémiologiques de la réalité de l'effet protecteur constaté : les effets décrits pour les quatre premiers aliments (soja, psyllium, produits à base d'avoine complet, poissons gras (saumon, maquereau, sardine, hareng, thon) sont en terme de fonctionnalité beaucoup moins sujet à caution que la plupart des autres aliments envisagés (thé vert, agneau, dinde, bœuf, lait, produits laitiers fermentés, tomates et produits alimentaires dérivés, ail).

Tableau 1 : Propriétés fonctionnelles des aliments les plus couramment observées et étudiées d'après Hasler (2002)

ALIMENTS	CONSTITUANT BIOACTIF	BENEFICE POUR LA SANTE	MODE D'OBSERVATION	DEGRE DE MISE EN EVIDENCE	QUANTITE OU FREQUENCE D'APPORTS RECOMMANDEE
Soja	Protéine	Réduit le LDL cholestérol et le cholestérol total	Essais cliniques	très important	25 g/jour
Psyllium	Fibres solubles	Réduit le LDL cholestérol et le cholestérol total	Essais cliniques	très important	1 g/jour
Produits à base d'avoine complet	β -glucanes	Réduit le LDL cholestérol et le cholestérol total	Essais cliniques	très important	3 g/jour
Jus de canneberge	Proanthocyanidine	Réduit les infections urinaires	Essais cliniques peu nombreux	modéré	300 ml/jour
Poissons gras (saumon, maquereau, sardine, hareng, thon)	Omégas 3 (acide eicosapentaénoïque, acide docosahexaénoïque)	Réduit la triglycémie, les troubles cardiovasculaires, l'infarctus du myocarde fatal ou non	Essais cliniques, études épidémiologiques	important à très important	2 poissons gras/semaine, soit 0,5 à 1,8 g de EPA + DHA
Thé vert	Cathéchine	Réduit le risque de certains types de cancers	Etudes épidémiologiques randomisées en double aveugle	modéré	4 à 6 tasses/jour
Tomates et produits alimentaires dérivés	Lycopène	Réduit le risque de cancer de la prostate	Etudes épidémiologiques	modéré	inconnu
Produits laitiers fermentés	Probiotiques	Support de la santé du tractus gastro-intestinal	Données in vivo, in vitro et cliniques	modéré	1 à 2 billions de colonies formant plaque/jour
Ail	Composés organosulfurés	Réduit le LDL cholestérol et le cholestérol total	Essais cliniques	faible à modéré	1 gousse fraîche/jour
Epinards	Lutéine	Réduit le risque de dégénérescence maculaire liée à l'âge	Etudes épidémiologiques	faible à modéré	6 mg/jour

2 Fonctionnalité positive

Aucune définition de la fonctionnalité positive n'a encore été universellement acceptée. Cependant elle est reconnue comme génératrice de « tout bénéfice physiologique, que ce soit en terme de réduction du risque d'apparition de troubles chroniques ou d'optimisation de l'état de santé, observé après ingestion d'un aliment donné (Hasler, 2002; Sunram-Lea *et al.*, 2004; Sunram-Lea *et al.*, 2004) ». Des modifications directement visibles sur la *santé* ou le *bien-être* de l'individu peuvent en résulter et être évaluées pour en apporter la preuve scientifique et tangible.

A ce titre, cette fonctionnalité positive peut intéresser n'importe quelle fonction de l'organisme, avec pour conséquences des modifications physiologiques, biologiques ou psychologiques.

Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, les relations entre l'alimentation et la santé ont été perçues au travers des grandes maladies de carence nutritionnelle. L'évidence de cette relation reposait sur les grands tableaux cliniques qui accompagnaient les famines et les déficits alimentaires majeurs, ou les carences spécifiques qui ont émaillé l'histoire de l'humanité. Le manque de protéines était responsable des formes cliniques évidentes du Kwashiorkor ; le manque d'énergie de celles du marasme ; les carences en vitamine C du scorbut ; celles en vitamine B1, du bériberi,

Il est aujourd'hui parfaitement établi que, parmi les facteurs physiologiques, génétiques et environnementaux qui interviennent dans l'initiation, le développement et l'expression clinique des maladies aujourd'hui les plus répandues (cancers, maladies cardiovasculaires, obésité, ostéoporose,...), l'alimentation et l'état nutritionnel participent de façon essentielle à leur déterminisme. Cependant, les recherches actuelles reposent essentiellement sur l'action physiologique de certains composants alimentaires au niveau des pathologies chroniques (cancers, rhumatismes articulaires, psoriasis, déficit intellectuel, pathologies cardiovasculaires, diabète, obésité), problèmes de santé publique en constante évolution.

Certains aliments présentent le potentiel de moduler l'activité d'autres organes ou systèmes de l'organisme bien précis, mais les recherches à leur sujet sont pauvres. Ainsi, la fonctionnalité alimentaire peut s'exprimer à de nombreux niveaux : sur la fonction urinaire et rénale par l'intermédiaire des protéines, sur la qualité de l'état de la peau par rapport au vieillissement cutané grâce aux polyphénols ou encore sur le système hormonal via les

phytoestrogènes. Les exemples sont donc multiples, mais les études qui appuient l'activité potentielle de ces aliments sur la santé restent minces. La recherche sur la fonctionnalité alimentaire n'en est qu'à ses balbutiements bien que la liste des fonctionnalités reconnues soit déjà fort fournie (Sunram-Lea *et al.*, 2004) :

- Calcium et ostéoporose
- Glucose et performances cognitives.
- Fibres contenues dans les céréales, fruits ou légumes et cancer.
- Fibres contenues dans les céréales, fruits ou légumes, en particulier les fibres solubles, et ischémie cardiaque.
- Fruits, légumes et cancer
- Aliments contenant des fibres issus des produits d'avoine complet et ischémie cardiaque.
- Aliments contenant des fibres de psyllium et ischémie cardiaque.
- Protéines de soja et pathologies cardiaques d'origine ischémique.
- Stérols et Stanol esters de plantes et ischémie cardiaque
- Céréales complètes, pathologies cardiaques et cancers.

L'expression de la fonctionnalité alimentaire s'observe aussi bien pour la consommation d'aliments dits « de base » en cuisine tels que l'œuf, le lait ou les fruits, que pour des denrées plus complexes et travaillées, issues de l'industrie agro-alimentaire. Ainsi, les œufs sont connus du consommateur pour leur pouvoir hypocholestérolémiant. Toutefois, à cet effet négatif sur la santé, on leur reconnaît désormais, la vertu d'être source de nombreux composants essentiels (protéines et choline) et non essentiels (lutéine et zéaxanthine), pouvant optimiser la santé.

D'autre part, des aliments non élaborés tels que les fruits et légumes représentent également une des formes les plus simples de produits à fonctionnalité alimentaire. Les brocolis, carottes et tomates, pour n'en citer que quelques uns, sont riches en composants physiologiquement actifs sur l'organisme humain, tels que respectivement les polyphénols, les bêta-carotènes et le lycopène.

De nombreuses études actuelles s'attachent à mettre en évidence les propriétés fonctionnelles de certaines denrées issues du monde végétal, tels que l'ail, les noix et noisettes, le vin rouge, le jus de fruit, le chocolat, le thé, les tomates et carottes.

On ne peut donc pas caractériser le type d'aliment et d'ingrédient présentant une fonctionnalité pour l'organisme puisque tous présentent potentiellement cette faculté. Chaque aliment a des vertus sur l'organisme et les exemples à ce propos sont multiples ; ceux-ci possèdent des molécules qui ont des effets plus ou moins importants sur le corps, souvent observés mais rarement reconnus scientifiquement. Les vieilles recettes de nos grand-mères en témoignent : ne dit-on pas que le miel est bon pour la gorge ; il contiendrait en effet de l'acide formique, à action antiseptique et adoucissante.

3 Fonctionnalité négative

La fonctionnalité négative des aliments peut potentiellement affecter elle aussi, n'importe quelle fonction de l'organisme. Néanmoins, celles les plus fréquemment mentionnées dans les études sont

- le *système immunitaire* (avec pour conséquences des manifestations allergiques ou l'initiation et la promotion de processus cancéreux),
- le *processus inflammatoire* par perturbation du métabolisme de l'acide arachidonique (via l'acide benzoïque ou la tartrazine par exemple),
- le *système cardio-vasculaire* lors des phénomènes d'athérogénèse par excès de consommation de lipides,
- le *métabolisme hépatique* et
- le *système neurovégétatif* (par action de certaines substances tels que les sulfites ou la caféine).

Mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'expression de la fonctionnalité négative des aliments, représente un objectif essentiel à l'amélioration de l'état de santé et de bien-être via l'alimentation. Il pourrait ainsi aboutir à l'établissement de recommandations et de progrès en termes de procédés de transformation alimentaire, dont l'intérêt est certain dans le contexte actuel. En effet, les pathologies chroniques (diabète, maladies cardio-vasculaires), les allergies, mais aussi les intolérances alimentaires, sont des problèmes de santé publique à forte prévalence et en continuelle progression. L'étude de l'origine de ces phénomènes pathologiques et de l'impact des propriétés fonctionnelles négatives des aliments sur ceux-ci, constitue une étape indispensable à leur amélioration.

Si la consommation de certains aliments et des nutriments qui les composent, permet d'améliorer l'état de bien-être et la santé des individus, un excès de ceux-ci ou l'apport de certaines substances déterminées peut, en revanche, intervenir de façon néfaste sur l'organisme. Les réactions secondaires à la suite de l'ingestion de certains aliments sont nombreuses. On pourrait les diviser à l'heure actuelle en deux types distincts, l'un regroupant les *effets toxiques* liés à la consommation, l'autre, les *conséquences non toxiques*.

Les réactions *toxiques* liées à la prise alimentaire émanent soit de la toxicité même du constituant ou contaminant de la denrée consommée à dose raisonnable, soit du composant alimentaire pris en excès. Par conséquent, elles résultent directement de la fonctionnalité négative de cet élément, sans susceptibilité individuelle quelconque. Au contraire, les effets *non toxiques* sont fortement corrélés à la sensibilité de l'individu à l'égard de certains constituants alimentaires : certains aliments inoffensifs pour la majorité peuvent s'avérer non tolérés par d'autres. Le facteur génétique intervient considérablement dans ce cas (Ortolani & Vighi, 1995).

Par ailleurs, la notion de dose active n'a rien à voir avec celle de dose toxique : l'exemple de l'action de certains polluants administrés à très faibles doses ne pose-t-il pas un problème à prendre en compte ?

Un très grand nombre de substances à potentiel toxique sont présentes dans l'alimentation humaine. Néanmoins, leur faible prévalence sur les réactions secondaires liées à la prise alimentaire est mal documentée. Toutefois il convient d'apporter un soin particulier à certaines d'entre elles parmi lesquelles :

- *celles naturellement présentes* dans l'aliment (de façon endogène ou exogène) telle la solanine dans les tomates vertes et les pommes de terre crues, responsable de céphalées, de dépression du système nerveux central et de troubles gastro-intestinaux. La notion de quantité ingérée est un élément essentiel à la survenue de ces effets secondaires. C'est ce qui est notamment observé lors de la surconsommation de glucides, lipides ou protéines sur la santé, capables d'engendrer à plus ou moins long terme, respectivement diabète, athérosclérose ou goutte.

- *celles induites par les procédés de transformation alimentaire*, dont l'exemple le plus connu est représenté par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (tels les benzopyrènes) résultant des grillades sur charbon de bois ou du fumage des viandes susceptibles d'induire mutagenèse et carcinogenèse (Irigaray *et al.*, 2006).

➤ *les contaminants alimentaires*, tels que certaines substances à action pharmacologique (estrogènes, distilbène, antibiotiques, sédatifs) dans les viandes animales introduites lors de l'élevage, des métaux lourds, des fongicides, herbicides ou insecticides (plomb, mercure, cadmium) consommés par l'intermédiaire de l'eau de boisson, de végétaux ou de produits d'origine animale.

➤ *les additifs alimentaires*, utilisés pour modifier la constitution et les propriétés de l'aliment, tels que certains colorants comme l'érythrosine E 127 (colorant rouge renfermant 4 atomes d'iode dans sa molécule, pouvant engendrer un risque d'hyperthyroïdie et employé pour colorer les cerises confites), ou encore certains agents de conservation comme les nitrites (utilisés traditionnellement dans les produits de salaison pour leur action sur la couleur et la saveur de ces produits et leur capacité d'inhibition de la croissance de Clostridia, mais responsables de la formation de nitrosamines cancérigènes) (Multon, 2002).

Tableau 2 : Exemples de composants antinutritifs dans les végétaux

Aliment	Composé à supprimer	Effet du composé	Voie de suppression
Manioc	Cyanide	Fortement toxique	Procédé thermique, génie génétique
Cacahuète, graines de légumineuse, certains légumes	Protéine allergénique	Allergie alimentaires	A ce jour impossible, hydrolyse des protéines seulement ou réduction de la teneur par sélection variétale classique ou par génie génétique. Futur : génie génétique ?
Pomme de terre	Chaconine, solanine	Fortement toxique	Cuisson, sélection classique
Légumes à pousse	Lectines	Toxiques	Cuisson (destruction), génie génétique (prévention de la formation)
Blé	Gluten	Maladies cœliaque	A ce jour impossible, seulement réduction de la teneur par sélection classique. Futur : génie génétique ?

Les réactions non toxiques se différencient d'une part, avec les réactions immunitaires, nommées plus généralement *allergies alimentaires*, et d'autre part avec les réactions non médiées par ce système de défense correspondant aux *intolérances alimentaires* (Moll & Moll, 2000).

4 Multifonctionnalité

Le concept de fonctionnalité alimentaire doit évoluer : cessant de mettre l'accent sur l'uni- ou l'oligo-fonctionnalité d'un composé, il est nécessaire de tendre vers une recherche de multifonctionnalité. Les aliments peuvent exercer une activité sur différentes fonctions cibles de l'organisme et cela pour une même quantité d'apport. Les exemples sont nombreux, même si certaines propriétés fonctionnelles sont parfois plus ou moins mises en avant par rapport à d'autres.

Un exemple qui illustre ce potentiel multifonctionnel est celui du lait. A ce titre, les protéines qui le composent, ont été particulièrement étudiées, puisqu'elles peuvent intervenir sur différentes fonctions de l'organisme. La caséine β , peptide issue de l'hydrolyse digestive de la caséine, s'est vue notamment attribuer des activités essentielles et diverses (Léonil *et al.*, 2001) :

- Des propriétés opiacées : par analogie aux endorphines endogènes, les caséines ont même été appelées casomorphines. En effet, les peptides morphinomimétiques des caséines présentent des profils d'activités physiologiques similaires à ceux des opiacés endogènes, de part leur action sur le tractus gastro-intestinal, sur la motricité intestinale, sur le système respiratoire et cardiovasculaire, et aussi sur le système nerveux central et périphérique. Ainsi, les β casomorphines ont montré la capacité de réduire la vidange gastrique et la motilité intestinale chez le rat ou encore de moduler l'insulinémie postprandiale chez le chien.
- Des propriétés sur le transport minéral: la caséine β peut augmenter l'absorption du calcium au niveau de l'iléon, en potentialisant sa solubilité intraluminal. Elle aurait aussi la faculté de restaurer les réserves en fer de l'organisme, en cas d'anémie.
- Une activité antihypertensive, par inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, enzyme intervenant dans la régulation de la pression artérielle
- Une activité immunomodulatrice, en stimulant la capacité de phagocytose des polynucléaires et macrophages murins et humains en culture et permettant ainsi donc de diminuer le risque d'infection digestive bactérienne.

En pratique, il ne faut donc pas raisonner en terme de valeur fonctionnelle unique pour

un aliment donné, mais considérer cet élément alimentaire dans son ensemble avec les multifonctionnalités qu'il présente.

Il ne faut pas perdre également de vue que la notion de quantité apportée est un facteur essentiel dans l'expression de la valeur fonctionnelle d'un aliment : un constituant alimentaire peut présenter une activité à une certaine dose. Un apport faible en celui-ci n'aura aucun effet, alors qu'une quantité supérieure apportera une toxicité (Martin, 2001).

Bien que tout aliment puisse avoir le potentiel d'exprimer une action sur une ou des fonctions de l'organisme intervenant sur l'état de bien-être et de santé de chaque individu, seul un certain nombre d'entre eux sont à ce jour reconnus pour leurs propriétés. En effet, la nutrition humaine nécessite de s'appuyer sur des études scientifiques précises qui démontrent la fonctionnalité d'un aliment avant de l'employer en diététique ou dans la conception d'une nouvelle denrée.

Chapitre 3 : Fonctions cibles

L'action concertée « la science des aliments fonctionnels en Europe (FUFOSE) » a formulé les éléments clefs à considérer dans l'approche fonctionnelle des aliments (Diplock *et al.*, 1999). Six fonctions cibles ont été identifiées où des nutriments présentent des effets au-delà de la couverture des besoins nutritionnels.

Les aliments, par le biais de leurs métabolites, les nutriments, ont la capacité d'intervenir sur toutes les fonctions de l'organisme (Roberfroid, 2000), pour en moduler l'activité. Ils représentent le facteur environnemental essentiel dans l'expression de la santé et du bien-être. Les observations sont nombreuses, mais les études scientifiques se sont intéressées préférentiellement à certaines fonctions cibles, les plus couramment impliquées dans les problèmes de santé publique et à l'origine de pathologies chroniques (Roberfroid, 2000).

1 Les fonctions gastro-intestinales

Nombreuses, elles rassemblent celles associées à l'équilibre de la microflore colique, celles liées à l'activité endocrine du tube digestif ou à son activité immunitaire, celles

intervenant dans le contrôle de la biodisponibilité des nutriments (notamment des minéraux), dans le temps de transit du bol alimentaire ou dans la mobilité de la muqueuse intestinale et enfin les fonctions modulant la prolifération cellulaire de l'épithélium digestif. Digestion, absorption, motricité, sensibilité digestive et poste de barrière sélective constituent les rôles du tractus gastro-intestinal et déterminent une part de l'état de santé de l'individu. L'action des aliments sur ses fonctions fait l'objet de toutes les recherches, car le tube digestif est un organe cible de nombreuses pathologies chroniques, telles que le cancer, les allergies alimentaires, les malnutritions, les malabsorptions ou encore les maladies inflammatoires intestinales.

2 Les systèmes redox et antioxydants

Ces systèmes requièrent aussi bien des taux en vitamines ou provitamines équilibrés et satisfaisants, que des composés alimentaires non vitaminiques tels que des polyphénols, le sélénium, le lycopène ou d'autres antioxydants naturels d'origine végétale. Les activités redox et antioxydantes sont des éléments majeurs dans la protection de la quasi-totalité des cellules et tissus de l'organisme. Leur déséquilibre est un inducteur de pathologies variées, tels que certains cancers ou les maladies cardiovasculaires. Bien que des hypothèses bien fondées existent envers le mécanisme d'action des antioxydants alimentaires, la démonstration de leurs effets reste problématique. C'est ce que l'on étudiera ultérieurement.

3 Le métabolisme des macronutriments

Cette cible concerne le métabolisme des glucides, des acides aminés et des acides gras et, en particulier, la modulation hormonale de ces métabolismes via la balance insuline - glucagon ou la production de peptides gastro-intestinaux. L'objectif des études actuelles est de réduire le risque d'apparition d'effets pathologiques associés à la résistance à l'insuline et aux troubles cardiovasculaires observés. Ceci nécessite la mise en évidence des interactions existantes entre la valeur quantitative et qualitative des nutriments consommés et la régulation de l'expression des gènes.

L'attention toute particulière apportée en l'étude de ces fonctions métaboliques s'explique par l'impact des cas de diabète et de pathologies cardiovasculaires observé en santé publique.

4 Le système osseux

Cet organe, véritable charpente de notre corps et lieu essentiel de l'hématogenèse, est essentiel au bien-être et reflète bien souvent les carences alimentaires lorsqu'elles sont présentes. Cible prépondérante des pathologies de la personne vieillissante mais aussi du jeune en pleine croissance, il constitue un sujet d'étude de la fonctionnalité alimentaire important.

5 La nutrition du fœtus et son développement

À la fois le régime de la mère au cours de la grossesse, mais aussi celui de l'enfant plus grand, peuvent influencer sur le développement du petit. Ainsi, par exemple, l'acide folique, présent dans les apports alimentaires de la femme enceinte, est un élément indispensable à la bonne croissance du fœtus, tout comme les acides gras à longues chaînes polyinsaturées dans le développement du cerveau au cours du dernier trimestre de grossesse.

6 Fonction comportementale, humeur et performances cognitives et physiques

Beaucoup de questions ont été soulevées quant au rôle des aliments sur ces fonctions. Toutefois, le problème réside dans le fait que la frontière entre l'effet nutritionnel et pharmacologique de certains composés alimentaires, par rapport à ces cibles, n'est pas encore clairement défini. De plus, les méthodes employées pour étudier de tels effets sont généralement perçues comme inadéquates pour générer des données quantitatives solides nécessaires à une analyse statistique fiable. De nouvelles études sont bientôt attendues dans ce domaine afin de répondre à ce problème.

Il s'agit donc là des fonctions à la base de toutes les attentions actuellement. Certains aliments présentent le potentiel de moduler l'activité d'autres organes ou systèmes de l'organisme bien précis, mais les recherches à leur sujet sont pauvres. Les exemples sont donc multiples, mais les études qui appuient l'activité potentielle de ces aliments sur la santé restent minces. La recherche sur la fonctionnalité alimentaire n'en est qu'à ses balbutiements.

Chapitre 4 : Facteurs de modulation de la fonctionnalité

La fonctionnalité d'un constituant alimentaire ou d'une denrée donnée n'est pas une propriété définitivement acquise. De nombreux facteurs peuvent en moduler son expression, voire l'annuler ou la modifier, tels que les procédés de transformation alimentaire, les méthodes de stabilisation, de conservation, de stockage ou de préparation, mais aussi les associations d'ingrédients choisies. Des facteurs également d'ordre individuel peuvent intervenir dans l'expression de cette fonctionnalité.

Les technologies alimentaires ont largement amélioré la digestibilité, les sensations gustatives provoquées par la consommation, la conservation de l'aliment. Ainsi, l'industrie alimentaire accorde une attention de plus en plus soutenue à la technologie des aliments dans le but de préserver leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques, tout en évitant l'apparition de pathogènes ou de contaminants. Il s'agit non seulement de ne pas perdre le bénéfice qu'offre l'aliment en lui faisant subir des traitements défavorables, mais les industriels y voient aussi là un moyen d'accroître les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles de l'élément considéré.

La préparation de nombreuses denrées alimentaires résulte d'une combinaison d'opérations *physiques* (thermique, mécanique, contact à l'air ou à la lumière, méthodes de cuisson), *chimiques* (acidification, additifs divers), *biologiques* (enzymatiques, fermentaires) ou encore d'une *alliance* d'ingrédients divers (Lorient, 2001a). Ces différents éléments sont donc susceptibles d'intervenir sur la fonctionnalité d'un aliment, mais ils ne constituent pas les seuls facteurs de modulation de son expression : il existe une variabilité individuelle globale dans la réponse aux aliments ou aux nutriments, qui dépend non seulement des pratiques alimentaires du sujet mais aussi des spécificités génétiques de celui-ci.

1 Modes de conservation et traitements alimentaires modulant la fonctionnalité

Les aliments présents dans l'assiette proviennent d'une série de procédés de transformation alimentaire. Chaque étape est susceptible de moduler la fonctionnalité de l'aliment de départ. La denrée consommée ne présente donc pas forcément les mêmes propriétés qu'à l'origine. La technologie est située après la récolte et avant la distribution, elle est constituée des procédés de conservation et de transformation.

Depuis les débuts de l'agriculture et de l'élevage, les hommes ont cherché à stabiliser les aliments afin de conserver leurs qualités organoleptiques, leur hygiène et surtout leurs valeurs nutritionnelles. La plupart des aliments, surtout lorsqu'ils sont riches en vitamines, sont des produits périssables, et de multiples procédés de conservation ont été développés.

La conservation comprend les techniques physiques, chimiques ou biochimiques, qui ont pour objectif d'améliorer la stabilité des aliments sans modifier profondément leur structure biologique. Elle utilise les méthodes qui ont pour but la destruction des micro-organismes, l'inactivation des enzymes, la réduction de la vitesse ou même l'inhibition des réactions chimiques, la diminution des pertes par respiration et d'autres activités biologiques (Roberfroid, 2002b).

2 Influence des processus physiques sur la fonctionnalité

Les méthodes physiques de conservation comprennent des applications de la chaleur, du froid, de la réduction de la teneur en eau et de l'irradiation. Ces techniques peuvent influencer la biodisponibilité de certains composés ou inactiver des composés indésirables. Il existe donc une relation étroite entre méthodes physiques et fonctionnalité (Roberfroid, 2002b).

Sur les trois constituants majeurs de l'alimentation, les protéines sont sans doute les plus fragiles et susceptibles de subir une modification de structure spatiale (dénaturation avec modification de la digestibilité et de l'allergénicité), une dégradation de la chaîne peptidique (par hydrolyse) ou des chaînes latérales de résidus d'acides aminés, engendrant des interactions avec d'autres constituants comme le lactose ou le fructose (réaction de Maillard) ou des constituants (ou contaminants) mineurs. Quant aux lipides, ils ne sont susceptibles de subir des altérations que lors de traitements thermiques sévères (séchage, cuisson) ou enzymatique (lipolyse) ou encore, à la suite de traitements mécaniques qui modifient leur état de dispersion (taille des globules gras variable). D'autres micro-éléments peuvent aussi être impliqués dans ce type de phénomènes : les vitamines et les substances anti-oxydantes sont les plus sensibles aux traitements physiques (Lorient, 2001a).

La *lumière* est un facteur pouvant moduler l'expression de la fonctionnalité d'un constituant alimentaire. Les substances les plus sensibles à la lumière sont les vitamines, à des degrés divers selon la nature de la molécule. Les radiations lumineuses et les ultraviolets

concourent à leur fragilisation, voire à leur dégradation, impliquant ainsi la perte de leurs propriétés fonctionnelles originelles. Celles qui se retrouvent majoritairement fragilisées par les conditions lumineuses sont la vitamine A et E. La vitamine A est dégradée par photolyse, tandis que la vitamine E est attaquée par photo-oxydation. Les mécanismes chimiques responsables des différentes dégradations vitaminiques sont donc variés.

Pour exemple, la destruction du rétinol a lieu par absorption moléculaire de la lumière, induisant une cassure directe de liaisons chimiques spécifiques. Le tocophérol peut être rapidement oxydé et cette réaction est activée par la lumière UV (Allwood & Martin, 2000).

Les traitements par ionisation ou irradiation sont employés pour maintenir toutes les qualités nutritives d'un aliment, éliminer micro-organismes, parasites, insectes, et éviter la germination, retarder la maturation et le vieillissement des fruits et légumes. Malgré les avantages de l'irradiation, ce type de traitement peut modifier la valeur nutritive des aliments et conduire à des ruptures de liaisons chimiques, avec apparition de radicaux libres à durée de vie courte et de produits de radiolyse ou « radiolytiques » : formation de formaldéhydes, acétone, dérivés acides à partir de glucides, dégradation oxydative des glucides, oxydation des doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, modification de leurs propriétés physiques, désamination et décarboxylation des protéines avec formation de protéines natives, dégradation des vitamines aussi bien hydrosolubles que lipophiles, et à des degrés divers (Lorient, 2001a).

L'*oxygène* présent dans l'air participe amplement aux phénomènes d'oxydation, qui représentent l'une des premières sources de modification des propriétés alimentaires. Ainsi, il favorise entre autre la dégradation des vitamines, des substances anti-oxydantes, de lipides, mais aussi la perte de certaines propriétés organoleptiques (modification de la couleur des viandes). L'élimination de l'*oxygène* du milieu alimentaire représente donc un moyen de protéger la denrée des dégradations oxydatives. Elle peut s'effectuer par enlèvement de l'air sous vide ou par séchage et emballage sous atmosphère inerte.

La conservation et le stockage en milieu atmosphérique ou sous vide conditionne donc la capacité anti-oxydante de l'aliment, c'est-à-dire sa fonctionnalité positive pour l'organisme (Roberfroid, 2002b).

Les *traitements thermiques* ont une influence essentielle sur l'expression de la fonctionnalité. Utilisés pour la destruction de germes pathogènes (pasteurisation, stérilisation,

traitement UHT), mais aussi pour améliorer la digestibilité de beaucoup d'aliments et les sensations gustatives qu'ils provoquent, les effets du chauffage varient fortement en fonction du couple temps-température et des conditions de milieu (hydratation, pH, présence de glucides ou de lipides). Ils portent surtout sur les protéines (amélioration de la digestibilité, de la biodisponibilité des acides aminés, production de substances toxiques à potentiel allergisant élevé issues de la réaction de Maillard (Chung & Champagne, 1999; Gruber *et al.*, 2004), désactivation de l'allergénicité de certaines protéines (Fiocchi *et al.*, 1999).

Quant à la réfrigération appliquée généralement de façon continue de la production à la distribution pour la majorité des denrées alimentaires, elle a pour but d'accroître la durée de conservation. Cependant, son effet négatif majeur s'exprime par le développement incontrôlé des flores psychrophiles protéolytiques et lipolytiques pouvant par conséquent réduire la fonctionnalité de certains lipides et protéines, et d'autre part, provoquer une légère déstabilisation de certaines micelles (telle que celle de la caséine) (Lorient, 2001a).

Les *traitements de fractionnement* utilisent des techniques très variées : centrifugation, filtration sur membranes, gélification et isolement de certaines phases, thermo précipitation de protéines en milieu acide ou en présence d'ions calcium, électrodialyse avec déminéralisation, donc autant de procédés capables de venir perturber la fonctionnalité de certaines substances (Lorient, 2001a). Pour exemple, l'obtention de l'huile d'olive pouvant se faire de différentes manières (première pression à froid, centrifugation avec lavage à l'eau chaude), la teneur en antioxydants de la fraction insaponifiable de l'huile en est fortement influencée et la fonctionnalité finale de ce condiment par conséquent aussi (Roberfroid, 2002b). Ces procédés vont induire la perte d'éléments potentiellement fonctionnels. Autre exemple, celui du vin. Il est accordé aux vins rouges la faculté de prévenir les maladies cardiovasculaires grâce aux polyphénols et tanins qu'ils transportent, mais ces propriétés ne sont pas supportées par les vins blancs et rosés. Ce phénomène est dû au mode de préparation. Les vins rouges sont obtenus en laissant en contact les peaux, les rafles et pépins de raisin avec le moût, alors que ces parties sont éliminées dans la vinification menant à la production de vins blancs. Or il semble que c'est précisément dans ces parties, et en particulier dans les pépins, que se logent les précieux polyphénols, qui, pendant la macération, migrent en phase liquide.

Les *traitements mécaniques* comprennent essentiellement les traitements de mélange et de brassage, de pompage, d'homogénéisation et d'émulsification. En dehors de leur action dénaturante sur les protéines, ils jouent un rôle important sur la structure des dispersions des

lipides et probablement sur leur digestibilité, ainsi que sur les disponibilité des substances liposolubles (vitamines A, E ou D, contaminants tels que les pesticides) (Lorient, 2001a). Pour exemple, le lycopène est plus biodisponible dans le jus ou la purée de tomate que la tomate fraîche.

3 Influence des procédés chimiques sur la fonctionnalité

Les méthodes chimiques sont basées sur l'utilisation de composés chimiques. On distingue des substances comme le sel, le sucre, les acides et autres utilisés depuis longtemps, et les additifs. Leur rôle s'exerce sur *l'amélioration de la conservation* de la denrée alimentaire (donc de ses qualités sanitaires, nutritionnelles et organoleptiques) par l'emploi de conservateurs (minéraux tels que nitrates et nitrites, acide borique, ou organiques comme l'acide acétique, l'acide citrique), d'antioxygènes (tels que l'acide ascorbique, les tocophérols), sur *l'amélioration des qualités organoleptiques* (texture, saveur, couleur) par l'emploi d'édulcorants, de sels, d'acidifiants, d'épaississants, d'émulsifiants, d'enzymes, et enfin sur *l'amélioration de la valeur nutritionnelle* en conservant une certaine teneur d'éléments indispensables à un bon équilibre (vitamines, ferments lactiques, minéraux, acides aminés).

Pour exemple, les divers glucides apportés dans l'alimentation afin d'améliorer la saveur de certaines denrées peuvent avoir un effet spécifique sur l'absorption des minéraux. D'une façon générale, les glucides rapidement absorbables dans les parties supérieures du tube digestif ont peu d'effet sur l'absorption des minéraux, alors que les glucides qui subissent dans les parties distales du grêle et qui servent de substrat à la flore du gros intestin sont susceptibles de stimuler l'absorption de certains minéraux en intervenant sur le pH du milieu (Roberfroid, 2002a).

4 Influence des procédés biologiques sur la fonctionnalité

Les méthodes biologiques utilisent des micro-organismes et des enzymes (Roberfroid, 2002a) . Il existe de multiples exemples d'applications dans la préparation alimentaire. La fabrication des yaourts basée sur la fermentation lactique du lait en est un et constitue

certainement la plus ancienne technologie de transformation du lait. Elle conduit à la formation d'un caillé acide (pH 4,6-4,8) très hydraté dont la texture et le goût dépendent des différentes souches de bactéries employées (principalement *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) et de leur condition d'utilisation.

Quant à la fabrication des fromages, elle repose sur une hydrolyse enzymatique limitée du constituant kappa de la micelle de caséine par la chymosine (protéase contenue dans la présure, elle-même extraite de la caillette de veau non sevré), suivie par une coagulation spontanée dépendant des conditions de température. Le caillé obtenu a un pH neutre, est fortement minéralisé. Après séparation du lactosérum par égouttage, il est soumis durant une période plus ou moins longue à un processus d'affinage où dominent des activités de lipases et de protéases d'origines microbiennes variables selon les espèces (bactéries, champignons, levures) (Lorient, 2001b).

Cette transformation du lait en fromage en modifie la fonctionnalité. La consommation de lait est capable d'engendrer chez certaines personnes sensibles des troubles intestinaux de types flatulences, douleurs abdominales, diarrhées provoqués par le lactose présent. Dans le tractus gastro-intestinal, le lactose est normalement hydrolysé par une enzyme, la bêta-galactosidase (une lactase) en glucose et galactose. Or, avec l'âge, l'activité de cette lactase décroît, engendrant un phénomène d'intolérance au lactose. Ce type de désagrément n'est pas rencontré lors de la consommation de fromages, car les micro-organismes employés pour leur fabrication ont métabolisé le lactose. La forme fromage a donc perdu sa fonctionnalité négative génératrice d'intolérance au lactose par rapport à la forme lait, tout en conservant l'avantage d'apporter de grandes quantités de calcium, importantes pour la minéralisation osseuse (Solomons, 2002).

5 Intérêt de leur utilisation en nutrition humaine

Les différentes techniques mises en place pour améliorer la conservation, mais aussi les caractéristiques organoleptiques et sensorielles de l'aliment ont considérablement contribué à rendre notre alimentation meilleure, plus digeste et saine. Ces évolutions de l'industrie agro-alimentaire ont eu d'importantes conséquences sur nos habitudes alimentaires.

Malgré tous les bénéfices attribués à l'emploi de ces procédés de conservation et de transformation alimentaire, il a été mis en évidence que les constituants majeurs (protéines, glucides et lipides) et mineurs (vitamines, minéraux, polyphénols, enzymes) peuvent, à la suite de ces technologies, subir des modifications de structure susceptibles, selon les conditions d'application des traitements, d'altérer ou d'améliorer les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles d'un nutriment (digestibilité, biodisponibilité, formation de composés indésirables, modification de l'allergénicité, teneur en vitamines disponibles). Le but des industries sera dans ce cas de trouver, dans la définition des paramètres de procédés technologiques, un compromis permettant d'obtenir le but recherché tout en limitant les risques d'altération à la fois de la valeur nutritive et fonctionnelle.

Chapitre 5 : Facteurs de modulation de la fonctionnalité dus à la formulation alimentaire

Les techniques de transformation ont un effet prononcé sur la structure biologique des constituants alimentaires. Elles englobent les procédés de séparation, de modification et de reconstitution ou de recombinaison. Comme la fonctionnalité est assez souvent basée sur la présence d'un ou plusieurs composés, la technologie de transformation joue un rôle important dans le développement des aliments. En effet, l'association de deux ingrédients donnés peut moduler voire totalement modifier la fonctionnalité respective de chacun. L'aliment en résultant aura par conséquent une fonctionnalité différente de celle attendue initialement du fait du mélange.

1 Principe des interactions entre ingrédients constitutifs de l'aliment

Un aliment n'est pas une simple association passive de différents ingrédients, mais une matrice active au sein de laquelle de nombreuses interactions, directes ou indirectes, peuvent s'opérer, comme en témoignent de nombreuses expériences. Un aliment forme donc une entité, avec des propriétés fonctionnelles et nutritives particulières. Il constitue une matrice où différentes molécules peuvent interagir. Le mélange des nutriments modifie leur structure, leur viscosité, leur pH, leur état moléculaire ainsi que bien d'autres paramètres, ce qui peut modifier leurs propriétés fonctionnelles intrinsèques. La fonctionnalité d'un aliment est donc dépendante intégralement des associations réalisées. Pour exemple, de nombreuses études épidémiologiques ont reconnu l'effet protecteur de la consommation de fruits et légumes vis-à-vis de certaines pathologies dégénératives (cancer, maladies cardiovasculaires et oculaires). Cette propriété a été en partie attribuée aux polyphénols, caroténoïdes et vitamine C et E qu'ils contenaient, mais un apport seul de ces constituants ne permet pas d'obtenir des résultats aussi probants qu'avec la consommation de fruits et légumes : l'effet matrice est donc essentiel.

Bien que le terme « interaction » dénote un effet bidirectionnel, de nombreuses interactions ne se font que dans un seul sens. Par exemple, un nutriment peut affecter les prédispositions physiologiques d'un autre, lequel reste plus ou moins passif vis-à-vis du premier constituant. Les interactions bidirectionnelles sont plus fréquentes entre nutriments qui présentent des propriétés physico-chimiques similaires et partagent des mécanismes d'absorption et de métabolismes communs. Au final, quelques interactions uni ou bidirectionnelles peuvent être affectées par la présence d'un troisième constituant alimentaire. La détermination de la fonctionnalité de l'aliment final reste donc difficile à déterminer.

2 Mécanismes de modulation de la fonctionnalité entre ingrédients

Les mécanismes d'interactions entre nutriments intervenant dans la modulation de la fonctionnalité finale de l'aliment restent encore à étudier. Seules quelques hypothèses ont été, à l'heure actuelle, émises. Les scientifiques se limitent pour l'instant à définir uniquement les grands principes d'interactions entre nutriments :

- Interaction par modification de la biodisponibilité d'un constituant fonctionnel, soit par augmentation, soit par diminution, ou encore par modulation.
- Interaction par modification du métabolisme d'un constituant fonctionnel.
- Interaction par modification de la structure moléculaire ou conformationnelle, ou encore de l'état moléculaire ou de la forme isomérique du constituant fonctionnel.
- Interaction par modulation d'une fonction de l'organisme essentielle à l'expression de la fonctionnalité du constituant alimentaire.
- Interaction par réaction chimique directe avec le constituant fonctionnel, soit par polymérisation, dégradation ou apparition de produits néoformés.

2.1 Diminution de la biodisponibilité

La biodisponibilité d'un élément est un facteur essentiel à l'expression de sa fonctionnalité : un apport optimal est souvent nécessaire pour atteindre un effet bénéfique pour l'organisme ou voir se réduire un effet néfaste dû à la consommation de ce nutriment. La dose doit être ni trop faible si l'on veut pouvoir observer une fonctionnalité positive, ni trop élevée si l'on ne veut pas voir apparaître une fonctionnalité négative.

Les interactions alimentaires affectant la biodisponibilité d'un nutriment et répertoriées au cours des études sont nombreuses dans le cas de la valeur nutritionnelle.

Certains constituants alimentaires, tels que les inhibiteurs de protéase, les lectines, le raffinose, les oligosaccharides, les saponines, les polyphénols ou encore les phytates, interviennent sur la biodisponibilité d'un autre en la diminuant. Ils sont alors qualifiés de facteurs antinutritionnels (Sandberg, 2002). Ces éléments peuvent réduire la valeur nutritionnelle mais aussi fonctionnelle d'un aliment par diminution de la digestibilité ou de l'absorption d'un nutriment.

- Par Modulation de la digestibilité

Un constituant X peut diminuer la digestibilité d'un élément Y au sein d'un aliment, rendant alors ce dernier moins absorbable et donc moins assimilable.

Les observations de l'impact de certains constituants alimentaires sur la digestibilité d'un autre nutriment sont nombreuses d'un point de vue nutritionnel. Le cas des fibres en est la preuve, puisqu'elles sembleraient capables de diminuer la digestibilité non seulement des graisses, mais également des protéines.

Les phénomènes d'interactions impliqués dans la digestibilité alimentaire méritent d'être explorés, afin de mieux comprendre l'intérêt de certaines associations nutritionnelles et fonctionnelles sur l'organisme (tel par exemple, l'ajout de certaines fibres alimentaires pour diminuer le caractère allergène de protéines) ou le désavantage de l'union d'autres constituants alimentaires ensemble vis-à-vis de fonctions déterminées du corps (les fibres alimentaires peuvent diminuer la fonctionnalité positive de certains constituants alimentaires sur l'organisme, en diminuant leur biodisponibilité).

- Par diminution de l'absorption

L'absorption du constituant alimentaire actif au travers de la muqueuse intestinale représente une étape indispensable à l'expression de la fonctionnalité. En augmentant la capacité d'absorption d'un nutriment à fonctionnalité positive donnée, on peut améliorer une fonction cible de l'organisme. A contrario, l'abaissement du seuil d'absorption d'un élément peut contribuer à moduler ses propriétés fonctionnelles négatives. Les recherches d'interférence de l'étape d'absorption d'un constituant alimentaire par un autre constitue une phase indispensable à l'amélioration des connaissances de l'expression de la fonctionnalité, car, comme étudié précédemment, la notion de quantité absorbée représente un facteur fondamental à ce phénomène : un nutriment X peut n'exprimer sa fonctionnalité envers une cible de l'organisme qu'à partir d'une dose donnée jusqu'à un seuil d'apport limite.

2.2 Régulation de la biodisponibilité

Un régime alimentaire équilibré permet d'obtenir un contrôle de la biodisponibilité et une absorption régulière des différents nutriments qui composent nos aliments. Certains constituants alimentaires sont capables de réguler l'absorption d'autres éléments de notre alimentation. Cette propriété est essentielle, puisqu'elle représente un moyen d'éviter certaines pathologies aujourd'hui en recrudescence, que sont les maladies cardio-vasculaires favorisées par le diabète et l'hypercholestérolémie.

Les recherches nutritionnelles actuelles témoignent d'un effet bénéfique des fibres vis-à-vis de l'absorption des lipides et sucres. Les fibres aident à atteindre un contrôle optimal des niveaux du sucre sanguin et du cholestérol en ralentissant leur digestion et en maximisant l'excrétion du cholestérol (Roberfroid, 2002a).

2.3 Augmentation de la biodisponibilité

L'absorption de certaines substances alimentaires peut être améliorée par l'association à d'autres constituants.

Les recherches les plus nombreuses, témoignant de l'effet bénéfique de certains constituants alimentaires sur la biodisponibilité d'autres nutriments, portent sur les minéraux en présence de fibres alimentaires. Dans le cas de la valeur fonctionnelle, on peut citer le cas du fructo-oligosaccharide qui est capable d'augmenter la biodisponibilité des isoflavones. Cette fibre est en effet capable de stimuler la croissance des bifidobactéries nécessaires au clivage des isoflavones en métabolites actifs. Ils présentent ainsi tous deux un effet coopératif dans la prévention de la perte osseuse d'origine post-ménopausique (Ohta *et al.*, 2002)

Chapitre 6 : Facteurs propres à l'individu modulant la fonctionnalité

La réponse de l'organisme aux aliments est variable selon l'espèce considérée, avec les gènes qui lui sont propres et selon l'individu, avec ses millions de variations de séquence. L'expression de la fonctionnalité d'un nutriment est donc dépendante des caractéristiques de l'individu. La variabilité individuelle globale dans la réponse à des nutriments procède donc non seulement des pratiques alimentaires du sujet mais aussi des variations au niveau de la séquence de l'ADN.

A l'heure actuelle, les produits issus de l'industrie agro-alimentaire s'adressent à la population prise dans son ensemble. En effet, leur composition est basée sur des études épidémiologiques qui ont permis de déceler des effets bénéfiques statistiquement significatifs sur de grandes cohortes de sujets sains ou atteints mais sans aucune stratification selon le terrain génétique ou les caractéristiques physiologiques et le polymorphisme de chacun. Comme les médicaments, certains aliments peuvent avoir des effets bénéfiques sur la majorité

des individus et méritent à ce titre de leur reconnaître une fonctionnalité positive via une allégation santé. Cependant, chez d'autres individus, le même produit peut-être dénué d'effet voire même avoir des effets délétères si le terrain génétique n'est pas adapté. (Junien, 2003)

La réponse d'un individu à un composé alimentaire est délimitée par son profil génétique qui peut influencer sur l'absorption des aliments, leur métabolisme et la caractéristique des cibles de ce composé. Cette réaction permet donc d'expliquer la variabilité de réponses des individus à différents types de nutriments. À ce jour, près de 300 gènes impliqués dans différentes affections, ayant toutes en commun la capacité de conférer un risque d'atteinte cardiovasculaire (dyslipidémies, thrombose, hypertension, croissance endothéliale et adhésion, inflammation, diabète, obésité), sont répertoriés et près de 200 gènes impliqués dans la variabilité individuelle de la réponse à un nutriment, à un régime ou à un exercice physique sont connus (Megarbane, 2004).

Des facteurs extérieurs à l'organisme sont susceptibles de modifier l'expression du programme génétique, c'est à dire d'influer sur le phénotype, sans altérer le génotype d'un organisme (effet épigénétique). Si ces événements surviennent à des moments clés du développement ou de la maturité d'un organe, que ce soit pendant la gestation ou à l'âge adulte, ils pourraient altérer le développement harmonieux de ce dernier et ainsi aboutir à des manifestations morbides directes mais aussi tardives et parfois des générations plus tard (Megarbane, 2004). Une étude faite auprès des Indiens Pima, constitue un bon exemple. Ceux vivant encore au nord du Mexique qui avaient conservé leur mode de vie traditionnel, soit un régime pauvre en graisses animales associé à une importante activité physique, avaient une faible proportion de leur population atteinte de diabète de type 2, tandis que 75% des Indiens qui avaient émigré aux États-Unis et adopté le mode de vie américain composé d'une alimentation riche en graisses animales et glucides, associé à un mode de vie sédentaire présentaient un surpoids ou une obésité et un diabète type 2 dans 50% des cas.

Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans le métabolisme des aliments et dans leurs modes d'action soient les mêmes que pour les médicaments, la notion de variabilité individuelle dans la réponse aux aliments est largement méconnue. Cette dernière est la résultante des influences des pratiques alimentaires et des comportements, de la variabilité de réponse liée aux pratiques alimentaires, de la variabilité de réponse en fonction du terrain génétique et de la variabilité liée à l'âge, au genre, au statut hormonal et au statut physiopathologique (Junien, 2003).

Tous ces éléments sont autant de facteurs impliqués indirectement dans la modulation de l'expression de la fonctionnalité alimentaire, par modulation de la sensibilité des cibles de

ces nutriments bioactifs, des voies de métabolisation de ceux-ci, du pH digestif agissant sur leur solubilité et leur biodisponibilité.

Chapitre 7 : Le théorème de Block

1 Problématique

L'aliment n'est autre qu'un complexe mélange chimique et biologique, résultant d'interactions entre constituants alimentaires naturels, de procédés industriels et de préparations ménagères. Tous ces facteurs peuvent potentiellement causer des changements au niveau des propriétés physico-chimiques des nutriments constitutifs et donc déterminer leur teneur au sein de l'aliment et leur biodisponibilité. De plus, les constituants alimentaires continuent à interagir au niveau du tractus gastro-intestinal et des métabolismes intermédiaires. Depuis quelques années, de nombreuses recommandations en terme d'apports en nutriments essentiels ont émergé, basées sur des études qui utilisent des nutriments isolés ou des repas purifiés tests. Cependant, dans l'alimentation globale de l'individu, ces recommandations ne représentent très probablement pas les besoins réels de l'organisme.

La fonctionnalité propre d'un nutriment apporté seul sur l'organisme, en dehors de tout autre facteur alimentaire ou procédés de transformation, ne correspond donc certainement pas à sa fonctionnalité au sein d'une denrée. De là, prend naissance le « théorème de block », selon lequel : « la fonctionnalité d'un aliment n'est pas la somme des fonctionnalités des ingrédients qui le composent ».

Le développement des études sur les interactions entre constituants prend une importance toute particulière dans les pays développés, où les préparations et les transformations alimentaires sont diverses, nombreuses, les habitudes alimentaires très variables et les pathologies chroniques en recrudescence, mais aussi dans les pays en voie de développement où il existe un réel besoin d'optimisation de l'utilisation des nutriments.

2 Intérêt du théorème de Block en nutrition humaine

On ne peut envisager la fonctionnalité d'un nutriment qu'au sein d'un aliment donné, après les différents procédés de transformation alimentaire industriels et ménagers qu'il doit subir et chez un individu aux caractéristiques spécifiques. La simple adjonction d'un nutriment aux propriétés fonctionnelles positives dans une denrée ne peut donc suffire à lui conférer les mêmes spécificités et à lui attribuer une allégation fonctionnelle finale.

Certains nutriments ont le pouvoir d'entrer en compétition avec d'autres, de potentialiser ou d'inhiber les effets d'autres constituants présents dans le produit. La fonctionnalité alimentaire s'en trouve nécessairement changée par rapport à celle initialement attendue et définie par les ingrédients qui la composent.

C'est pourquoi, afin de mieux répondre aux grands problèmes de santé publique actuels, les interactions nutriments-nutriments, mais aussi nutriments-organisme, et l'impact des différents procédés de préparation et transformation alimentaire sur la fonctionnalité des aliments doivent être plus largement étudiés.

3 Théorème de Block et stratégie nutritionnelle

Les recommandations alimentaires actuelles, en termes d'apport en tel ou tel nutriment reconnu comme bénéfique pour l'organisme, reposent sur des études utilisant des nutriments isolés ou des repas purifiés, lesquels ne reflètent donc pas nécessairement les conditions habituelles de consommation alimentaire individuelle. La fonctionnalité d'un nutriment isolé n'est pas une propriété immuable, mais dépend d'un nombre important de facteurs. De très nombreuses interactions alimentaires ont été aujourd'hui répertoriées au grè des études. Un aliment est un mélange chimique et biologique complexe, résultant de l'interaction de constituants naturels, de procédés industriels et de préparations ménagères. Tous ces facteurs impliquent des changements en termes de propriétés physicochimiques au sein de l'aliment, ce qui détermine la fonctionnalité de l'aliment final. A cela, il faut ajouter des variations dues aux conditions de stockage, aux habitudes alimentaires et la génétique. De plus, les constituants alimentaires poursuivent leur interaction au sein du tractus digestif ainsi qu'au niveau des métabolismes intermédiaires.

Pour conserver ou révéler la fonctionnalité d'un nutriment isolé initial et pour atteindre de façon optimale l'expression de cette fonctionnalité au sein de l'organisme, les recommandations actuelles et les allégations de certaines denrées ne devraient plus reposer sur « le nutriment », mais sur « l'aliment », voire même « le repas » pris dans son intégralité. La stratégie nutritionnelle doit envisager l'aliment en tant qu'unité, ainsi que les modes de préparation, de conservation, les associations d'aliments bénéfiques et le type d'individu considéré selon son âge, sexe et facteurs de risques pathologiques, pour atteindre dans la pratique une expression de la fonctionnalité alimentaire optimale.

Chapitre 8 : La fonctionnalité, de son intérêt à son utilisation

La fonctionnalité positive des aliments représente un enjeu considérable en nutrition humaine, puisqu'elle permettrait de répondre à bon nombre de problèmes de santé publique, où le facteur alimentaire joue un rôle essentiel. Ainsi, actuellement, la réduction du taux de cholestérol, les maladies cardiovasculaires et l'ostéoporose constituent les cibles les plus attirantes, suivies du développement de l'enfant, de l'hypertension artérielle, du diabète, des troubles gastro-intestinaux, de la ménopause et de l'intolérance au galactose. Ces objectifs de recherches sont intégrés dans le Programme National de Nutrition et de Santé.

Mieux comprendre les mécanismes d'action par lesquels la fonctionnalité d'un aliment s'exprime est une étape préalable indispensable avant toute utilisation de cette propriété en nutrition humaine.

La fonctionnalité alimentaire, concept connu depuis des siècles mais dont le sens a largement évolué, présente un intérêt tout particulier dans la politique nutritionnelle actuelle. Son application s'opère par l'instauration de recommandations en nutrition humaine, véhiculées par de larges campagnes promulguant l'intérêt de consommer certains aliments et le danger de l'absorption excessive d'autres denrées. Mais, la fonctionnalité alimentaire s'exprime aussi au sein des innovations dans l'industrie alimentaire, les aliments fonctionnels et les compléments alimentaires constituant sans nul doute son plus grand défi.

Le manque de données répertoriées (centralisées) limite l'utilisation de celles-ci. Il existe des tables de composition sur la valeur nutritionnelle des aliments, mais pas encore de tables systématiques sur les valeurs fonctionnelles.

Un large consensus et une structure légale adéquate sont nécessaires pour à la fois protéger le consommateur, l'inciter à diversifier et à éclairer son choix en terme d'alimentation, promouvoir l'éventail des recherches en nutrition et encourager l'innovation dans l'industrie alimentaire.

1 Définir les caractéristiques d'un aliment

La caractérisation de l'aliment est la première étape indispensable car les vertus d'un aliment particulier ne sont pas a priori généralisables. Elle comporte l'identification des matières premières principales contenues dans cet aliment, ainsi que les procédés de fabrication utilisés. Elle permet de préciser les spécificités de l'aliment étudié, et d'établir que l'aliment testé dans les études réalisées est similaire à l'aliment proposé pour porter l'allégation, tel qu'il est (ou sera) sur le marché. Un point difficile est celui des variations de composition inhérentes aux produits alimentaires qui sont dues, d'une part aux matières premières fournies par l'agriculture qui changent selon les saisons et les pays, et d'autre part aux variations mineures à l'intérieur d'une gamme de produits comme les variations d'aromatisation. Ces variations sont quasiment sans conséquence sur l'effet fonctionnel. Le seuil à partir duquel ces petits changements aboutissent à un aliment significativement différent du produit de base du dossier, est à apprécier au cas par cas par un panel propre à l'entreprise ou par un panel d'experts indépendants. Il est bien connu, par exemple, qu'une fibre extraite et raffinée ajoutée dans un pain, n'a pas les mêmes effets qu'une même fibre à l'état brut dans une céréale complète. A l'opposé, un yoghourt à la fraise apporte la même efficacité qu'un yoghourt à la framboise ou nature, sur la digestibilité du lactose (Pascal *et al.*, 2006).

2 Mise en évidence de l'effet physiologique d'un aliment

La démonstration scientifique du bénéfice allégué doit se faire dans un cadre scientifique défini : c'était l'objectif d'une action concertée européenne, suite logique de FUFOSE, conduite par ILSI Europe avec l'aide des fonds de la Commission Européenne, PASSCLAIM (Process for the assessment of scientific support for claims on foods). Certains principes généraux et des critères décrivant les besoins scientifiques nécessaires pour justifier une allégation ont été identifiés.

Une base scientifique de qualité est la pierre angulaire d'un dossier pour soutenir la démonstration des effets. Cette base peut se schématiser en quatre étapes principales :

- caractériser l'aliment porteur de l'allégation ;
- apporter des données convaincantes par des études conduites sur l'homme avec cet aliment ;
- utiliser des marqueurs pertinents dans les études, notamment les études cliniques ;
- analyser les données existantes dans leur ensemble pour permettre de construire un avis pondéré justifiant ou non l'allégation proposée.

L'aliment utilisé dans les études cliniques conduites pour démontrer l'effet doit être de même qualité que celui qui sera sur le marché, nous l'avons vu, et il doit être consommé en quantité similaire à celle utilisée par le consommateur moyen. Souvent les premières études ont été faites avec des quantités plus fortes afin d'améliorer les chances d'observer un effet significatif. Cette étape permet aussi de vérifier l'absence d'effet délétère lors de consommation intense par des consommateurs outranciers. S'il est indispensable de démontrer qu'avec une quantité usuelle, l'effet allégué est observé, l'existence d'une relation entre la quantité consommée et l'effet observé est un élément utile pour conforter la démonstration de l'effet.

Lorsque le bénéfice apporté par une portion est trop faible pour être mesuré significativement chez le consommateur moyen en raison des variations individuelles trop grandes, l'extrapolation de l'effet d'une dose supérieure à la dose usuelle sera facilitée par l'existence d'une telle courbe dose/effet. En effet le bénéfice quotidien peut rester en dessous

des limites de détection des marqueurs disponibles avec les quantités usuelles, le bénéfice se développant jour après jour. (Pascal *et al.*, 2008)

3 Les critères d'une « bonne » étude clinique visant à démontrer une propriété fonctionnelle d'un aliment.

Une bonne étude est une intervention mesurant l'effet de la consommation de l'aliment étudié par des sujets humains, représentatifs de la population visée. Le suivi simultané d'un groupe contrôle similaire permet d'éliminer les biais liés à l'intervention, surtout si la répartition des sujets entre le groupe « produit » et le groupe « contrôle » se fait au hasard et si les investigateurs et les utilisateurs ignorent qui consomme quoi.

Il convient que les sujets participant aux études soient représentatifs de la cible de consommateurs prévue : par exemple l'étude d'un effet d'un produit sur la masse osseuse de la femme ménopausée ne peut se faire sur un étudiant male car ils ont des régulations métaboliques différentes. La définition de la représentativité biologique est une question difficile à résoudre au cas par cas : il faut prendre en compte, selon les fonctions, l'importance de l'âge, du sexe, du groupe ethnique, du génotype modulant la fonction en cours d'étude, le style de vie et l'alimentation, le poids et la taille, le cycle menstruel, l'environnement (climat...). La connaissance du mécanisme physiologique mis en œuvre par le produit permet de définir les critères permettant l'extrapolation des sujets étudiés dans les études, aux consommateurs ciblés.

Pour réaliser une étude expérimentale d'intervention il faut disposer d'un groupe contrôle. Ce dernier doit avoir une consommation similaire au groupe testé moins la consommation du produit actif. La notion de placebo, aisée à mettre en œuvre lorsqu'on étudie des molécules actives pures, en faibles quantités et isolées, devient plus difficile lorsqu'il s'agit d'aliment complexe consommé en quantité significative. Par exemple une ration de pâtes cuites fait environ 150 grammes, et il n'y pas d'aliment « neutre » consommable en quantité équivalente et qui puisse faire office de « placebo-contrôle ». Par ailleurs certains aliments ne sont pas imitables ou substituables : ainsi pour mesurer l'effet bénéfique des fruits, il n'est pas possible de faire une étude en aveugle et il n'y a pas de « contrôle » évident au sens expérimental du terme. Enfin, un produit « aveugle » peut induire un effet « nocebo » bien connu des physiologistes de l'alimentation qui ont décrit la néophobie : la consommation d'un produit « inconnu » peut, elle aussi, perturber une

fonction. De plus lorsque l'on remplace un aliment par un autre on ne peut pas exactement apporter les mêmes nutriments, ce qui fait que le groupe contrôle n'est pas vraiment comparable au groupe traité : chacun des deux groupes consommant quelque chose que l'autre ne consomme pas. Il n'y a pas de méthode idéale pour pallier ces difficultés et certains n'introduisent le produit testé que dans la diète du groupe testé, en ne changeant rien à l'alimentation du groupe contrôle.

La durée des études doit être adaptée à l'effet recherché et à l'effet allégué. Les allégations sur la réduction des facteurs de risque demandent la plupart du temps des études assez longues. Mais plus les études sont longues, plus elles s'éloignent des conditions réelles de vie, et plus elles sont éthiquement discutables. Dans ce dernier cas il est important de pouvoir disposer de marqueurs précoces qui permettent de réduire le temps d'étude, tout en extrapolant les données acquises avec les marqueurs, sur le bénéfice final recherché. Nous avons déjà précisé que l'aliment testé doit pouvoir s'inscrire dans un mode de consommation usuel participant à la diversité et à l'équilibre du régime alimentaire. La biodisponibilité du composé actif doit être testée pour s'assurer qu'il sera distribué sur son site d'activité (Pascal *et al.*, 2008).

4 Evaluation du bénéfice allégué lorsqu'il ne peut être mesuré directement dans les études cliniques ?

La mesure directe du bénéfice est toujours préférable : on peut ainsi mesurer un bénéfice sur des performances physiques ou intellectuelles, sur les temps de transit digestif, sur le bien ressenti... Mais la plupart du temps, le bénéfice n'est pas mesurable directement, et on a recourt à des mesures indirectes à l'aide de marqueurs : par exemple dans le cas des réductions des facteurs de risques de maladies, où les marqueurs signalent le changement du niveau de risque plus précocement que l'incidence de la pathologie ; Il peut aussi être impossible d'avoir accès éthiquement au marqueur visé (paroi vasculaire, muqueuse bronchique, sang portal...), ou impossible de le mesurer dans de larges études cliniques car demandant des examens trop complexes (mesure du métabolisme énergétique, cinétique d'utilisation du glucose....). Les marqueurs retenus pour ces mesures indirectes doivent bien sûr être pertinents, par exemple les cholestérols plasmatiques comme marqueurs du risque cardio-vasculaire.

Le changement observé doit aussi être significatif biologiquement. S'il est aisé de mesurer une amélioration d'une performance physique et d'en apprécier la signification, il est

plus difficile de définir une amélioration biologiquement significative d'un marqueur. Par exemple : est-ce qu'un changement de fréquence cardiaque d'un battement par minute est significatif et représente un bénéfice pour l'individu, ou pour l'espèce ?

Enfin la démonstration de l'effet se traduit soit par un changement de la fonction visée : soit après un changement d'un marqueur directement lié à la fonction : le temps de transit digestif ; soit par un changement d'un marqueur intermédiaire : le taux des cholestérols sanguins comme indicateur prédictif d'un risque cardio-vasculaire. Le suivi de l'évolution de ce marqueur intermédiaire précoce se substitue à la mesure de l'évolution d'une pathologie ou d'un bénéfice.

Une fois les données acquises sur un produit défini, par des études cliniques bien conduites sur des sujets représentatifs et dans des conditions usuelles, et en utilisant des marqueurs adéquats, il faut évaluer l'ensemble des données acquises pour apprécier la qualité et la portée de la démonstration scientifique : est-ce que les données recueillies permettent de soutenir l'allégation proposée ? Dans cette évaluation, la prise en compte des données expérimentales sur les mécanismes, les modèles *in vitro* et les modèles animaux, apportent des éclairages complémentaires souvent utiles. Mais la démonstration de la véracité d'une allégation repose essentiellement sur des données acquises sur l'homme.

La littérature existante sur l'effet recherché avec des produits similaires à l'aliment étudié pèse positivement dans l'évaluation finale du dossier de l'allégation. En revanche lorsqu'il s'agit de données originales, il est important d'avoir des confirmations cliniques des effets, observées par des équipes indépendantes (Pascal *et al.*, 2008).

Conclusion

La valeur fonctionnelle constitue pour les nutritionnistes un champ de travail important : il a fallu un siècle pour passer des travaux d'ATWATER aux tables de composition d'aliments ; il faudra quelques décennies pour achever le travail d'étude de cette valeur fonctionnelle.

Les industries agro-alimentaires attendent informations et avancées des connaissances sur ces trois types de propriétés mais surtout sur l'utilisation qu'en fait le consommateur dans son acte usuel de prise alimentaire.

PARTIE 2 : LA FONCTION ANTIOXYDANTE

Des dérivés actifs de l'oxygène, en premier lieu les radicaux libres, sont produits au cours du fonctionnement normal des cellules, notamment lors de la respiration cellulaire et de la lutte contre les agents exogènes. Ils sont également produits, en quantité accrue, lors de certains processus pathologiques. Du fait de leur forte réactivité, ces dérivés peuvent provoquer des lésions à divers niveaux cellulaires dont certaines favoriseraient le développement de maladies comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires. Ces dérivés actifs de l'oxygène sont physiologiquement inactivés par divers mécanismes faisant intervenir des minéraux ou vitamines que l'on qualifie donc d'antioxydants. Il s'agit, notamment, du zinc, du sélénium, des vitamines E et C, des caroténoïdes, et des polyphénols. Les sujets ayant un apport insuffisant de ces constituants seraient plus exposés aux cancers et aux maladies cardiovasculaires. La prévention nutritionnelle du stress oxydant et de ses conséquences impliquent, comme mesure première, l'optimisation des apports en antioxydants par l'alimentation. Les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes sont reconnus et attribués à la teneur élevée en antioxydants de ce type d'alimentation. Ainsi, nous étudierons les processus du stress oxydant, les différents antioxydants alimentaires, puis nous verrons quelles sont les méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant

Chapitre 1 : Le stress oxydant

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants (Favier, 2003).

1 Définition des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$),....), et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Novelli, 1997).

Stricto Sensu, un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. La probabilité entre ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré. Si cette instabilité est modérée, la probabilité d'accepter un second électron est grande et, dans ce cas, le radical libre ne présente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydoréduction classique. Si au contraire cette instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré à une autre molécule. Plus cette instabilité est grande, moins la réaction est spécifique. En d'autres termes, l'électron passe sur une molécule non prévue à cet effet. Parmi ces molécules, certaines deviennent très réactives vis-à-vis de l'oxygène et subissent une oxydation définitive. Pour autant, le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas et l'électron libre peut passer sur d'autres molécules, entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique.

Pour arrêter cette réaction en chaîne, certaines molécules sont capables de céder un de leurs électrons. La molécule radicalaire acceptant ce second électron perd son caractère radicalaire. En revanche, la molécule ayant perdu un seul électron devient radicalaire et peut théoriquement générer une nouvelle réaction en chaîne. Toutefois, si cette nouvelle espèce

radicalaire est relativement stable, elle va avoir le temps de compléter sa réaction d'oxydoréduction, soit en se régénérant (en regagnant un électron) soit en s'oxydant (en perdant un deuxième électron). En impliquant un électron libre dans une réaction d'oxydoréduction classique, ces molécules diminuent les phénomènes d'oxydation en chaîne et sont qualifiées de piégeurs de radicaux (*scavenger* dans la littérature internationale).

Alternativement, deux radicaux libres peuvent réagir entre eux pour mettre fin au processus radicalaire. C'est notamment les cas entre deux superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ou entre le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$); la première réaction engendrant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la seconde du peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$). Contrairement aux réactions impliquant des *scavengers*, ces réactions produisent des molécules toxiques au même titre que les radicaux libres dont elles dérivent et ne participent pas à la lutte contre le stress oxydatif (Fontaine, 2001).

Tableau 3 : Principaux radicaux libres oxygénés et autres formes actives

Nom	Formule
Oxygène singulet	1O_2
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$
Radical hydroxyle	$OH^{\bullet}$
Radical hydroperoxyle	$HOO^{\bullet}$
Radical peroxyde	$ROO^{\bullet}$
Hydroperoxyle	$ROOH$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	$NO^{\bullet}$
Peroxynitrite	$ONOO^{\bullet}$
Hypochlorite	ClO^-

2 Origines des espèces réactives de l'oxygène

2.1 Paradoxe de l' O_2

L'oxygène est indispensable au fonctionnement cellulaire mais est la source d'espèces réactives qui peuvent oxyder des macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les

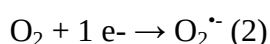
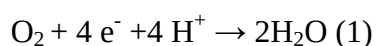
lipides. Cependant, ces espèces réactives sont également des produits essentiels au fonctionnement cellulaire ; ils seraient impliqués dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée et agiraient comme second messager (Droge, 2002).

Dans la cellule il existe donc un équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et leur élimination. Le stress oxydant est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur de la production d'espèces réactives qui conduit à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels. Ce déséquilibre pro/antioxydant peut avoir une origine exogène : toxine, molécule oxydante comme l'O₃, ou une origine endogène telle que des dysfonctionnements de certaines sources de production ou des systèmes d'élimination.

2.2 Production endogène des radicaux libres

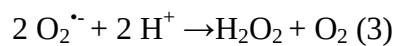
La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production de l'eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale.

Toutefois cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2% de l'oxygène subit une réduction monoélectrique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde O₂^{•-}, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q)).

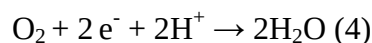


De même la NADH-déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales, peuvent conduire à la formation de radicaux O₂^{•-}. Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits (FMNH₂, FADH₂), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique.

Si l'anion superoxyde est libéré dans un milieu dépourvu de protons, il peut exercer ses effets délétères : de tels milieux se rencontrent au sein des doubles couches phospholipidiques des membranes cellulaires dont la structure aurait tendance à augmenter la durée de vie des radicaux libres. Si cet anion est libéré dans un milieu protoné, il subit une dismutation, phénomène au cours duquel l'anion $O_2^{\cdot-}$ cède son électron célibataire à un autre anion superoxyde qui devient l'anion O_2^{2-} ; ce dernier réagit alors avec les protons du milieu pour donner le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (réaction 3)



L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène H_2O_2) est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse plus facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires. Sa production peut également résulter de la biélectronique de l'oxygène (réaction (4)) en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase...) qui se trouvent principalement dans les organes cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de H_2O_2 .

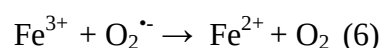


La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction (5), dite de Fenton) ou Cu^{2+} .



Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis de matériaux biologiques, il est très oxydant. Il peut initier une peroxydation lipidique (Gutteridge, 1995) qui pourra continuer en chaîne. C'est le radical le plus dangereux pour l'organisme.

L'anion superoxyde permet aussi de reformer du fer ferreux à partir du fer ferrique (réaction 6)



L'oxygène formé peut à nouveau entrer dans la chaîne respiratoire et donner $O_2^{\cdot -}$. Cette suite de réactions est appelée cycle d'HABER WEISS.

Si usuellement cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration, elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie), ou lorsque interviennent des désordres inflammatoires ou nutritionnels (carence en ubiquinone), qui augmentent avec l'âge.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par des cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe NADPH oxydase, capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers.

Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle-aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. La production concomitante dans un même lieu de $NO^{\cdot}$ et de superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxinitrite ($ONOO^{\cdot -}$).

D'autres sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes des cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments ; mais il se produit avec des composés endogènes comme l'acide lévulinique et surtout les catécholamines.

2.3 Formation de radicaux libres par voie exogène

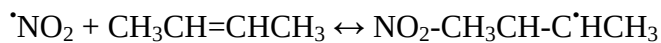
L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres

($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$) et des molécules génératrices de radicaux libres (H_2O_2) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants, ainsi que les radiations ionisantes.

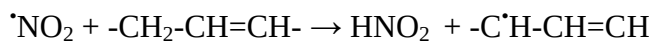
L'ingestion d'alcool est suivie de formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' $O_2^{\cdot-}$. L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase, et du cytochrome P450.

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels) participent à la genèse des radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires.

La réaction peut être réversible



Ou irréversible :



NO et NO_2 peuvent également réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux $OH^{\cdot}$. La fumée de cigarette, contenant NO et NO_2 , renferme de fortes concentrations en composés insaturés et stimule, par son action irritante, les macrophages des alvéoles pulmonaires. D'autres toxiques, tel que le tétrachlorure de carbone (CCl_4), par l'intermédiaire des radicaux $CCl_3^{\cdot}$ est capable d'induire l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés, et donc de provoquer une augmentation des hydroperoxydes lipidiques.

Les radicaux libres font parties de systèmes ubiquitaires. Leurs cibles sont nombreuses, elles correspondent à l'ensemble de l'organisme, c'est pourquoi les radicaux libres sont impliqués dans de très nombreuses pathologies.

3 Dommages induits par les especes réactives de l'oxygène (ERO)

La production excessive d'ERO provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés

notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique.

3.1 Modification de l'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque des ERO. La petite taille, la solubilité dans l'eau et la faible réactivité de $O_2^{\cdot -}$ lui permettent d'être présent partout dans l'organisme et même dans le noyau des cellules. Le radical hydroxyle produit par sa décomposition peut causer des dommages aux acides nucléiques.

Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par $OH^{\cdot}$ peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002).

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone.

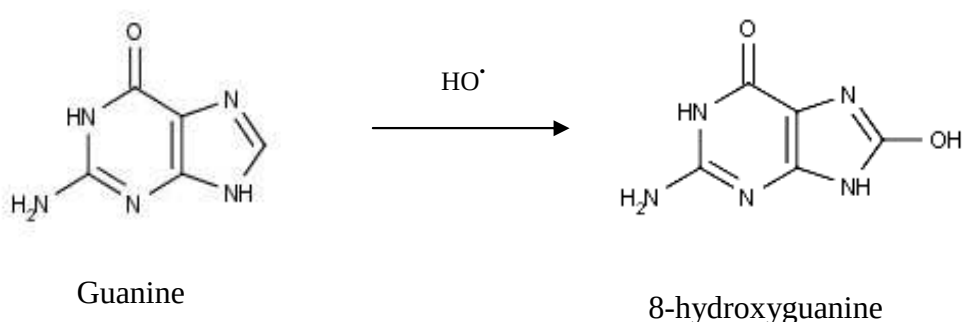


Figure 1: Addition de $HO^{\cdot}$ sur la guanine

La 8-hydroxyguanine peut être mal lue lors de la transcription de l'ADN et être cause de mutations (Fulbert & Cals, 1992).

Les ERO peuvent également attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le site lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin.

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque de lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés.

L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysine/guanine. Le rôle des nombreux métaux fixés à l'ADN (Fe, Mg, Zn, Cu, Ni, Cd....) est crucial pour amplifier ou orienter le profil de ces lésions.

Cette attaque de l'ADN est quotidienne puisque le nombre de lésions se formant chaque jour dans une cellule est estimé à 10^4 . Il existe des systèmes de réparation de ces lésions, mais lorsque le mécanisme se dérègle soit par une surcharge de lésions en cas de stress massif, soit par un mauvais fonctionnement de ces systèmes de réparation chez des sujets déficients en cofacteurs (thioredoxine, zinc) ou atteints d'une anomalie génétique. Dans ce cas, les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN polymérases translesionnelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome, ou une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par un mécanisme appelé apoptose. *In fine*, cette modification de l'ADN induit des mutations par transversion GC (guanine/cytosine) vers TA (thymine/adénine) souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. Ce sont les premières étapes de la carcinogénèse. Les agents carcinogènes sont tous des générateurs puissants de radicaux libres (radiations ionisantes et UV, fumée, alcool, métaux carcinogènes, hydrocarbures polycycliques)(Favier, 2003).

3.2 Modifications des protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydrile (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées ou inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, antienzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupement amines ionisables, soit par

extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans et autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).

3.3 Modification des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'une autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer *et al.*, 1992). Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical peroxy, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonenal. Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de faible densité) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux.

4 Maladies humaines liées à un stress oxydant

Les conséquences du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression des protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane entraînant des lyses immédiates. D'autres perturbations biologiques sont observées à la suite d'un stress oxydant : baisse de la fluidité des membranes, anomalies de récepteurs, diminution de la sensibilité à l'insuline, perturbation de l'immunité cellulaire, fibrose, dépôts de lipides,

affaiblissement musculaire, voire mort neuronale ou apparition de mutations. De nombreuses anomalies pathologiques sont également induites par le stress oxydant : mutations, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôts de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression...(Favier, 2006).

Comme l'inflammation, le stress oxydant est impliqué dans maintes maladies. La variété des conséquences médicales ne doit pas surprendre, car ce stress sera, selon les cas, localisé à un tissu et à un type cellulaire particulier, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et s'associera avec d'autres facteurs pathogènes ou des anomalies génétiques spécifiques et individuelles.

Par la création de molécules biologiques chimiquement et irréversiblement anormales et la surexpression de certains gènes, le stress oxydant sera la cause initiale essentielle de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse pulmonaire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré (Tableau 4).

Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroite ; les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les liaisons de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant les anti oncogènes comme la protéine p53. Par contre, à un stade plus avancé d'évolution de la carcinogenèse, les radicaux libres serviront inversement pour les NK (*Natural Killer*) lymphocytes à tuer les cellules tumorales.

Le stress oxydant sera aussi l'un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. Dans la genèse de la plaque d'athérome, l'oxydation des LDL est un des phénomènes clefs transformant les monocytes en cellules spumeuses, mais le rôle du stress oxydant dans la mise en route d'autres facteurs de risque est loin d'être négligeable : augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs pro-oxydants (prostacycline, cytokines, facteurs de fibrinolyse, superoxydes, NO), augmentation de la prolifération des fibres lisses. Un facteur de risque pourrait être, l'homocystéine, qui verrait son action liée en partie à la production de radicaux libres lors de son métabolisme (Favier, 2006).

Tableau 4 : Relations entre les maladies et le stress oxydant (Favier, 2006)

Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladies entraînant un stress oxydant secondaire
• Agranulomatose septique • Psoriasis	• Cancers • Auto-immunité • Cataracte • Dégénérescence maculaire • Sclérose latérale amyotrophique • Photosensibilisation • Irradiation • Intoxication : CCl₄, Cd, Fe, alcool • Hémochromatose	• Maladie d'Alzheimer • Stérilités masculines • Maladies virales : EBV, HVB • Rhumatismes • Athérome • Asthme • Insuffisance respiratoire	• Diabète • Insuffisante rénale • Mucoviscidose • Sida • Choc septique • Infarctus du myocarde • Ischémies/reperfusion • Parkinson • Brûlures • Thalassémie • Greffes d'organes Traitements : • Anticancéreux • PUVA thérapie • Oxygène hyperbare

Chapitre 2 : Moyens de défense contre les radicaux libres : systèmes antioxydants

Confronté aux nombreuses possibilités oxydantes des biomolécules, les organismes évolués ont progressivement mis en place des systèmes de défense antioxydante qui agissent de différentes manières :

- abaisser la concentration d'espèces oxygénées réactives par voie enzymatique ou par piégeage chimique
- inhiber la formation de ces espèces (chélation des métaux de transition, inhibition des enzymes productrices d'espèces réactives de l'oxygène)
- réparer les molécules partiellement dégradées
- éliminer les molécules trop dégradées

Le maintien d'un niveau non cytotoxique d'espèces réactives de l'oxygène est donc assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats.

Les antioxydants cellulaires sont non-enzymatiques et enzymatiques (Mates *et al.*, 1999; Droge, 2002)

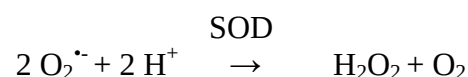
1 Les mécanismes naturels de protection *in vivo*

1.1 Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Plus récemment d'autres enzymes ayant des propriétés antioxydantes ont été également révélées.

- Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutase (SOD) sont une classe de métallo enzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en H₂O₂.



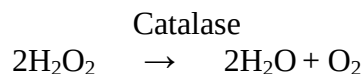
Cette réaction génère néanmoins du peroxyde d'hydrogène potentiellement toxique. La SOD doit donc travailler conjointement avec des enzymes qui détruisent H_2O_2 .

Les superoxydes dismutases existent sous plusieurs isoformes formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde (Zelko *et al.*, 2002). Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD, la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD).

Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer, présentes dans les hématies et les peroxysomes hépatiques et les glutathion peroxydases (Ganther, 1999).

- Les catalases

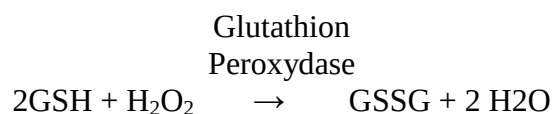
Les catalases sont des métallo enzymes qui décomposent le peroxyde d'hydrogène en produits inertes



- Les glutathions peroxydases

Des glutathions peroxydases à sélénium existent dans le cytosol (cGPx) dans le plasma (pGPx) ; forme glycosylée de l'enzyme cellulaire d'origine rénale, au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx) ; monomère de l'enzyme cellulaire tétramérique, contenue dans les membranes et spécialisée dans la métabolisation des hydroperoxydes phospholipidiques, et une iso enzyme est spécifique des cellules digestives (GIGPx) ; présente dans le foie et le colon et protégeant directement le tractus gastro-intestinal contre les effets néfastes des dérivés actifs de l'oxygène.

La glutathion peroxydase catalyse la réduction de H_2O_2 par le glutathion.



Ces enzymes sont sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium.

Le rôle des SOD et des peroxydases est complémentaire car une bonne protection ne peut être obtenue par les superoxydes dismutases seules.

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases. La plupart des enzymes décrites ci-dessus, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante.

1.2 Antioxydants non –enzymatique endogènes

Parmi les autres substances présentes dans l'organisme et dotées de propriétés antioxydantes, il convient de citer la bilirubine, les groupes thiol-protéines, l'acide urique, l'albumine, les œstrogènes. On peut considérer la riboflavine (vitamine B2) comme un antioxydant préventif, parce que deux de ses dérivés (le phosphate de riboflavine et la flavine adénine dinucléotide) interviennent dans les réactions d'oxydoréduction et que la glutathion peroxydase est régénérée grâce à une enzyme, la glutathion réductase, elle-même dépendante de la flavine adénine dinucléotide.

1.3 Antioxydants non –enzymatique exogènes

En outre, le système oxydant du corps humain comprend des molécules exogènes, c'est-à-dire apportées par l'alimentation, telle que la vitamine E, le β -carotène (provitamine A), la vitamine C (acide ascorbique), les polyphénols et autres phytonutriments. Les polyphénols seront particulièrement développés par la suite.

1.4 Oligoéléments : antioxydants alimentaires non piégeurs de radicaux directs

- Se

Le sélénium est un élément minéral essentiel contenu à l'état de traces dans l'organisme. Présent sous diverses formes chimiques dans l'alimentation, il est activement métabolisé puis incorporé sous forme de sélénocystéine dans plusieurs sélénoprotéines (les glutathions peroxydases) où il constitue un centre catalytique actif. Parmi les autres sélénoprotéines à propriétés partiellement ou totalement antioxydantes, on trouve également la sélénoprotéine P, une protéine plasmatique représentant 60 à 80 % du sélénium plasmatique. Quelle que soit l'enzyme sélénée, il est important de signaler que l'activité enzymatique est directement dépendante des réserves corporelles et de l'apport alimentaire en sélénium et donc, plus ou moins fortement réduite en cas de carence d'apport en cet oligo-élément essentiel.

Les principales sources alimentaires de sélénium sont les aliments riches en protéines d'origine animale (viandes, poissons, œufs, lait), les céréales et certains légumes et fruits secs. Remarquons que l'apport alimentaire en sélénium est extrêmement variable d'une région géographique à l'autre et est également fortement fonction des habitudes alimentaires (Nève, 2002).

- Zn

Le zinc possède des propriétés antioxydantes documentées dans divers modèles, mais les mécanismes responsables de cette activité restent peu clairs. Il ne possède pas directement de propriétés redox mais est un élément important dans de nombreuses protéines, à la fois au plan fonctionnel (ils constituent le centre actif de plus de 200 enzymes) et structural (notamment par l'intermédiaire de la constitution de la cystéine et de l'histidine). Du point de vue antioxydant, il semble protéger les fonctions thiols des protéines contre l'oxydation. Ce fait a été démontré en ce qui concerne de nombreuses protéines membranaires ainsi que pour les métalloprotéines. Le zinc catalyse également une des principales enzymes antioxydantes ; la SOD (comme nous l'avons vu précédemment).

- Cu

Cet oligo-élément est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Toutefois, au même titre que le fer, il joue, en tant que métal dit de transition, un rôle important dans le déclenchement des réactions conduisant à la formation d'ERO. Une concentration trop élevée de cuivre

pourra donc refléter la présence d'un stress oxydant. Plusieurs études ont montré une augmentation du taux sérique en cuivre au cours du processus de vieillissement.

Le Zinc et le cuivre sont en outre des cofacteurs de nombreuses enzymes et interviennent dans de nombreux processus métaboliques.

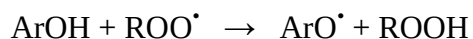
Cependant le zinc et cuivre, sont susceptibles de favoriser la peroxydation. Aussi l'organisme se protège contre eux par des mécanismes de chélation :

- Séquestration du fer par la transferrine et la lactoferrine,
- Séquestration de l'hémoglobine par l'heptoglobine,
- Séquestration du cuivre par la ceruloplasmine et l'albumine

2 Antioxydants alimentaires : Piégeurs de radicaux

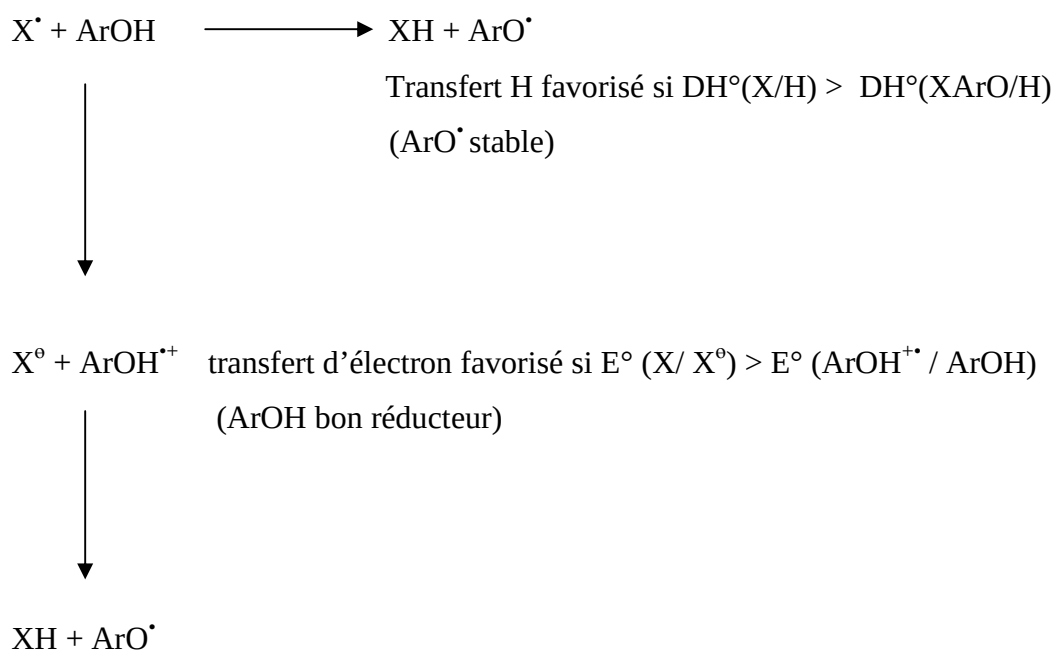
2.1 Mécanisme d'action

Ces antioxydants peuvent directement piéger les radicaux oxygénés par des réactions d'addition sur les doubles liaisons (caroténoïdes), ou, plus fréquemment, en leur transférant un électron ou un atome d'hydrogène. C'est le cas des phénols (vitamine E, polyphénols), des énols (vitamine C), des thiols et autres composés réducteurs ou porteurs d'atomes H labiles. L'oxydation préférentielle de l'antioxydant en des sous produits relativement inertes préserve les biomolécules voisines de l'attaque par les ERO.



ArOH représentant l'hydroxyle phénolique par exemple

Dans ces réactions, la thermodynamique et la cinétique sont liées. Si la réaction est exothermique, la cinétique de transfert a toutes les chances d'être rapide. Il est difficile de trancher entre transfert d'électron et transfert d'atome d'hydrogène lors du piégeage. Le premier est déterminé par le potentiel standard des couples redox $\text{X}^\bullet / \text{X}^-$ et $\text{ArOH}^{\bullet+} / \text{ArOH}$ et le second est déterminé par l'énergie de dissociation de la liaison O-H du phénol considéré ($\text{DH}^\circ (\text{O/H})$).



En milieu basique ($\text{pH} > \text{pKa}$ du couple ArOH/ArO^-), le transfert d'électrons est le seul mécanisme à considérer.

Plus généralement, les antioxydants participent à divers types de réactions, comme on le voit dans le tableau 5, où ils sont symbolisés par la lettre A. On observera qu'ils sont à même de jouer dans les deux sens, autrement dit de contribuer à l'activation aussi bien qu'à l'inactivation des radicaux libres lipidiques, quoique leur fonction dominante soit à l'évidence la seconde :

Tableau 5 : Types de réactions faisant intervenir les antioxydants

$\text{ROO}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{A}^\bullet$	(1)
$\text{RO}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{ROH} + \text{A}^\bullet$	(1')
$\text{A}^\bullet + \text{ROOH} \rightarrow \text{AH} + \text{ROO}^\bullet$	(2)
$\text{A}^\bullet + \text{ROO}^\bullet \rightarrow \text{AOOR}$	(3)
$\text{A}^\bullet + \text{A}^\bullet \rightarrow \text{Produits inactivés}$	(4)
$\text{A}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{AH} + \text{R}^\bullet$	(5)
$\text{AH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{A}^\bullet + \text{RO}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	(6)
$\text{AH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{A}^\bullet + \text{HOO}^\bullet$	(7)
$\text{AOOR} \rightarrow \text{AO}^\bullet + \text{RO}^\bullet$	(8)
$\text{A}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{AOO}^\bullet$	(9)

2.2 Cas des Vitamines

2.2.1 Vitamine C

L'acide ascorbique ou vitamine C est un nutriment essentiel pour l'homme. On la retrouve en concentration relativement élevée dans les compartiments aqueux de l'organisme ; elle exerce diverses activités biologiques, notamment comme co-substrat de plusieurs oxygénases et d'oxydases, et les effets de sa carence sont bien établis (scorbut).

La vitamine C intervient dans de grandes fonctions de l'organisme : défense contre les infections virales et bactériennes, protection de la paroi des vaisseaux sanguins, assimilation du fer, action antioxydante (capture des radicaux libres), détoxification de substances cancérigènes, cicatrisation.

La vitamine C, en raison de sa structure comportant une fonction ène-diol, comporte des propriétés réductrices à la base de son activité biologique. Elle assure deux fonctions principales : une activité antioxydante et un rôle de cofacteur dans les réactions d'hydroxylation catalysées par les oxygènes.

C'est un important antioxydant hydrosoluble capable d'interagir avec plusieurs dérivés de l'oxygène comme O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 , NO et HO. Sur le plan chimique, sa forme ionisée (ascorbate) est donneur d'électrons (un réducteur) qui se transforme tout d'abord en intermédiaire radicalaire semidéhydroascorbate puis en déhydroascorbate (Figure 2). Le radical ascorbyle est relativement peu réactif et disparaît par disproportionation en terminant les chaînes radicalaires, ce qui redonne naissance à l'ascorbate et produit du déhydroascorbate. Ce dernier dérivé est lui-même immédiatement retransformé en ascorbate par des enzymes réductase ou par réduction chimique par le glutathion.

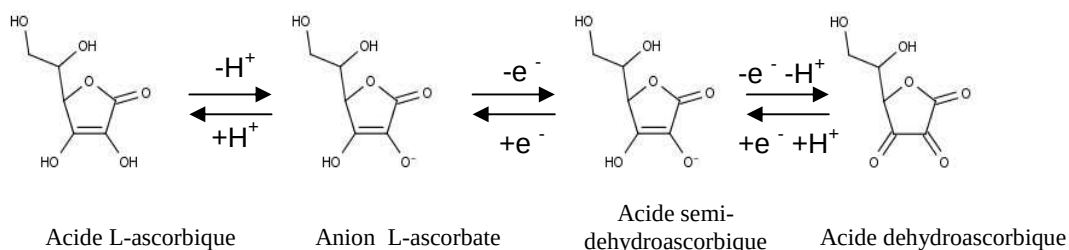


Figure 2 : Les différentes formes chimiques dérivant de l'acide L-ascorbique

A concentration optimale (60 micromole/L dans le plasma), teneur assurée par une consommation journalière de 110 mg (équivalent à son apport nutritionnel conseillé), son pouvoir réducteur protège nos tissus de l'ensemble des espèces radicalaires produites en milieux aqueux dans des conditions normales. En s'oxydant elle même, elle protège ainsi un grand nombre de biomolécules. Le glutathion, un autre composant réducteur, est capable de régénérer la vitamine C dans notre organisme. Une baisse de la concentration de vitamine C dans l'organisme, malgré le maintien des apports à un niveau adéquat, révèle la présence d'un stress oxydant et l'incapacité de l'organisme à faire face à ce stress.

Les apports conseillés (tableau 6) tiennent donc compte de la couverture des besoins en vitamine C dans le cadre de son double rôle, pouvoir antiscorbutique et pouvoir antioxydant. Les besoins en vitamine C sont accrus dans certaines situations pathologiques (fracture, infections, traitement anticancéreux) mais également en fonction des modes de vie (activité physique intense, consommation excessive d'alcool, tabagisme). Par exemple, un supplément de 20% de vitamine C est conseillé chez le fumeur de plus de 10 cigarettes par jour pour contrecarrer le stress oxydant lié au tabac.

Tableau 6 : Apports nutritionnels conseillés en vitamine C pour la population Française (Martin et al., 2001).

Catégories	Vit C (mg.j ⁻¹)
Nourrissons	50
Enfants	60-100
Adolescents	110
Adultes	110
Fumeurs	120
Femmes enceintes	120
Femmes allaitantes	130
Personnes âgées	120

Tableau 7 : Sources alimentaires de vitamine C (Feinberg *et al.*, 1995).

Fruits et légumes crus	
Produits	mg/100 g
cassis, persil frais, poivron rouge	160-200
poivron vert, radis noir	100-150
kiwi, poivron vert	70-100
fraise, litchi, cresson, ciboulette fraîche	60-70
orange et jus frais, citron, chou fleur, chou rouge	50-60
oseille, mangue, groseille, citron vert, clémentine, mandarine, épinard	40-50
pamplemousse et jus frais, mâche, jus de citron ou citron vert frais, laitue, cerfeuil, ail, mûre noire	30-40
melon, fruit de la passion, nectarine, mûre, framboise, myrtille, jus d'orange ou de pamplemousse à base de concentré, jus de citron pasteurisé, radis, courgette	20-30
Aliments cuits	
Produits	mg/100 g
poivron rouge	100-150
poivron vert	70-100
chou de Bruxelles, brocoli, ris de veau	50-60
chou fleur, chou rouge, oseille, soupe aux légumes	30-40
chou vert, ratatouille niçoise, foie de veau, foie de génisse	20-30

La vitamine C est présente dans tous les végétaux mais à des quantités variables. Les principales sources de vitamine C (tableau 7) sont les fruits (agrumes, fruits rouges) et les légumes. Pour assurer la couverture des besoins quotidiens en vitamine C, il est recommandé de consommer environ 500 g de fruits et légumes par jour.

2.2.2 Vitamine E

Le terme vitamine E désigne un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérols (α , β , γ , δ) ou tocols. Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique. C'est l' α -tocophérol qui est biologiquement le plus efficace. La vitamine E se répartit dans les différentes lipoprotéines plasmatiques.

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein de la membrane biologique riche en acides gras polyinsaturés où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les ERO.

Au cours de ces réactions, la vitamine E passe à un stade radicalaire en devenant le radical tocophéryle. Ce dernier est pris en charge par d'autres antioxydants, dont plus particulièrement la vitamine C, qui le régénère en vitamine E.

La vitamine E (α -tocophérol) est un antioxydant majeur qui réagit avec les radicaux peroxydes des acides gras en empêchant la formation des nouveaux radicaux libres, ce qui arrête la réaction en chaîne ; comme les autres antioxydants phénoliques, il opère en cédant un atome d'hydrogène de son groupe hydroxyle au radical peroxyde du lipide.

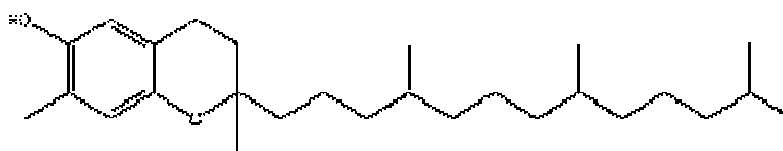
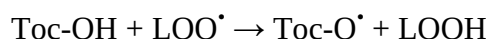


Figure 3 : Structure de α -tocophérol

Au cours du processus de piégeage, l' α -tocophérol (Toc-OH) se transforme en radical tocophéryl stabilisé qui peut, soit piéger un deuxième radical peroxyde (addition ou abstraction d'un atome H d'un groupe Me avec formation ultime d'une *p*-quinone), soit réagir avec un autre antioxydant (ubiquinol, acide ascorbique) et régénérer l' α -tocophérol.



La vitamine E existe sous 8 formes naturelles : 4 tocophérols (α , β , γ , δ) et 4 tocotriénols (α , β , γ , δ). Les tocophérols sont constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 carbones. Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique : les tocotriénols ont 3 doubles liaisons sur leur chaîne latérale. C'est l' α -tocophérol qui est biologiquement le plus efficace. La vitamine E se répartit dans les différentes lipoprotéines plasmatiques.

Les apports nutritionnels conseillés en vitamine E sont donnés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Apports nutritionnels conseillés en vitamine E pour la population Française (Martin et al., 2001)

Catégories	Vitamine E (mg.j ⁻¹)
Nourrissons	4
Enfants	10
Adolescents	12
adultes	12
Femmes enceintes (3 ^e trimestre)	12
Femmes allaitantes	12
Personnes âgées de plus de 75 ans	20-50

Les principales sources de vitamine E sont d'origine végétale (Tableau 9) : l'huile de tournesol, d'olive, d'arachide, de colza, le maïs, le germe de blé, les noix, les patates douces, les avocats, la margarine, le beurre allégé... Les légumes verts en contiennent en faibles quantités.

On en trouve également dans les fractions lipidiques de certains produits d'origine animale : foie, œufs, matière grasse du lait.

Tableau 9 : Sources alimentaires de vitamine E (Feinberg *et al.*, 1995)

Aliment	Teneur de vitamine E en mg pour 100g	Aliment	Teneur en vitamine E en mg pour 100g
Huile de germe de blé	133,0	Huile d'olive	5,1
Huile de tournesol	48,7	Mûre	3,5
Germe de blé	27,0	Avocat	3,2
Huile de palme	25,6	Asperge	2,5
Margarine	25,0	Epinard	2,0
Noisette et amande sèches	20,0	Persil	1,8
Huile de colza	18,4	Beurre	1,5
Germe de maïs et d'orge	15,0	Cervelle	1,2
Huile d'arachide	13,0	Œuf et fromage	1,0
Soja	11,0	Crème fraîche	3,5
Soja sec	8,5	Tomate et chou	1,0
Arachide fraîche	8,1	Cassis	1,0
Thon	6,3	Farine de blé complète	1,0

2.3 Interrelation vitaminique

L'acide ascorbique et ses dérivés intervenant en tant qu'antioxydants exercent, en plus de leur action propre, un effet de synergie à l'égard des tocophérols, dans les aliments comme dans l'organisme, en contribuant à la régénération du radical tocophéroxyl. C'est un exemple d'interrelation vitaminique, où la vitamine C en phase aqueuse régénère la vitamine E en phase lipidique.

2.4 Les caroténoïdes

Le β -carotène (provitamine A) et les autres caroténoïdes présents dans de nombreux fruits et végétaux ont des propriétés antioxydantes. Etant lipophiles, ils pénètrent dans les lipoprotéines du plasma. Ils sont capables de bloquer l'apparition et le développement des radicaux libres, mais leur principale vertu est de supprimer l'oxygène singulet (l'énergie de l'oxygène singulet est utilisée pour convertir la forme *trans* du β -carotène en forme *cis*, et inversement). Les caroténoïdes sont un vaste ensemble de pigments naturels largement répandus dans les plantes, où ils sont des accessoires de photosynthèse et fournissent une protection contre l'oxydation ; environ 600 d'entre eux ont été identifiés dans les légumes et fruits consommés par l'homme, dont 10% métabolisables en vitamine A par diverses espèces animales ; une cinquantaine entrent couramment (mais à faible doses) dans l'alimentation humaine et une trentaine ont été repérés dans le sang et les tissus. Ils n'ont pas le même pouvoir antioxydant, car les activités de ces molécules ne sont pas identiques (Dacosta, 2003).

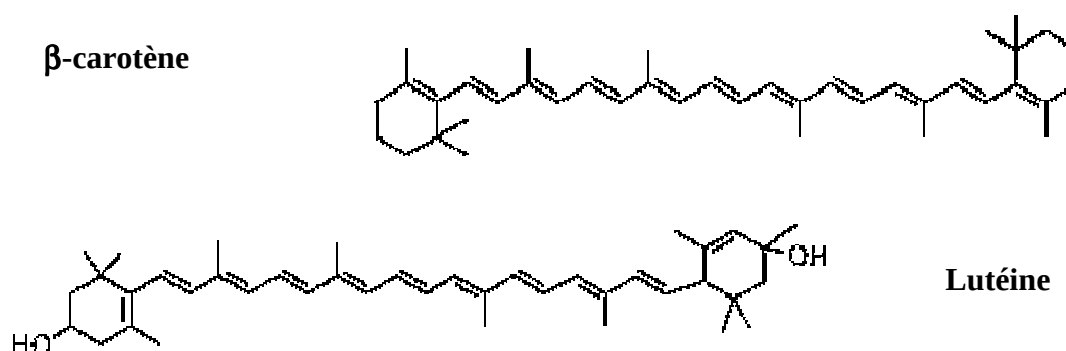


Figure 4 : Structure du β -carotène et de la lutéine

Les principaux caroténoïdes pro-vitaminique A de notre alimentation sont l'alpha, le beta-carotène et la beta-cryptoxanthine. Le clivage central de ces caroténoïdes est réalisé majoritairement par la beta-beta carotène 15,15 monooxygénase.

Les caroténoïdes, grâce à leurs longues chaînes polyinsaturés, sont de bons piègeurs de radicaux libres, mais leur pouvoir réducteur (antioxydant) est beaucoup moins évident, puisqu'ils ne portent pas de groupement réducteur et ne sont pas des donneurs d'électrons. A propos des caroténoïdes, le terme d'antioxydant ne paraît donc pas approprié ; on devrait plutôt parler de pouvoir anti-radicalaire (Faure *et al.*, 1999).

3 Antioxydants alimentaires non essentiels : piègeurs de radicaux

3.1 Ensemble des microconstituants bioactifs

La découverte d'un groupe de nutriments ayant des effets protecteurs contre l'oxydation des cellules a été un thème de recherche important de ces 10 dernières années. Ces composés naturels donnent leur couleur aux fruits et aux légumes et agissent en antioxydants dans l'organisme en évacuant les radicaux libres impliqués dans de nombreuses maladies dégénératives. Flavonoïdes phénoliques, lycopène, caroténoïdes et glucosinolates sont les antioxydants naturels les plus étudiés.

La figure 5 représente une classification de ces microconstituants bioactifs.

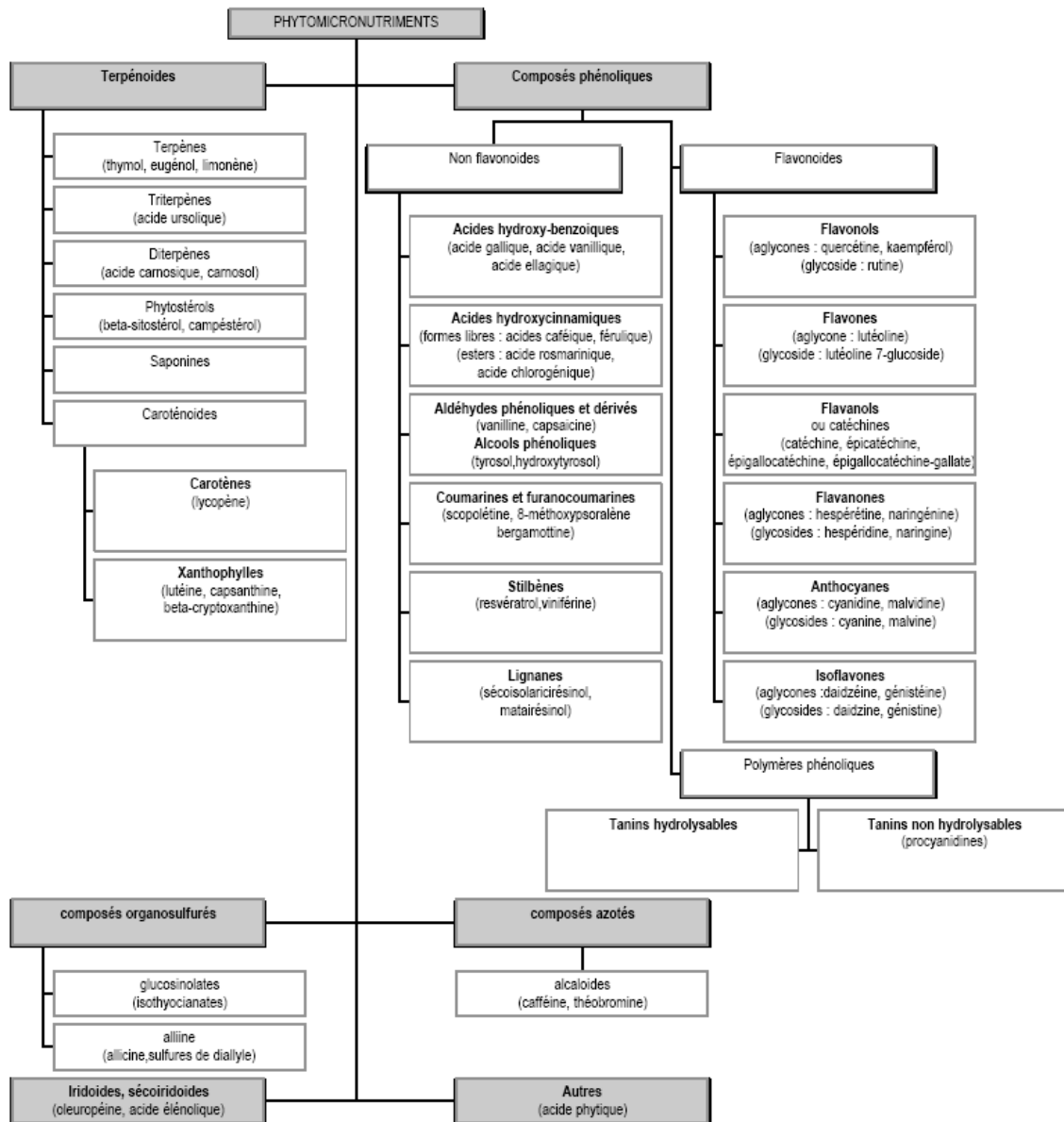


Figure 5 : Classification de l'ensemble des microconstituants bioactifs antioxydants selon Amiot-Carlin et al, 2008

3.2 Principales structures phénoliques

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La désignation « polyphénols » est consacrée par l'usage et, alors qu'elle ne devrait concerner que les molécules portant plusieurs hydroxyles phénoliques dans la molécule, elle est très fréquemment utilisée pour désigner l'ensemble de ces composés (Macheix *et al.*, 2006).

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques). La figure 6 représente la structure du phénol le plus simple.

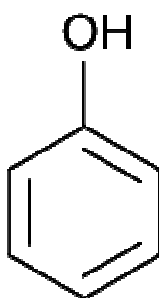


Figure 6 : Structure du phénol le plus simple des composés phénoliques

Le tableau 10 représente les principales classes de composés phénoliques.

Les principales familles de polyphénols présents dans les aliments sont les flavonoïdes et les acides phénoliques.

Tableau 10 : Principales classes de composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemples	Origine (exemples)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydro-benzoïques	<i>p</i>-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques Coumarine	Acide caféique Scopolétine	Pomme de terre, pomme, Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Isoflavonoides	Quercétine, Cyanidine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyau
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés		Raisin, kaki

3.3 Cas des flavonoïdes

De structure générale C₁₅ (C₆-C₃-C₆), il comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes.

La figure 7 représente le squelette de base d'un flavonoïde avec la numérotation classique des différents sommets des cycles et la figure 8 représente 4 exemples de flavonoïdes spécifiques.

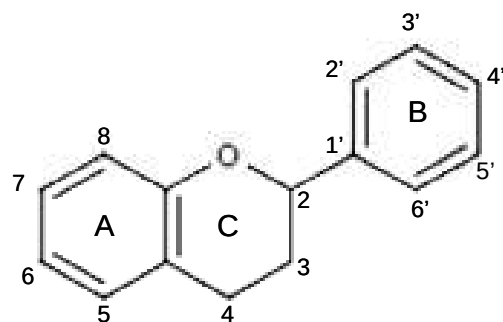
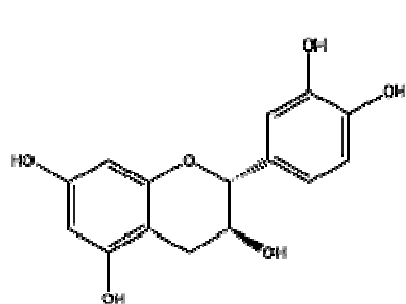
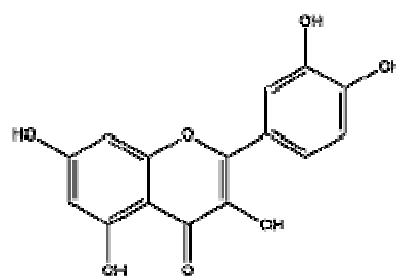


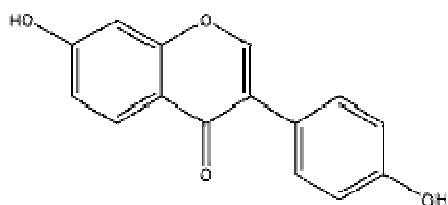
Figure 7 : Structure de base d'un flavonoïde



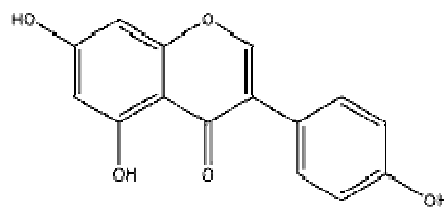
Catéchine



Quercétine



Daidzeine



Genisteine

Figure 8 : Exemple de structures de quelques composés phénoliques

3.4 Propriétés des polyphénols

- Complexation métallique

- Les polyphénols présentant un noyau catéchol où 2 groupements C=O et OH coplanaires et proches (flavonols, 5hydroxyflavones...) forment des chélates avec les ions métalliques à forte charge positive (ex : Fe^{3+}) moyennant le remplacement d'un ou deux protons du polyphénol par l'ion métallique. La complexation métallique joue un rôle important dans les propriétés antioxydantes des polyphénols. En effet, une voie majeure de production des ERO consiste en la réduction du dioxygène par Fe(II) ou Cu(I) complexes labiles en faible concentration) avec formation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène et en la production de radicaux par coupure réductrice d'hydroperoxydes par ces mêmes ions (réactions de type Fenton). La formation de complexes métalliques stables et inertes (bloquant l'ion métallique sous un état redox donné) constitue un mécanisme potentiel d'action antioxydante. Pour ce qui concerne les flavonoïdes, il semblerait que l'importance de ce mécanisme dépende étroitement de la cible à protéger.
- Sur un plan nutritionnel, la complexation des ions du fer par les polyphénols place le fer sous une forme non biodisponible (complexes non absorbables dans le tractus digestif. Il s'agit donc d'un effet antinutritionnel, particulièrement significatif pour les populations des pays en voie de développement dont l'alimentation est relativement pauvre en fer (Dangles, 2006).

- Complexation moléculaire

Le noyau phénolique est une unité structurale très favorable à l'interaction avec les protéines compte-tenu de la variété des interactions moléculaires qu'il peut développer : interaction de dispersion avec des résidus d'acides aminés peu polaires, liaisons hydrogène avec des résidus polaires et des groupements peptidiques voire, à l'état d'ion phénate, interactions coulombiennes avec des résidus cationiques. Les polyphénols inhibent *in vitro* un grand nombre d'enzymes. Bien sûr la signification physiologique de ces phénomènes d'inhibition enzymatique est étroitement dépendante des études de biodisponibilité dans les objectifs sont des préciser l'absorption intestinale, le métabolisme, l'entrée dans la circulation sanguine, le transport, la délivrance sur certains sites spécifiques et l'élimination des polyphénols ingérés (Scalbert & Williamson, 2000). Il s'agirait notamment de vérifier que l'interaction des formes biodisponibles (formes conjuguées) avec la protéine-cible persiste aux concentrations physiologiques. A l'heure où des effets cellulaires spécifiques (et non plus

seulement des effets antioxydants) sont de plus en plus fréquemment évoqués pour expliquer les effets nutritionnels des polyphénols chez l'homme, on peut effectivement s'attendre à ce que certains récepteurs protéiques, voire certaines enzymes, soient prochainement élucidés comme cibles de composants de la fraction polyphénolique absorbée depuis le tractus digestif. Une piste particulièrement intéressante (mécanisme possible d'activité anticancérogène) est l'inhibition par les flavonoïdes de diverses kinases, des enzymes à cofacteur ATP et qui catalysent la phosphorylation de divers substrats. A ce jour cependant, les phénomènes de complexation en amont de l'absorption intestinale (complexation des protéines salivaires) et la complexation de formes circulantes avec certaines protéines du plasma constituent les rares exemples de complexation polyphénols-protéines avérée *in vivo* (Dangles, 2006).

- **Complexation polyphénols polyphénols**

Cette observation implique un empilement de cycles aromatiques que favorisent les interactions de dispersion entre les noyaux aromatiques et l'effet hydrophobe.

La polarisabilité des phénols leur permet de développer de fortes interactions moléculaires de dispersion (composante attractive des interactions de Van der Waals) avec d'autres composés polarisables. Ce phénomène résulte du couplage entre les fluctuations électroniques de 2 molécules voisines. Plus les molécules sont polarisables, plus l'interaction est forte. En outre, plus les surfaces moléculaires en contact sont grandes (ex : 2 composés aromatiques empilés l'un sur l'autre), plus l'interaction est forte. En solution aqueuse, l'interaction du noyau benzénique apolaire du phénol avec une autre entité polarisable telle qu'un second cycle aromatique est grandement favorisée par l'effet hydrophobe. En effet, l'eau est un solvant très peu polarisable en raison de la faible mobilité de ses électrons fortement liés aux noyaux atomiques. Ainsi, l'interaction des molécules d'eau de solvation avec le noyau benzénique apolaire est très faible (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006).

Chapitre 3 : Source et consommation des différents antioxydants alimentaires non essentiels

La multiplicité des espèces végétales comestibles et des phytonutriments bioactifs qu'elles peuvent héberger (à eux seuls, les polyphénols sont plus de 8000) font qu'il est aujourd'hui impossible d'établir dans ce domaine un recensement encyclopédique, sans compter qu'à l'intérieur d'une même espèce et pour une même partie des plantes les teneurs diffèrent suivant les variétés, les conditions de culture, le climat, le niveau de maturité. En outre, les diverses méthodes de mesure ne donnent pas toujours des résultats identiques.

On ne peut donc disposer que de données partielles, issues de travaux particuliers, ou de synthèses bibliographiques qui réunissent des données issues de plusieurs auteurs, et il est clair que les plantes ou les phytonutriments dont on parle le plus, pour des raisons variées, ont été à l'origine de plus de travaux que les autres (Renard *et al.*, 2008).

1 Remarques sur les teneurs publiées

Les quantités de phytonutriments sont rapportées tantôt à 100g (de poids sec ou de poids frais), tantôt au volume dans le cas des liquides (1000 ml, 200ml ou 150ml), les écarts entre les valeurs inférieures et les valeurs supérieures sont considérables.

Les valeurs doivent être regardées avec circonspection. Les diverses informations sont souvent contradictoires et incomplètes. De surcroît, leur comparaison est rendue malaisée par l'absence d'uniformité des méthodes d'analyse des différentes familles de composés (Dacosta, 2003).

Remarques sur les quantités consommées publiées

On ne peut se faire qu'une idée approximative, à cause de nombreuses incertitudes qui pèsent sur les estimations :

- Les enquêtes de consommation prennent rarement en compte séparément tous les légumes et tous les fruits ingérés.
- Encore moins donnent-elles des détails sur les variétés achetées, leur degré de mûrissement, les parties des plantes qui sont mangées et celles qui partent d'emblée dans la boîte à ordures ou sont laissées sur le bord des assiettes (par exemple, que devient la peau des tomates et des pommes ?).

- Les teneurs en phytonutriments de diverses parties des fruits et des légumes sont encore mal connues, en raison de la multiplicité des paramètres et des résultats discordants obtenus par les différentes méthodes de mesure.
- Les phytonutriments représentent plusieurs milliers de molécules et celles-ci peuvent être combinées de manière variée à d'autres composants des plantes.

Si l'on veut se faire une idée des concentrations dans ces végétaux ingérés, il faudrait considérer des facteurs supplémentaires :

- Pour les végétaux consommés crus, la durée et les méthodes de stockage
- Pour ceux consommés cuits, les effets des traitements thermiques et des autres caractéristiques du travail de cuisine.

2 Source et consommation journalière des polyphénols

A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'établir des apports journaliers pour les polyphénols. La consommation de polyphénols est très variable en fonction des habitudes alimentaires et de la quantité des produits consommés (Amiot-Carlin *et al.*, 2007).

En 1976, Kuhnau publiait que la consommation de polyphénols aux Etats-Unis était d'environ 1g.j^{-1} (Kuhnau, 1976). Cette valeur fait encore référence, même si des données plus précises sont maintenant disponibles pour diverses classes de polyphénols.

Les travaux de Brat *et al.* (2006) ont fait le point sur la teneur en polyphénols totaux des fruits et légumes frais présents dans le commerce en France (Tableau 11), y compris pour certains les gammes de variation. Ils ont croisé ces teneurs avec les données de consommation du panel SECODIP et de l'enquête SU.VI.MAX. En utilisant les données SU.VI.MAX, qui différencient selon le sexe, les fruits apportent en moyenne 117 (femmes) et 88 mg/j (hommes) de polyphénols par jour, et les légumes 21 et 15 mg/j. Le premier contributeur pour les légumes est la pomme de terre, suivie des salades et des oignons, et pour les fruits la pomme suivie de la fraise et du raisin. Ces résultats suggèrent que les fruits et légumes apportent 28% de la consommation journalière en polyphénols. Le café, le thé, le vin, les jus de fruits et les céréales étant les principaux contributeurs de l'apport en polyphénols.

Tableau 11 : Teneurs en polyphénols totaux de fruits et légumes et leur rang dans les apports de la population française rangé par ordre décroissant des concentrations (Brat *et al.*, 2006).

Fruits	Teneur (mg/100g)¹	Rang²	Légumes	Teneur (mg/100g)¹	Rang²
Fraise	263.8	2	Cœur d'artichaut	321.3	5
Lychee	222.3	16	Persil	280.2	12
Raisin	195.5	3	Choux de Bruxelles	257.1	11
Abricot	179.8	7	Echalote	104.1	9
Pomme	179.1	1	Brocoli	98.9	15
Datte	99.3	-	Céleri- branche	84.7	17
Cerise	94.3	11	Oignon	76.1	3
Figue	92.5		Asperge	14.5	23
Poire	69.2	6	Aubergine	65.6	13
Nectarine	72.7	4	Ail	59.4	18
Fruit de la passion	71.8	-	Navet	54.7	16
Mangue	68.1	17	Salade	35.6	2
Pêche	59.3	-	Céleri-rave	39.8	21
Banane	51.5	5	Radis	38.4	14
Ananas	47.2	14	Petits pois	36.7	26
			Pomme de terre	23,1	1

1 : en mg d'équivalent acide gallique pour 100g de produit

2 : rang moyen, calculé à partir des données de consommation du panel SECODIP

- pas mesuré dans le panel.

3 Exemple de polyphénols spécifiques

Les flavonols sont les plus répandus des flavonoïdes et la quercétine est celui qu'on trouve en plus grande quantité, devant le kaempferol et la myricétine. Les plantes spécialement riches en flavonols sont l'oignon, le chou, la laitue, la pomme, le thé. Cependant, ils sont essentiellement concentrés dans les parties extérieures de la plante. Ainsi, bien que les épidermes de pommes contiennent 1mg de quercétine par g de fruit frais, il ne reste presque plus de flavonols dans le fruit épluché. Même remarque pour les grains de blé.

Tableau 12: Exemples de teneurs en flavonoïdes (mg/kg ou mg/l) de divers aliments ou boissons (King & Young, 1999).

Classes et sous-classes Flavonoïdes	Aliments ou boissons	Concentration (mg/kg ou mg/l)
Flavonols : Quercétine, kaempferol, myricétine	Olives	270-830
	Oignon	347
	Chou	321
	Laitue	308
	Airelle	249
	Tomate-cerise	17-203
	Brocoli	102
	Pomme	21-72
	Haricots verts ou jaunes	49
	Navet	48
	Endive	46
	Thé (feuilles vertes)	30-45 g/kg poids sec
	Jus de pomme	6-52
	Thé noir (boisson)	20
Flavones : Apigénine, lutéoline	Céleri	130
	Olives	6 à 29
Flavanols : Catéchine, épicatechine	Poire	70-420
	Vin rouge	274
	Vin blanc	35
	Thé (feuilles vertes)	128-226 g/kg poids sec
	Pomme	23-30
Isoflavones : Génistéine, daidzeine	Graines de soja mûres et sèches	888-2407
	Noix de soja	1437-2363
	Farine de soja	1036-1778
	Tofu	280-499
	Miso	256-540
	Jus de soja	105-251
	Sauce soja	13-23

Les flavanols (catéchine, épicatechine et leurs dérivés) existent en grande quantité dans le thé (où les flavonoïdes représenteraient au total 30% du poids sec) ; sous la forme de tanins condensés ils abondent également dans les parties extérieures des fruits (en particulier du raisin), des légumes et des graines, d'où leur présence dans le vin rouge.

La consommation de soja dans les pays asiatiques est de l'ordre de 10 à 35 g.j⁻¹, ce qui équivaut à un apport de 25-40 mg d'isoflavones, avec un maximum de 100 mg.j⁻¹.

Les américains et les européens qui mangent peu de soja, n'ingèrent que quelques mg d'isoflavones par jour. Cependant, l'incorporation de quantités croissantes d'extraits de soja dans les aliments industriels pourrait augmenter significativement l'apport d'isoflavones (Manach *et al.*, 2006).

Tableau 13 : Teneurs (en mg) de divers flavonoïdes dans des doses usuelles d'aliments et de boisson (Scalbert & Williamson, 2000).

Produit et dose	Acide Phénoliques	Flavonols	Catéchines monomère	Proanthocyanidines	Flavanones	Anthocyanidine
Pomme de terre, 200g	28					
Tomate, 100g	8	0,5				
Laitue, 100g	8	1				
Oignon, 20g		7				
Fruits						
Pomme, 200g	11	7	21	200		
Cerise, 50g	37	1	3	35		200
Autres aliments						
Son de blé, 10g	50					
Chocolat noir, 20g			16	86		
Boissons						
Jus d'orange, 100ml					22	
Vin rouge, 125ml	12	2	34	45		4
Café, 200ml	150					
Thé noir, 200ml		8	130			

En conclusion, la consommation moyenne individuelle des phytonutriments phénoliques dans les différents pays demeure mal connue, car on ne possède que des évaluations partielles et parfois contradictoires. C'est là un vaste champ d'étude qui devra

continuer à être exploré, en espérant que les méthodes d'analyse seront perfectionnées (afin d'englober toutes les catégories de molécules) et unifiées (de manière à permettre des comparaisons valables).

4 Caroténoïdes

Les caroténoïdes peuvent être divisés en deux classes, d'une part ceux qui sont provitamines A (α et β -carotènes). Il est d'usage de conseiller qu'environ 60% de l'apport en vitamine A proviennent des caroténoïdes, les apports journaliers recommandés en vitamine A étant de 900-700 μg d'équivalent rétinol par jour. Les fruits et légumes contribuent à hauteur de 38% à ces AJR. Ils sont apportés essentiellement par les fruits et légumes de couleur orange et les légumes feuilles. D'autre part il existe des caroténoïdes qui sont non provitaminiques A, telle la lutéine ou le lycopène. Bien que des effets nutritionnels aient pu leur être attribués, beaucoup moins de données sont disponibles sur leurs apports. Leurs concentrations les plus élevées sont trouvées dans les légumes feuilles (lutéine), ou la tomate (lycopène). Il apparaît que les légumes verts à feuilles font partie des aliments contenant le plus de caroténoïdes, le cresson étant le plus riche. En effet, celui-ci est, avec le persil et les épinards, une source importante de β -carotène et de lutéine. La tomate et ses dérivés sont des sources importantes en lycopène.

Il existe de nombreuses sources de données quantitatives sur les teneurs en caroténoïdes des fruits et légumes, avec les difficultés habituelles liées à la qualité des méthodes de dosage, et en particulier des méthodes d'extraction à partir du produit initial, à la multiplicité des molécules, leurs oxydations et isomérisations, à l'imprécision de l'échantillonnage.

Les données sont particulièrement détaillées dans le cas de la tomate et ses nombreux mutants de couleur.

5 Glucosinolates

Les glucosinolates sont présents dans les diverses crucifères alimentaires, donc essentiellement brocolis, les choux, choux fleurs, les choux frisés ou de bruxelles radis, et moutarde (Tableau 14). Ils sont présents dans l'ensemble de la plante, avec des concentrations variables, mais sont particulièrement concentrés dans les graines (West *et al.*, 2004). Il existe un effet variétal : ainsi les choux « décoratifs » ont des concentrations plus élevées que les choux alimentaires, mais dans le cas des glucosinolates les effets éco physiologiques semblent

particulièrement marqués. Récemment, il a été estimé que la consommation de ces végétaux type crucifère était de 11,3 g/jour en Espagne (cohorte espagnole nichée dans l'étude multicentrique EPIC « European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition ». Cette consommation représente 5% de la consommation totale de légumes et correspond à 6,5mg de glucosinolates. Aucune estimation de la consommation française n'existe. On peut supposer que la consommation française soit proche de cette valeur, laquelle est peu élevée comparée à celle des pays de l'Europe du Nord, de du Nord et de plusieurs pays d'Asie (Amiot-Carlin *et al.*, 2007).

Tableau 14 : Quelques exemples de teneurs en glucosinolates (en mmole / kg ms), d'après Mithen (2000)

	Glucosinolates aliphatiques	Glucosinolates Aromatiques	Glucosinolates indoliques
Choux fleur	0,7		1,1
Brocoli	13,5		3,2
Brocoli *	3,0 – 31,4		0,4-6,2
Choux de bruxelles	28,3	0,3	6,6
Chou rouge	6,2		10,4
Chou blanc 3	11,5		3,9
Choux chinois	0	0,5	2,9
Rutabaga	3,0	3,4	2,3
Radis	0,4	4,9	1,0
Raifort	0,2	9,6	0,7

*: Jeffery *et al.*, 2003.

6 Phytostérols

Les aliments distributeurs de l'apport en phytostérols sont : les céréales complètes et le pain complet, les huiles végétales, les légumineuses, le maïs, les fruits secs et les brocolis. Les légumes de type crucifère représentant jusqu'à 20% de la consommation. En France, l'élaboration d'une table de composition est en cours. (Amiot-Carlin *et al.*, 2007). Dans une étude récente, la consommation en Espagne a été estimée à 276 mg/jour et le phytostérol majoritairement ingéré est le β -sitostérol (79,7%) (Jimenez-Escrig *et al.*, 2006). Cette consommation est similaire à celle de la Finlande et des Pays –Bas. Dans les enquêtes alimentaires réalisées à Marseille dans le cadre d'une étude clinique, la consommation varie de 65mg/jour à 270 mg/jour avec une moyenne de 173 mg/jour (Amiot-Carlin *et al.*, 2007).

Chapitre 4 : Variabilités des qualités nutritionnelles des antioxydants alimentaires

1 Principaux facteurs de variation

Les végétaux présentent une grande diversité de composition et de teneur en phytonutriments. Cette diversité dépend des caractéristiques propres de chaque espèce ainsi que des variations liées à de nombreux facteurs. Ces variations peuvent être dues à des facteurs d'ordre biologique : physiologique, génétique voire agronomique ou environnemental, de même elles peuvent être liées à leur mode de conservation et à leur transformation.

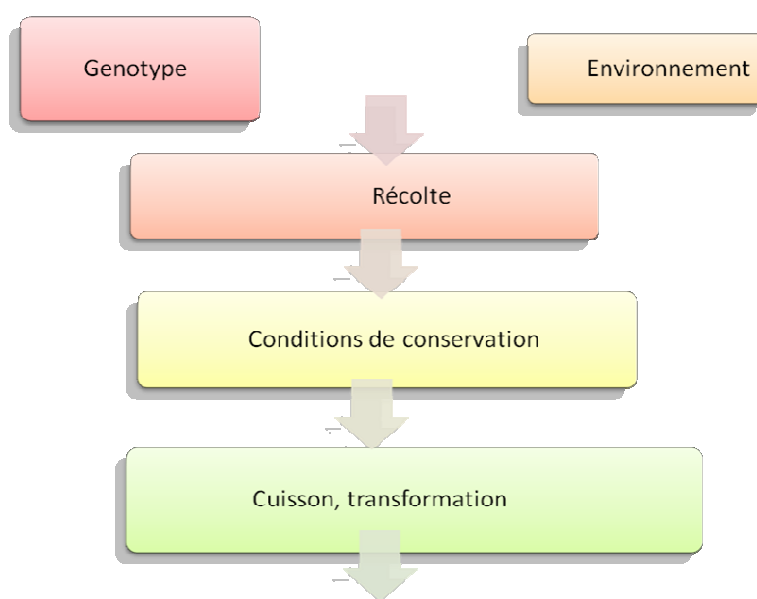


Figure 9 : Différents facteurs de variabilités de la teneur en microconstituants

L'objectif ici est d'aborder les facteurs de variation des microconstituants. Ceux-ci ont été étudiés de manière assez large cependant la majeure partie des données concerne un petit nombre de fruits et de légumes comme la tomate et la pomme.

2 Sources de variation biologique d'ordre physiologique et génétique

2.1 Variations physiologiques

La teneur de la plupart des composés évolue au cours du développement des organes végétaux. Certains s'accumulent précocement puis ont tendance à disparaître à la maturation, tandis que d'autres vont s'accumuler au cours du développement. Par exemple, les caroténoïdes, associés à des pigments colorés, comme le lycopène ou les bêta-carotènes ont tendance à s'accumuler au cours de la maturation des fruits, notamment de la tomate, du melon et de l'abricot (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007). Ceci se passe souvent au détriment des pigments présents dans les chloroplastes dont les teneurs diminuent au cours de la maturation. C'est le cas aussi des teneurs en lutéine et néoxanthine qui diminuent avec la maturation des fruits tandis que le bêta-carotène, la violaxanthine, la capsantine et la capsorubine augmentent. Dans certains autres fruits comme la pomme, la teneur en caroténoïdes dans la peau diminue au cours du développement du fruit, puis augmente à nouveau à la fin de la maturation (Reay, 1998). Enfin, nous pouvons noter que dans le cas de la pomme, la concentration en flavonoïdes décroît fortement au cours du développement du fruit (Renard *et al.*, 2007). Chez le chou, la teneur en glucosinolate augmente avec l'âge des feuilles (Velasco *et al.*, 2007).

Beaucoup de métabolites secondaires ont un rôle antioxydant protecteur pour les végétaux contre les agressions de l'environnement (température, lumière) ou celle de pathogènes. On les trouve donc plutôt en grande quantité dans la peau des fruits ou dans les feuilles externes des légumes à feuilles. Par exemple, les teneurs des phénols totaux ou des fibres sont systématiquement plus grandes dans la peau que dans la chair des pommes, poires, et pêche (teneurs variant du simple au double) (Gorinstein *et al.*, 2002). Dans la tomate, le lycopène et les polyphénols s'accumulent majoritairement dans la peau comme la vitamine C (Davies & Hobson, 1981). Chez la laitue, les niveaux de quercétine varient de 19 à 152 µg/g de matière fraîche dans les feuilles internes et de 417 à 2482 µg dans les feuilles

externes très exposées à la lumière. Le même type de différence se retrouve sur le chou pour les teneurs en lutéine.

En général, le pouvoir antioxydant est fortement corrélé à la concentration en composés phénoliques (Hanson *et al.*, 2004) mais cette relation est trouvée non significative chez l'abricot et même négative chez la fraise (Scalzo *et al.*, 2005). On trouve par contre une relation négative entre taille des fruits et teneur en matière sèche et par conséquent teneur en composés bioactifs et taille du fruit. Une relation entre l'ensemble de ces variations et la qualité organoleptique des fruits et des légumes peut être établie. En effet la couleur est corrélée avec la présence de certains métabolites comme les caroténoïdes et les anthocyanes.

2.2 Variations génétiques

De nombreuses études ont montré que la gamme de variations au sein d'une même espèce peut être très importante (du simple au double voire beaucoup plus). Ainsi, chez le brocoli, les teneurs en bêta-carotènes peuvent varier jusqu'à 6 fois tandis que la teneur en glucosinolates varie de 20 fois (Jeffery *et al.*, 2003). Chez la laitue, certaines variétés sont pauvres en flavonoïdes, d'autres contiennent de grandes quantités de flavonols et d'anthocyanes. Les variations de composition en caroténoïdes sont directement liées aux différences de couleur de certains fruits : seules les tomates rouges accumulent du lycopène alors que les tomates oranges ou jaunes ont des compositions différentes. Les piments jaunes n'accumulent pas de capsantine ou de capsorubine, contrairement aux rouges.

Il est important de noter que la sélection pour une plus grande productivité n'a pas systématiquement réduit la valeur nutritionnelle des fruits et des légumes. En effet, la comparaison de variétés anciennes et récemment développées ne donne pas de résultats très significatifs. Pour la tomate, les teneurs en Vitamine C et en caroténoïdes sont identiques entre les anciennes variétés et les nouvelles.

3 Sources de variations biologiques d'ordre agronomique et environnemental

La teneur en composés bioactifs de la plupart des fruits et légumes peut varier en raison des conditions environnementales (température, rayonnement,...) des modes de culture (greffe, fertilisation,...) ou plus largement des modes de production. (Plein champ, hors

sol,...). Les travaux dans le domaine des techniques culturales sont assez nombreux et particulièrement riches sur la tomate.

3.1 Effet des facteurs de l'environnement

Chez certains légumes, le rayonnement et la température jouent un rôle marqué. L'intensité du rayonnement a une influence prouvée sur le métabolisme des flavonoïdes (Schreiner, 2005). Par exemple, les légumes exposés à la lumière solaire contiennent davantage de flavonoïdes que les légumes cultivés sous ombrage. Le contenu en glucosinolates des brocolis et des choux fleurs est fortement influencé par la température, et à un moindre degré, par le rayonnement reçu par la plante au cours de son développement.

L'apport en eau jouerait un grand rôle dans la teneur en composés bioactifs – ainsi une réduction en eau serait accompagnée d'une augmentation de la teneur en matière active et donc de micronutriment (Veit-Kohler *et al.*, 1999).

La région de culture pourrait avoir un effet par la combinaison des facteurs environnementaux et leurs interactions. Ainsi, ont pu être mises en évidence des variations de teneur en polyphénols et en caroténoïdes sur les abricotiers de différentes régions de Croatie (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007). Enfin, les années de culture et de récolte induisent des écarts importants en particulier sur les teneurs en composés phénoliques sur la pomme par exemple (Lata, 2007).

3.2 Effet des techniques et modes de culture au sens large

La fertilisation et l'irrigation pris individuellement ou en interaction sont deux techniques culturales qui ont été étudiées comme facteur de variation des microconstituants végétaux. On considère ainsi la fertilisation classique N, P, K et les apports spécifiques en minéraux comme le Sélénium. L'apport de phosphore par exemple à des plants de tomates hors sol n'a pas d'effet notable sur le contenu en composés divers (lycopène, carotènes,...). Une fertilisation spécifique peut être utilisée pour augmenter la teneur en composés bioactifs de produits récoltés. C'est ainsi que l'on peut enrichir les feuilles de choux de l'espèce du genre Brassica en sélénium – agent protecteur contre certains cancers – par une fertilisation adaptée riche en sélénium. Cette pratique pose de nombreuses questions en particulier de biodisponibilité de ces quantités accrues, ainsi que d'interactions avec d'autres microconstituants qui peuvent entrer en compétition (Finley, 2005).

La charge en fruits des arbres fruitiers est connue comme pouvant modifier la teneur en polyphénols totaux chez le pommier, associée à une apparence plus attractive et à une meilleure qualité organoleptique des fruits des arbres les moins chargés (Stopar *et al.*, 2002). Enfin, le chauffage en serres et le type de tunnels (couverture) utilisés sont aussi des facteurs potentiels de variations. Ainsi, un chauffage de +1°C par rapport à la température ambiante de la tomate cultivée en serres, diminue significativement la teneur en vitamine C, lycopène et β carotènes (Zhao *et al.*, 2007). Les effets des modes de culture traditionnels plein champs comparés aux cultures hors sol ont été peu étudiés. Cependant, il apparaît dans les études rigoureuses (même variété, même localisation) globalement peu de différences de teneurs en micronutriments.

En conclusion, les gammes de variations d'origine climatique ou agronomique apparaissent finalement bien moins importantes en amplitude que les variations d'ordre génétique. De plus il peut exister des interactions entre ces facteurs.

4 Variations dans la conservation et la transformation

Les fruits et légumes se répartissent en fonction des modes de conservation en 5 gammes :

- La 1^{ère} gamme ou 1^{ère} gamme améliorée : les produits frais, éventuellement avec des produits « parés »,
- La 2^{ème} gamme : les produits stérilisés,
- La 3^{ème} gamme : les produits surgelés,
- La 4^{ème} gamme : les produits frais prédécoupés (« fresh-cut »),
- La 5^{ème} gamme : les produits cuits sous vide (pasteurisés puis conservés au froid).

A ces gammes, nous pouvons rajouter une sixième gamme recouvrant l'ensemble des produits déshydratés qu'il s'agisse de procédés traditionnels ou des techniques de déshydratation osmotique ou imprégnation sous vide. De plus, un certain nombre de procédés ne sont pas couverts par cette classification comme les hautes pressions et les champs électriques pulsés. Ces différents procédés sont à coupler avec des modes spécifiques de stockage.

4.1 La conservation du végétal vivant

La conservation des produits frais pose de nombreux problèmes car les moyens pour stabiliser les qualités nutritionnelles restent faibles : atmosphère contrôlée, température, humidité. Ainsi la conservation des composés bioactifs est plus aléatoire en comparaison à des procédés permettant de stabiliser les légumes et les fruits dès leur ramassage. Aussi, la conservation des produits frais voit une décroissance des microconstituants rapidement après leur ramassage. Cette perte peut varier de 10 à 90 % selon les régions du monde et la fragilité du produit.

Cependant des phénomènes inverses peuvent se produire ; par exemple, la teneur en lycopène et caroténoïdes continue à augmenter 3 semaines après récolte chez la tomate (Bergquist *et al.*, 2006). Malgré ces phénomènes, de manière générale, la conservation après récolte entraîne une perte en caroténoïdes. De plus, à la préparation, les pertes peuvent être très importantes par exemple à la friture -50 % et à l'incubation dans une sauce vinaigrette -30 %. Ceci s'accompagne d'une perte aussi importante de vitamines C et de polyphénols totaux (Sahlin *et al.*, 2004). Un élément majeur de transformation des fruits et des légumes : l'épluchage a un impact très important sur la teneur en micronutriments. En effet nombres d'entre eux sont concentrés dans les parties épidermiques des fruits et des légumes. L'épluchage sera un facteur majeur en particulier pour les flavonoïdes et les anthocyanes, mais aussi les caroténoïdes. Dans la pomme, 50 % des polyphénols sont concentrés dans l'épiderme (Guyot *et al.*, 2003). Dans les tomates, la peau et les graines contribuent en moyenne à 53 % des polyphénols totaux dont 52 % des flavonoïdes, 48 % du lycopène, 43 % de l'acide ascorbique (Toor & Savage, 2006).

Compte tenu des transformations que les glucosinolates subissent naturellement dans le fruit ou les légumes, il est très difficile de mesurer de manière fiable ces pertes lors du découpage ou trempage. Cependant, ces molécules sont très hydrosolubles et donc sont en partie éliminées au trempage. De plus, les glucosinolates sont détruites au stockage au froid.

Les polyphénols à l'exception des anthocyanes, sont généralement stables en cours de conservation des fruits et des légumes frais. C'est le cas pour les pommes y compris dans le cadre d'un stockage prolongé (Van der Sluis *et al.*, 2001; MacLean *et al.*, 2006). Ils sont affectés de façon notable dans la transformation en 4^{ème} gamme, ainsi les concentrations en polyphénols augmentant dans les laitues découpées, et diminuent de 15 % dans les inflorescences de brocoli conservés 21 jours à 4°C (Lemoine *et al.*, 2007). L'atmosphère modifiée va aussi influencer cette conservation, comme par exemple dans la pomme 4^{ème}

gamme le brunissement observé en présence d'oxygène accompagne une perte des polyphénols.

4.2 Impact du traitement thermique

Les taux de réduction des différents composés sont éminemment variables selon leur nature chimique et le mode de traitement. En effet, nous pouvons distinguer quatre classes :

- des composés sensibles à la température et à l'oxydation comme les caroténoïdes et la vitamine C,
- des composés hydrosolubles susceptibles d'être perdus par diffusion dans les liquides de cuisson (lavage, blanchiment,..) comme les folates, les glucosinolates, et certains polyphénols...,
- des composés nécessitant une étape de conversion enzymatique comme les glucosinolates, la capsaïcine et l'allicine,
- des composés peu sensibles.

Étant donné les différentes interactions des paramètres : couple température/temps, milieu, mode de traitement ...les données que nous possédons représentent surtout des tendances.

Cependant, les traitements de cuisson mettant peu ou pas les fruits et légumes en contact avec de l'eau de cuisson semblent préférables. En général, c'est la cuisson à la vapeur qui permet une rétention optimale des microconstituants et ceci bien sûr en opposition avec la cuisson à grande eau. En ce qui concerne, les micro-ondes les résultats récents montrent plutôt une bonne rétention concernant les polyphénols. Enfin, la friture entraîne peu de perte par diffusion mais utilise des températures plus élevées pouvant entraîner des dégradations.

Les Caroténoïdes. L'effet du traitement thermique sur les caroténoïdes a été étudié avec des résultats contradictoires. L'évolution des caroténoïdes est très dépendante de la matrice : ainsi la présence d'huile augmente l'isomérisation aux temps de traitements courts (Mayer-Miebach *et al.*, 2005). De plus, les résultats restent difficilement comparables en fonction des différents facteurs : caroténoïdes extractibles ou pas, résultats exprimés en fonction de la matière sèche ou totale, prise en compte de la diffusion dans l'eau ou pas.

Le chauffage prolongé semble favoriser l'isomérisation. De plus, l'oxydation serait favorisée par le contact avec l'air et l'activité de l'eau. Cette oxydation conduit à la rupture des chaînes hydrocarbonées et à des pertes des qualités organoleptiques (couleur). Ce mécanisme serait dépendant du pH du milieu. En ce qui concerne la biodisponibilité, un facteur supplémentaire est la déstructuration de la matrice alimentaire permettant une meilleure diffusion. Il faut donc tenir compte de l'équilibre entre la rétention des caroténoïdes et leur stabilité. Il a été ainsi démontré que le lycopène et le β carotène étaient plus biodisponibles après cuisson (Reboul *et al.*, 2005), et ceci était lié à la fois à la conversion en isomères cis et à une déstructuration des complexes natifs (Rock *et al.*, 1998).

Il existe de nombreuses publications rapportant une augmentation des teneurs en caroténoïdes ou leur stabilité au cours des procédés de fabrication de purées, pulpes et concentrés de tomate, carotte et autres végétaux (Veronica *et al.*, 2002).

Les Polyphénols. Les flavonols ont été les plus étudiés. Pour ces composés généralement concentrés dans les épidermes, l'épluchage est la cause majeure des pertes (Ewald *et al.*, 1999). Au-delà de cet effet, une cuisson par ébullition d'eau entraîne une perte de flavonols de 20 à 40 % respectivement pour l'oignon et les asperges (Makris & Rossiter, 2001). Les pertes en flavonoïdes sont très variables en fonction des légumes, des conditions de cuisson. Ainsi, après un traitement à 121° C des betteraves, les teneurs en polyphénols changent peu avec une augmentation des teneurs mesurées en flavonoïdes, tandis que les haricots montrent une perte de l'ordre de 30 % dès les premières minutes (Jiratanan & Liut, 2004).

Les proanthocyanides sont reconnus pour former une partie importante des polyphénols alimentaires mais ils ont été peu étudiés, les méthodes de dosage étant moins répandues que celles disponibles pour les polyphénols monomères. Ces molécules semblent stables au traitement thermique, d'éventuelles pertes auront lieu surtout en début de cuisson avant l'inactivation des polyphénols oxydases.

Les Glucosinolates. La cuisson en inhibant la myrosinase, empêche la conversion des glucosinolates. Ils ne sont dégradés qu'à partir de 125 °C en formant des isothiocyanates. Cette conversion semble aussi se faire dans le tube digestif humain, puisque des consommateurs de crucifères cuits excrètent des isothiocyanates dans leurs urines. Les différentes méthodes de cuisson conduisent à une perte de glucosinolates par dégradation thermique et diffusion dans les liquides de cuisson, et ceci avec des cinétiques différentes en fonction des différents glucosinolates (Mithen *et al.*, 2000).

4.3 La conservation par le froid

La surgélation permet de conserver fruits et légumes à des températures négatives, trois étapes sont à considérer :

- L'étape préalable d'épluchage et de blanchiment dont les conséquences ont été vues plus haut,
- La congélation proprement dite, bien que les réactions chimiques soient fortement ralenties par ces températures, certains composés peuvent s'altérer au cours du temps et ce d'autant plus que les emballages sont perméables à l'oxygène. De plus la valeur absolue des températures et des fluctuations peuvent avoir un impact.
- La décongélation peut avoir un effet majeur, selon la vitesse de décongélation et la présence ou non d'activité enzymatique résiduelle.

Les caroténoïdes. Les caroténoïdes semblent assez stables dans ces conditions de conservation. Malgré tout, des pertes peuvent être enregistrées après des périodes de stockage de 1 an (cubes ou purée de pastèque congelés avec des pertes de 30-40 % après 1 an à -20°C) (Fish & Davis, 2003).

Les Polyphénols. De même, les polyphénols sont stables à la congélation (par exemple dans le cas du jus de framboise) par contre la durée de stockage peut avoir un impact sur la baisse de ces composés (Jiratanan & Liut, 2004).

Les Glucosinolates. La congélation en l'absence d'inactivation des myrosinases conduit à la disparition quasi-totale lors de la décongélation. Un blanchiment préalable est donc indispensable.

En conclusion, les étapes clefs dans la transformation des fruits et légumes restent l'épluchage et le stockage. L'épluchage car nombre de constituants ont des répartitions spécifiques, avec des concentrations accrues dans les parties externes en lien avec leurs fonctions de protection. L'étape de stockage n'est pas neutre, et ce particulièrement pour la première et la quatrième gamme. La stabilisation effectuée dans les premières heures après récolte permet d'apporter aux consommateurs des teneurs en micronutriments plus élevées. On peut ainsi résumer avec quelques règles générales en fonction des composés :

- Les molécules solubles et très réactives comme les glucosinolates vont subir en général des pertes importantes lors de ces étapes
- Les polyphénols sont susceptibles d'être oxydés notamment dans la destruction tissulaire et avant inactivation enzymatique. Il semble cependant qu'ils soient relativement stables à l'exception des anthocyanes.
- Les caroténoïdes sont liposolubles et leur chauffage prolongé provoque une cis-isomérisation influençant favorablement la biodisponibilité de ces molécules.

Il reste encore de nombreuses inconnues sur l'évolution de ces molécules bioactives au cours des transformations. De plus, un point reste à étudier avec l'interaction entre ces composés dans les phases de maturation à la consommation, et entre ces constituants et leur matrice.

Ainsi, le maintien de l'intégrité structurelle des aliments permet de diminuer le contact des produits oxydables avec l'oxygène. Des processus comme l'écrasement, l'extraction et le chauffage modifient les caractéristiques structurales des aliments en libérant les antioxydants qui se trouvent normalement localisés dans les liposomes ou des membranes. Ceci les rend plus sensibles à l'oxydation et aux interactions avec d'autres constituants, mais d'un autre côté ils peuvent gagner en biodisponibilité. Par ailleurs le chauffage peut inactiver les oxydases des aliments. Il est difficile de généraliser l'influence de tel ou tel phénomène physique sur la biodisponibilité des antioxydants, mais il est des cas où des effets favorables sont observés (Nève, 2002). Parmi quelques exemples intéressants : le lycopène est plus biodisponible dans le jus de tomate chaud que froid ; ce même lycopène est plus disponible à partir de pâte de tomate que de tomate fraîche (Gärtner *et al.*, 1997).

La température joue également un rôle important à la fois bénéfique (inactivation des oxydases et dégradation des structures cellulaires conduisant à une augmentation de la biodisponibilité), mais aussi défavorable pour les antioxydants. Elle peut entraîner des dégradations (beaucoup d'antioxydants tels les caroténoïdes, la vitamine E ou la vitamine C sont sensibles à une augmentation de température) ou des isomérisations (par exemple, transformation du *trans* β -carotène en forme *cis*, qui est moins bien résorbée et moins bien transportée dans l'organisme que la forme *trans*). La conservation à basse température (réfrigérateur) a aussi été démontrée comme étant bénéfique pour la conservation de certains

antioxydants, par exemple de la teneur en vitamine C dans les fruits et les légumes frais (Nève, 2002).

Chapitre 5 : Le pouvoir antioxydant des phytonutriments

1 Relation entre structure moléculaire et pouvoir antioxydant : cas des polyphénols

Les principes de relations avec la structure moléculaire ont été énoncé en 1990 (Bors *et al.*, 1990) , les flavonoïdes ne peuvent avoir un pouvoir antioxydant qu'à la condition que leurs molécules possèdent une ou plusieurs des caractéristiques ci-après :

- Dans le noyau B, un groupe ortho-diphénolique (catéchol), c'est-à-dire deux hydroxyles adjacents (en l'occurrence aux positions 3' et 4')
- Dans l'hétérocycle C, une double liaison entre les carbones des positions 2 et 3, ainsi qu'un atome d'oxygène attaché par une double liaison à la position 4
- Des groupes hydroxyles aux positions 3 et 5.

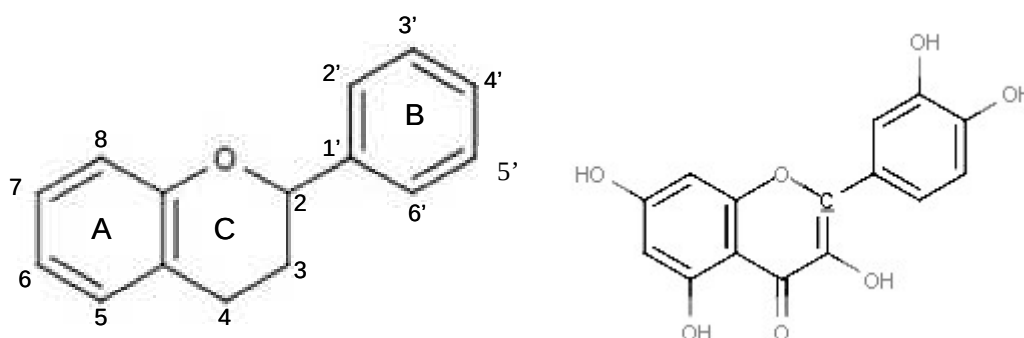
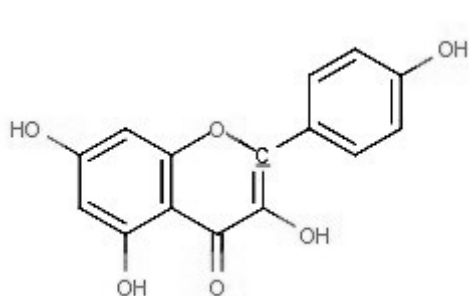


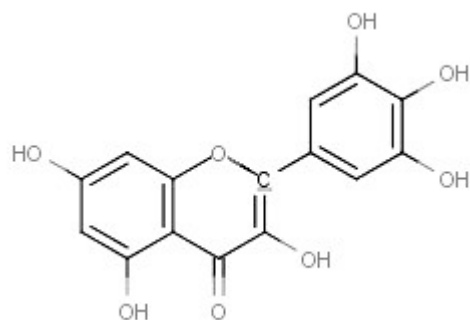
Figure 10 : Structure de base des flavonoïdes et structure de la quercétine

L'explication réside dans le fait que ces structures favorisent la délocalisation d'électrons et, un réducteur est une espèce chimique capable de perdre des électrons.

La quercétine, (tableau 17) qui combine ces trois caractéristiques, a le plus fort pouvoir antioxydant des flavonoïdes, à l'exception du gallate d'épicatéchine et du gallate d'épigallocatechine (ce dernier serait dix fois plus efficace que la vitamine E).



Kaempferol : $1,34 \pm 0,08$ mM Trolox



Myricétine : $3,12 \pm 0,28$ mM Trolox

Figure 11: Structures moléculaires et pouvoirs antioxydant de deux flavonols

La figure 11, montre que la présence dans la myricétine d'un hydroxyle supplémentaire à la position 5' entraîne une baisse d'un tiers du pouvoir antioxydant par rapport à la quercétine.

Tableau 17 : Pouvoirs antioxydants classés selon l'ordre décroissant de divers flavonoides (Rice-Evans *et al.*, 1996)

Flavonoïde	Famille	mM d'équivalents Trolox
Gallate d'épicatéchine	flavanol	4,9
Gallate d'épigallocatechine	flavanol	4,8
Quercétine	flavanol	4,7
Delphinidine	anthocyanidine	4,4
Cyanidine	anthocyanidine	4,4
Epigallocatechine	flavanol	3,8
Myricétine	flavanol	3,1
Morine	flavanol	2,6
Epicatéchine	flavanol	2,5
Catéchine	flavanol	2,4
Rutine	flavanol	2,4
Péonidine	anthocyanidine	2,2
Lutéoline	flavanol	2,1
Malvidine	anthocyanidine	2,1
Taxifoline	flavanol	1,9
Lutéoline-4'-glucoside	flavanol	1,7
Naringénine	flavanol	1,5
Apigenine	flavanol	1,4
Chrysine	flavanol	1,4
Hespérétine	flavanol	1,4
Kaempferol	flavanol	1,3
Pelargonidine	anthocyanidine	1,3
Hespéridine	flavanol	1,1
Lutéoline – 3', 7- diglucoside	flavanol	0,8
Narirutine	flavanol	0,8

Le pouvoir antioxydant dépend d'autres facteurs, parce qu'il est en outre (Rice-Evans *et al.*, 1996):

- corrélé au nombre total de groupes hydroxyles (Kaempferol 1,3 mM trolox / Myricétine 3,1mM trolox),
- moindre avec des glycosides qu'avec leurs correspondants aglycones (Quercétine 4,7 mM trolox /Rutine 2,4 mM trolox).

Il est important de prévenir que tous ces résultats proviennent de mesures réalisées en phase aqueuse. Ils peuvent parfois différer si l'on emploie une autre méthode de mesure du pouvoir antioxydant.

2 Comparaison des pouvoirs antioxydants

Les antioxydants n'exercent pas un effet protecteur identique sur tous les substrats. Par exemple, les antioxydants ont des répercussions différentes sur les lipides alimentaires et sur les tissus biologiques, qui contiennent des lipides sous la forme de phospholipides dans les membranes cellulaires, de triglycérides dans les graisses corporelles et dans les lipoprotéines, avec des pH, des concentrations en oxygène, des catalyseurs d'oxydation qui sont dissemblables. Outre la nature du substrat, nombreux des paramètres qui conditionnent l'activité des antioxydants dans le corps humain : la solubilité, la biodisponibilité, la capacité de rétention dans les tissus, etc.

Aussi en toute rigueur on ne devrait comparer le pouvoir antioxydant de deux substances qu'en le mesurant sur des substrats identiques, dans les mêmes conditions physico-chimiques.

Malgré la difficulté de comparaison, plusieurs auteurs affirment d'une manière globale que, sur la base d'une concentration moléculaire égale, les principaux flavonoïdes antioxydants seraient plus efficaces que la vitamine E, la vitamine C , le β -carotène (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Cependant, le pouvoir antioxydant d'un phytonutriment observé dans les aliments ou in vitro n'implique pas qu'il soit identique in vivo, car il dépend du taux d'absorption et de la nature des produits dérivés du métabolisme.

3 Phénomènes de synergie entre antioxydants

Le fait est bien connu pour l'acide ascorbique, qui régénère la vitamine E. Un phénomène analogue peut se produire pour les phytonutriments : Par exemple la réglisse officinale (*Glycyrrhiza glabra*) contient dans sa racine plusieurs flavonoïdes dont la glabridine est le principal. On a constaté que celle-ci, qui est un isoflavane, après son absorption était associée aux LDL qu'elle protégeait contre l'oxydation en épargnant le β -carotène (Fuhrman & Aviram, 2001). La vitamine E associée aux LDL est moins utilisée par l'organisme, donc économisée, en présence de quercétine, de morine, de fisetine.

Il a été également montré que les flavonoïdes pourraient être substitués à la vitamine E pour lutter contre l'oxydation de l'huile de poisson, et un mélange de quercétine et de vitamine E possède un pouvoir antioxydant supérieur à celui de chacune de ces molécules employée isolément (Nieto *et al.*, 1993).

Un effet synergique entre la vitamine C et la quercétine, en ce sens que ces deux substances conjointes diminuèrent plus l'oxydation de l'ADN des lymphocytes que chacune d'elles ajoutée (Noroozi *et al.*, 1998). On estime que d'autres substances renforcent par synergie les pouvoir antioxydant des tocophérols : les phospholipides, l'acide lactique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide tartrique, l'acide oxalique, l'acide succinique, l'acide gluconique, l'EDTA (acide éthylène diamine-triacétique). Pour tous ces acides, les causes probables sont qu'ils entraînent la chélation des métaux, autrement dit qu'ils forment des complexes inactifs avec les ions métalliques qui catalysent les réactions d'oxydation.

4 Au-delà du pouvoir antiradicalaire

L'action antioxydante des phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, ainsi que la suppression de l'oxygène singulet dans le cas des caroténoïdes ; elle peut aussi se manifester par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques.

La lipoxygénase, enzyme qui existe sous plusieurs formes, catalyse l'insertion de l'oxygène dans les acides gras polyinsaturés. On la trouve dans les tissus végétaux

(notamment les graines de soja), les chairs animales (par exemple de poisson, de bovins etc.), dans l'organisme humain (plaquettes, leucocytes). Elle est inhibée par divers flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont susceptibles d'inhiber d'autres enzymes oxydantes qui jouent un rôle important dans le corps humain :

- La cyclo-oxygénase, enzyme déclenchant la production de prostaglandines et de thromboxanes à partir de certains acides gras polyinsaturés, dont l'acide arachidonique (Peterson & Dwyer, 1998).
- La xanthine-oxydase, présente normalement dans l'organisme sous la forme de xanthine-déshydrogénase, mais apparaissant dans les conditions d'ischémie ; cette enzyme est une source de radicaux libres et suscite des dommages tissulaires, spécialement après une reperfusion destinée à réoxygéner les malades ; son inhibition par la quercétine ou la lutéoline diminue les risques (Nijveldt *et al.*, 2001).

On sait que les ions métalliques (fer, cuivre) catalysent l'oxydation, notamment en générant un radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$ par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Les groupes hydroxyles et carboxyle des polyphénols ont la capacité de former des complexes en liant ces ions, dont ils réduisent ainsi l'absorption, résultat bénéfique à l'égard de l'oxydation, mais susceptible dans certains cas d'être un inconvénient, dans la mesure où il risquerait d'infliger une déficience en fer et en cuivre. Différentes publications ont montré que l'absorption du fer était diminuée par les catéchines du thé vert, les polymères du thé noir et du cacao, les polyphénols du vin, l'acide chlorogénique du café (Fuhrman & Aviram, 2001).

Toutefois quelques études ont révélé que les flavonoïdes pouvaient avoir une activité pro-oxydante, dans des conditions particulières. Ce serait le cas par exemple de la quercétine en présence de l'ion Fe^{3+} et à des hautes concentrations, lesquelles sont physiologiquement improbables.

On considère que les polyphénols, principalement les flavonoïdes, ou du moins certains d'entre eux, inhibent l'oxydation des LDL de quatre façons (Bravo, 1998) :

- En restreignant la formation des radicaux libres
- En préservant la vitamine E de l'oxydation
- En régénérant la vitamine E oxydée
- En chélatant les ions métalliques

Un effet protecteur de quatre flavonoïdes (à des concentrations allant de 1 à 20 μM) a été observé envers l'oxydation de la vitamine E dans les LDL : tous apportèrent une protection, à la fois en préservant et en régénérant la vitamine E : le plus efficace fut la quercétine, devant la myricétine, le kaempferol et la morine. Pour un même flavonoïde, l'action protectrice fut d'autant plus grande que la concentration fut plus élevée (Zhu *et al.*, 2000).

5 Interaction moléculaire pouvant jouer sur le pouvoir antioxydant

Etant donné que les hydroxyles phénoliques sont de bons donneurs de liaisons H et que les systèmes biologiques sont riches en accepteurs de liaisons H (principalement offertes par les protéines, les saccharides et H_2O), les antioxydants phénoliques tendent à former des liaisons d'hydrogènes intermoléculaires avec les molécules environnantes. Tout cela aura pour effet de masquer la capacité antioxydante des molécules (Shen *et al.*, 2007).

Les métabolites des polyphénols ne circulent pas sous forme libre dans le sang. Par exemple, environ 99% de la quercétine est liée à l'albumine dans le plasma humain ce qui rend sa liaison aux LDL négligeable (moins de 0,5%). Une étude a montré que le noyau catéchol de la quercétine liée à l'albumine restait accessible pour des agents oxydants. La quercétine pourrait donc exercer un effet antioxydant même lorsqu'elle est liée à l'albumine (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006).

Les propriétés des polyphénols sont en grande partie imputables à leur capacité d'interagir entre eux et avec d'autres macromolécules, de manière réversible, pour former des systèmes moléculaires organisés. En particulier, ces interactions modulent fortement les propriétés colorantes des pigments polyphénoliques et peuvent participer à la formation de particules colloïdales, de troubles et de précipités. Les interactions des polyphénols avec les protéines et glycoprotéines salivaires sont également à l'origine de la sensation d'astringence caractéristique des tanins. La compréhension et la maîtrise de ces propriétés nécessite donc de caractériser les complexes et les mécanismes d'interaction, depuis l'échelle moléculaire, jusqu'à l'échelle macroscopique.

6 Antioxydants et pro-oxydant

Les antioxydants peuvent, dans certaines conditions, avoir un effet pro-oxydant.

Par exemple, les noyaux phénoliques des antioxydants agissent en neutralisant les radicaux libres des lipides et du peroxyde d'hydrogène, devenant ainsi des radicaux libres phénoxyles qui existent sous trois formes interchangeables (figure 12). Celles-ci normalement restent stables, c'est-à-dire ne provoquent pas de peroxydation ultérieure, bien qu'elles puissent subir diverses réactions (transformation en quinones, polymérisation, etc.) et être régénérés par des agents réducteurs.

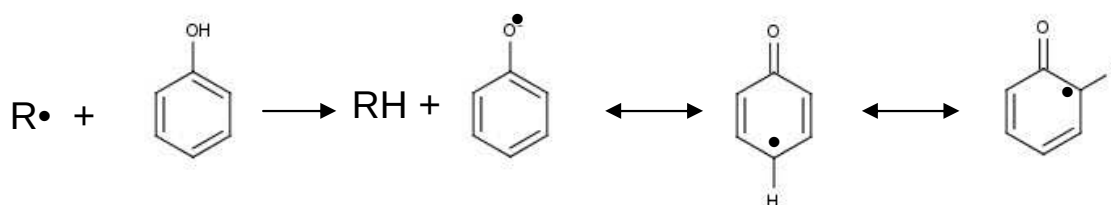
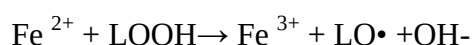


Figure 12 : Désactivation des radicaux libres lipidiques $R\bullet$ par les groupes phénols des antioxydants.

Selon certains auteurs, cela survient quand la concentration des antioxydants est trop élevée : l'accumulation des radicaux phénoxyles serait alors pro-oxydante.

Certains antioxydants tels que la vitamine E seraient susceptibles de favoriser des réactions d'oxydation, par exemple celle des LDL lorsque la concentration des radicaux libres est faible, surtout si le milieu contient du fer ou du cuivre réduits (Heinecke, 1998). Pascal (2002) rapporta lui aussi que la réduction par les antioxydants des ions ferriques Fe^{3+} en ions ferreux Fe^{2+} avait un effet indésirable, car ceux-ci sont plus pro-oxydants que ceux-là.

Les antioxydants phénoliques ne sont pas les seuls concernés. L'acide ascorbique manifeste dans certains cas des propriétés pro-oxydantes, notamment à l'égard des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) en présence d'ions ferreux, car l'oxydation de ces derniers les transforme en ions ferriques qui suscitent la production de radicaux libres lipidiques (Niki, 1991):



6 Comparaison des pouvoirs antioxydants d'aliments

Les premiers travaux sur le sujet virent le jour entre 1950 et 1960, quoique l'usage de nombre de ces produits pour améliorer la conservation d'aliments périssables (viandes, poissons, etc.), en plus de leur apport d'arôme, soit pratiqué empiriquement depuis l'Antiquité. L'intérêt porté à leur pouvoir antioxydant s'amplifia considérablement à partir de 1980, suite au désir qu'eurent les industries alimentaires de complaire aux préjugés d'une partie des consommateurs en remplaçant les antioxydants dits « chimiques » par des antioxydants « naturels », dont la présence dans la composition puisse paraître aller de soi en tant que substance contribuant à la saveur des mets et ainsi être camouflé. Les études scientifiques qui se développèrent alors visèrent à explorer les performances en ce domaine de beaucoup de plantes appartenant à une large diversité de genres, d'espèces, de variétés.

Un inventaire de la concentration totale en antioxydants des plantes comestibles, mesurée par la réduction d'ions ferriques en ions ferreux, a été dressé (Halvorsen *et al.*, 2002). Les résultats ont été réunis pour huit catégories de denrées végétales : les céréales, les racines et tubercules, les légumes, les fruits, les baies, les graines et légumineuses, les noix et autres graines, les fruits secs, soit un total de 122 plantes. En outre, les données relatives à chaque plante furent analysées sur trois spécimens provenant les plus souvent de pays différents.

Diverses denrées ont été examinées pour leur pouvoir antioxydant total, dû à plusieurs de leurs composants, qui agissent parfois en synergie :

- L'huile d'olive vierge, grâce à l'hydroxytyrosol et à différents acides phénoliques.
- Le vin rouge, grâce notamment au resvératrol (qui est un stilbène), aux catéchines, aux anthocyanidines, à l'acide gallique.
- Les graines de sésame, grâce au sésaminol et à quelques autres lignanes de la famille du sésamol.
- De nombreux épices et aromates, spécialement le romarin et la sauge, grâce à divers composants phénoliques.
- L'extrait d'ail âgé, grâce à quelques-uns de ses composés soufrés
- Le thé, grâce à ses catéchines (surtout les gallates de catéchines et de théoflavines)

Cependant, lorsque l'on compare les données de la littérature, certaines valeurs ne s'accordent pas entre elles, à tel point que nous renonçons à les mettre côte à côte, car cette confrontation n'aurait aucune utilité, sinon de montrer l'étendue des divergences. Parmi les raisons possibles de cet état de fait, le principal est la diversité des processus employés pour mesurer le pouvoir antioxydant. Il serait donc illusoire de donner un classement quantifié, comme le font pourtant presque tous les auteurs ayant publié sur ce sujet.

Chapitre 6 : Aspects toxicologiques

1 Antioxydants et radicaux libres : des composés “ambigus”

De fortes doses d'antioxydants pourraient avoir des effets délétères sur les mécanismes de défense cellulaire, favorisant dans diverses circonstances, le développement de processus cellulaires aboutissant à des pathologies telles que le cancer. Les antioxydants, comme les radicaux libres, sont des composés “ambigus” : ils possèdent à la fois des capacités bénéfiques et un potentiel toxique à certaines doses.

L'activité bénéfique ou toxique est directement reliée à la dose. Certes les antioxydants protègent contre les effets négatifs des radicaux libres, mais la production normale de ces derniers est utile au niveau cellulaire. A faible niveau, les dérivés activés de l'oxygène augmentent la capacité antioxydante des cellules en stimulant les gènes de la réponse oxydative. Les radicaux libres, à doses raisonnables, sont également capables de tuer des bactéries et de stimuler la production de lymphocytes T.

2 Les risques des antioxydants à fortes doses

Il a été démontré que des fortes doses d'antioxydants pouvaient avoir un effet pro-oxydant et entraîner des actions délétères : En piégeant les radicaux libres, les antioxydants entraînent la formation de nouveaux radicaux réactifs. Par ailleurs, les radicaux libres induisent un processus génétiquement déterminé, l'apoptose, connue pour être un processus bénéfique qui protège contre le cancer et diverses anomalies immunitaires : l'apoptose permet un suicide “altruiste” des cellules éventuellement endommagées (comme les cellules cancéreuses) et aboutit à leur élimination. Des fortes doses d'antioxydants pourraient entraîner une réduction ou une suppression des mécanismes de l'apoptose. Ce phénomène pourrait expliquer l'effet négatif potentiel sur l'incidence des cancers du poumon observé dans les études ATBC et CARET, où la supplémentation consistait en des doses relativement fortes de bêta-carotène chez des grands fumeurs. Il est possible que les sujets qui sont, et ont été, de grands fumeurs sur une longue période de leur vie, aient des cellules cancéreuses présentes dans leurs poumons, dont l'autodestruction a pu être bloquée par l'apport massif de β -carotène.

Aujourd'hui, de nombreux arguments supportent l'hypothèse d'une efficacité de la combinaison équilibrée de plusieurs antioxydants. En effet, il existe des interrelations métaboliques entre les différents nutriments antioxydants, avec des effets complémentaires et synergiques pour certains d'entre eux. Ainsi l'alpha-tocophérol et l'acide ascorbique inhibent de façon synergique l'oxydation des LDL. De plus, les nutriments antioxydants ont des capacités complémentaires de “piégeage” des radicaux libres. L'efficacité des antioxydants est différente selon le type de stress oxydatif. Leurs différentes localisations dans les membranes et les lipoprotéines ainsi que leur mobilité dans le micro-environnement expliquent également la complémentarité de leur action. L'accumulation des données mécanistiques suggère que les antioxydants agissent de façon complémentaire et synergique. Sur ces arguments, on peut attendre, d'une combinaison d'antioxydants à doses nutritionnelles, un maximum d'efficacité protectrice associée à un maximum de sécurité. Il apparaît donc raisonnable de retenir comme optimal, le niveau des micronutriments antioxydants correspondant aux apports alimentaires les plus élevés des études d'observation, et de favoriser la consommation de fruits et de légumes.

3 Modulation de la défense antioxydante par les aliments

La défense antioxydante de l'organisme est influencée par l'alimentation. La minimisation du stress oxydant consiste à la fois à maximiser l'apport en antioxydant et à minimiser la quantité de pro-oxydants. La démonstration des effets protecteurs des antioxydants est fondée sur diverses études mais les mécanismes d'action restent encore à être totalement élucidés.

Les grandes enquêtes alimentaires démontrent que les apports alimentaires en certains antioxydants sont suboptimaux voire franchement déficients, dans certains groupes de population tels que les prématurés, les femmes enceintes ou allaitante, les enfants en croissance, les personnes âgées, les personnes originaires de certains pays ou régions particulièrement défavorisées au plan agro-alimentaire ou socio-économique, les fumeurs, les sujets atteints de certaines pathologies. A côté de l'aspect quantitatif, la biodisponibilité des antioxydants dans la matrice alimentaire est fondamentalement importante. Celle-ci dépend à la fois de facteurs liés à l'aliment lui-même et de facteurs liés à l'hôte.

Relativement peu d'études se sont finalement véritablement attachées à tester l'effet de régimes particuliers ou de modifications des habitudes alimentaires. Les critères d'activités mesurées sont le plus souvent biologiques. C'est ainsi qu'a été démontré qu'un régime déprécié en certains antioxydants (par exemple, les carotènes alimentaires) augmentait les indicateurs de peroxydation lipidique et, qu'au contraire, une augmentation des apports en certains fruits et/ou légumes provoquait une élévation des concentrations corporelles en antioxydants (β -carotène et vitamine C) et modifiait favorablement les valeurs des indicateurs de peroxydation lipidique, comme par exemple la sensibilité des LDL à l'oxydation, l'exhalation d'éthane, l'excrétion urinaire des bases oxydées ou encore la capacité antioxydante totale des fluides biologiques (Miller *et al.*, 1998). De tels résultats ont aussi été obtenus avec d'autres aliments réputés antioxydants comme le vin rouge (Cao *et al.*, 1998b). Le tableau 15 fait une synthèse de plusieurs études qui montrent quels seraient les apports efficaces en fruits et légumes par rapport aux apports usuels et aux apports recommandés actuellement par les diététiciens nutritionnistes. On voit que les apports jugés efficaces selon les critères biologiques sont supérieurs à ceux actuellement recommandés et bien au-dessus des quantités réellement consommées (qui sont déjà illusoire pour certains groupes de population).

Tableau 15: Apport journalier en fruits et légumes aux USA d'après (Cao *et al.*, 1998a)

Situation	Fruits	Légumes	Total
Habituelle*	2-3	2-3	4-6
Recommandée**	2-3	3-5	5-8
Efficace***	5-6	5-6	10-12

* Les apports incluent aussi les jus, les sauces et l'ail

** Recommandations alimentaires pour les Américains (US Dept Agriculture et Santé)

*** Apport expérimental augmentant la capacité antioxydante de l'organisme

Parmi les types d'alimentation associés à un risque significativement plus faible de maladies chroniques, on pourrait citer le régime méditerranéen. Celui-ci se caractérise principalement par un apport calorique relativement faible, une consommation importante et variée de céréales, de légumineuses, de fruits et légumes (crus/cuits, frais/secs), une faible consommation de viande rouge, sauf un peu de viande bovine, du poisson, très peu de lait et de beurre, mais plutôt des fromages frais et des yogourts, de l'huile d'olive et enfin, du vin rouge consommé modérément au cours de repas. Ce type d'alimentation est associé à un risque significativement plus faible de maladies cardiovasculaires, mais l'effet sur l'incidence des cancers est moins net. Parmi les éléments protecteurs de ces régimes se trouvent certainement des antioxydants dont la vitamine E et la vitamine C. L'effet des caroténoïdes et des dérivés phénoliques n'est pas établi en raison de la méconnaissance de leur biodisponibilité réelle, mais les tomates et surtout le lycopène qu'elles contiennent, semblent une partie importante de ce régime. Il va de soi que de nombreuses autres influences interviennent dans l'effet protecteur de ces régimes dont la teneur importante en acide folique et en potassium ou la composition favorable en acide gras (les polyinsaturés sont favorisés aux dépens des saturés). L'huile d'olive serait particulièrement bénéfique en raison d'une part de sa composition en acide gras mono insaturés (acide oléique) et, d'autre part, de la présence de nombreux composés polyphénoliques (qui font la spécificité de l'huile d'olive) et qui ont des propriétés antioxydantes. Le vin rouge agirait quant à lui par un effet propre de l'alcool, mais peut être également via des polyphénols dont la biodisponibilité reste néanmoins incertaine. C'est cet équilibre nutritionnel qui est de plus en plus valorisé par les nutritionnistes et les diététiciens dans leurs conseils alimentaires. Ceux-ci vont résolument à l'encontre de l'uniformisation des modes de vie et des régimes alimentaire à laquelle on assiste dans le monde moderne.

L'ensemble des données épidémiologiques et expérimentales conforte l'hypothèse que la lutte contre le stress oxydant à l'aide de micronutriments antioxydants pourrait contribuer à diminuer les dommages radicalaires, à améliorer certaines fonctions cellulaires et à préserver la santé. Dans le monde industrialisé, l'alimentation (produits raffinés) et le style de vie (sédentarité, exposition à la pollution) participent sans doute à une diminution de la capacité antioxydante globale des individus. Cependant un rôle direct d'un antioxydant particulier sur une pathologie donnée n'a jamais été mis en évidence, sans doute parce les molécules antioxydantes peuvent aussi agir par d'autres mécanismes cellulaires et moléculaires. L'association d'aliments complexes comme les produits végétaux et la lutte contre le stress oxydant est clairement démontrée mais l'effet santé de ces produits végétaux fait sans doute appel d'autres facteurs endogènes des aliments que les caroténoïdes, vitamines et minéraux (fibres, phytostérols, glucosinolates) et aussi de facteurs exogènes souvent associés aux consommateurs de produits végétaux (exercice physique régulier, consommation moindre d'alcool et de tabac). Dans l'état actuel des connaissances, la théorie du stress oxydant dans le vieillissement et les pathologies associées reste vraisemblable mais les moyens de lutte restent à préciser. Des connaissances approfondies sont encore nécessaires notamment sur la composition des aliments, les interactions des micronutriments antioxydants dans le tube digestif, sur l'interaction des micronutriments avec les gènes ou sur le polymorphisme génétique des individus.

La composition de notre alimentation joue un rôle primordial dans notre capacité à nous défendre contre la production non contrôlée des espèces radicalaires de l'oxygène. La prévention nutritionnelle du stress oxydant et de ses conséquences pourrait impliquer, comme mesure première, l'optimisation des apports en antioxydants par l'alimentation.

Même si on peut imaginer le développement des phytomicroconstituants sous forme de pilules, de gélules ou de capsules, c'est-à-dire sous forme de compléments alimentaires, leur développement dans le cadre des aliments courants est mieux adapté à nos besoins qui ont considérablement évolués depuis 50 ans et à nos conditions de vie. Cette position s'appuie essentiellement sur des arguments (Pascal, 2002):

- scientifiques : le véritable défi consiste bien à comprendre comment de si nombreux composés, qui interagissent entre eux au sein d'une matrice alimentaire très complexe, exercent de façon discrète et à long terme, une activité dans l'organisme et selon quels mécanismes. Nous nous nourrissons d'aliments et non de pilules.

- de sécurité : il n'y a pratiquement pas de limites à la consommation de pilules ou de capsules. Au contraire, la présence de phytomicroconstituants au sein d'une matrice alimentaire, pour des raisons de capacité d'ingestion, limite leur consommation et étale dans le temps leur libération dans l'organisme, donc joue sur la cinétique de leur biodisponibilité et par conséquent réduit les risques d'une ingestion excessive.

Le développement d'aliments mieux adaptés à nos besoins suppose que ces aliments puissent s'accompagner d'allégations leur donnant un avantage commercial. Ces allégations doivent être scientifiquement validées faute de quoi le concept d'aliment fonctionnel sera rapidement et complètement détruit (Pascal, 2002).

**PARTIE 3 : ETUDE DE LA FONCTIONNALITE
ANTIOXYDANTE DE PLATS INDUSTRIELS**

S'il est établi que les antioxydants d'origine alimentaire pourraient contribuer à la prévention nutritionnelle de pathologies où le stress oxydant est impliqué, le niveau optimal de ces apports reste l'objet d'un large débat. Encore faut-il réussir à les quantifier afin de mieux appréhender les quantités ingérées, comme les quantités recommandées.

La Partie 3 de ce travail est consacrée à l'étude de l'activité antioxydante (en tant que fonctionnalité potentielle) des plats préparés de carte MARIE par la mesure de leur activité anti radicalaire totale et la mesure du taux de phénols totaux. Nous souhaitons définir ces propriétés sur l'ensemble des plats de la gamme MARIE. Nous ne pouvons donc mesurer chaque antioxydant dans chaque aliment, pour dresser un portrait précis de son potentiel antioxydant. Plusieurs méthodes ont été développées pour tenter de mieux appréhender ce potentiel antioxydant. Cependant, ces méthodes ne donnent pas toutes les mêmes résultats, si bien que les valeurs dont nous disposons ne sont qu'une indication, et il est extrêmement hasardeux de comparer des aliments ayant été analysés avec des méthodes différentes, voire la même méthode. D'un point de vue industriel et dans les études épidémiologiques, il est nécessaire de développer une méthode de prédiction d'activité. En effet, jusqu'à maintenant, on considèrerait que l'utilisation d'ingrédients ayant un fort potentiel antioxydant menait à des préparations dotées de fort pouvoir antioxydant. Si cette assertion est justifiée au niveau des propriétés nutritionnelles des aliments, elle n'est peut être pas avérée au niveau des activités antiradicalaires dans l'organisme.

Dans cette partie, nous considèrerons donc les 3 étapes incontournables de l'analyse de l'activité antioxydante d'un aliment qu'il soit simple ou complexe : l'extraction des composés antioxydants, l'analyse de l'extrait (en considérant les différentes mesures existantes) et le traitement de résultats pour quantifier les antioxydants ou leur activité. Ces 3 parties font chacune l'objet de chapitre dans le travail qui suit. Enfin nous discuterons de l'étude de la biodisponibilité de cette activité.

CHAPITRE 1 : Paramètres affectant l'extraction des composés antioxydants

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les paramètres affectant le rendement d'extraction de composés antioxydants de matrices complexes telles que des préparations culinaires prêtes à l'emploi. En effet, tout l'art de l'extraction des composés d'intérêts est la connaissance des paramètres influant sur la nature et la cinétique du transfert de masse du solide vers le solvant. Lors de l'étude de l'activité anti radicalaire d'un aliment plus ou moins complexe, toute la difficulté est de choisir la méthode d'extraction pour obtenir l'extrait le plus représentatif possible de cet aliment. Idéalement la méthode ne doit pas conduire à une discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changements de pH, ou entraîner une perte de composés volatils. Nous essayerons donc par la suite de rechercher les paramètres les plus adéquats, tout en étant conscient que le modèle d'extraction utilisé ne représentera pas « l'idéal » d'extraction pour l'ensemble des plats à doser.

1 Paramètres affectant l'extraction

Le processus d'extraction d'aliments complexes est, entre autre, un moyen de rendre homogène un produit complexe hétérogène, libérer les molécules d'intérêts présents dans les plats par rupture des tissus si besoin et par diffusion pour obtenir une solution aqueuse compatible avec les différentes techniques de dosage.

Il n'existe pas de technique d'extraction universelle permettant l'extraction de l'ensemble des composés antioxydants caractérisant un aliment donné. Le choix de la technique la plus adaptée est très dépendante de la matrice étudiée et de l'objectif de l'analyse. L'extraction par un ou des solvants organiques permet d'obtenir un extrait très complexe. On trouve, dans la littérature, plusieurs études d'optimisation d'extraction des composés antioxydants sur différentes matrices on été élaborées : soit pour optimiser l'extraction de polyphénols spécifiques, soit pour optimiser l'estimation de l'activité antiradicalaire d'aliments spécifiques. Pour chaque cas, les conditions optimales d'extraction apparaissent différentes.

Nous allons donc tenter de faire l'inventaire des paramètres pouvant affecter l'extraction des composés antioxydants, afin d'optimiser ceux-ci.

1.1 Influence de la matrice sur l'extraction

Les composés antioxydants sont généralement présents dans les aliments à de faibles concentrations (de l'ordre du ppm (mg/kg) ou du ppb ($\mu\text{g/kg}$)) et sont de polarité, solubilité, volatilité et stabilités très variables. De plus les matrices peuvent être très complexes et provoquer des interférences avec la méthode d'extraction.

Les caractéristiques physico-chimiques de la matrice jouent un rôle important dans le processus d'extraction en influençant la durée et le rendement d'extraction du ou des composés. Le processus d'extraction d'un composé comporte plusieurs étapes (Feinberg, 2006):

- Désorption ($A \rightarrow B$)
- Diffusion hors des pores ($B \rightarrow C$)
- Solubilisation dans le solvant ($C \rightarrow D$)
- Transport du composé ($D \rightarrow E$)

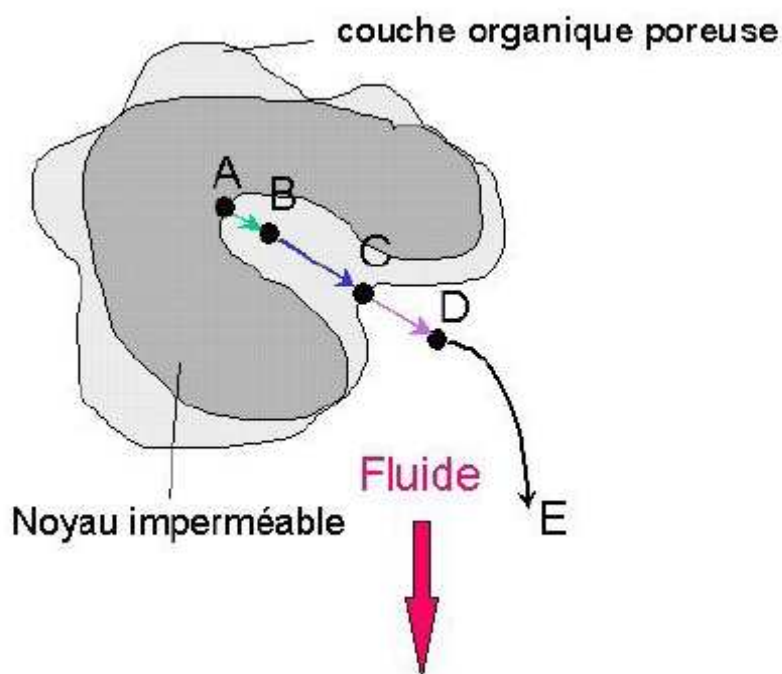


Figure 13 : Schématisation de différentes étapes d'extraction d'un composé

Dans notre cas, chaque plat préparé aura des caractéristiques physico-chimiques propres. Chaque caractéristique de chaque plat ne pourra être prise en considération. Comme nous l'avons souligné dans la partie 1, les aliments sont souvent des mélanges complexes contenant de nombreuses espèces chimiques. De fait, l'analyte auquel on s'intéresse est noyé à des doses très faibles au milieu de ces autres molécules qui risquent de gêner l'analyse. On « qualifie » globalement de matrice tous les autres constituants qui entourent ou accompagnent l'analyte. La solubilité du composé dans le solvant n'est donc pas une condition suffisante pour garantir l'efficacité de l'extraction à partir de matrices solides. Dans la mesure du possible l'extraction devrait prendre en compte les interactions composés – matrice dans la matrice.

1.2 Effet du solvant

Le système d'extraction et notamment le solvant d'extraction doit être choisi selon la nature des composants d'intérêts à extraire quand ils sont connus, les propriétés physicochimiques de la matrice, la disponibilité de réactifs et des équipements, coût et les conditions de sécurité (Yu *et al.*, 2002). La technique utilisant des solvants organiques est la plus couramment utilisée. L'objectif étant de mettre la matière première à traiter en contact avec un solvant adéquat pour extraire le ou les composés souhaités, le solvant doit être choisi en fonction de la nature de la matière première et du ou des composés à extraire comme nous l'avons dit précédemment.

Il a été démontré que dans le cas du tournesol, le solvant utilisé a un effet important sur l'extraction solide-liquide des anthocyanines. Le taux d'extraction des anthocyanines des coques de tournesol varie selon le type de solvant utilisé. Il apparaît que l'eau sulfurée donne de meilleurs résultats que l'acide acétique et l'éthanol aqueux pour l'extraction des anthocyanines du tournesol (Gao & Mazza, 1996). Sur le marc de raisin, des tests ont été faits avec différents solvants d'extraction (méthanol, éthanol, eau) acidifiés par différents acides (acide acétique, citrique, tartrique, propionique formique et hydrochlorique). Le méthanol acidifié apparaît alors être 20% plus efficace sur l'éthanol et 73% plus efficace que l'eau (Gao & Mazza, 1996). D'un autre côté, de fortes concentrations en acide conduisent à de faibles quantités de pigments dans les extraits, probablement à cause de l'hydrolyse des anthocyanes libérant des formes aglycones beaucoup moins stables, d'où une perte de pigments (Malien-Aubert & Amiot-carlin, 2006).

D'autres exemples d'optimisation d'extraction ont été étudiés tel que les curcuminoïdes qui sont solubles dans les solvants organiques comme l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'éthanol, le n-butanol, le dichlorométhane et l'hexane. Les solvants les plus polaires comme l'éthanol extraient les curcuminoides et des substances volatiles, alors que les solvants les moins polaires comme l'hexane sont utilisés pour purifier les oléorésines. Plusieurs études montrent que le méthanol est un solvant particulièrement performant pour les polyphénols, cependant du fait de sa toxicité son utilisation n'est pas recommandée en agroalimentaire (Chirinos *et al.*, 2007; Zhao & Hall Iii, 2008). Il apparaît donc que le solvant « idéal » et le procédé d'extraction varie en fonction de chaque matrice alimentaire. Et quel que soit le solvant d'extraction choisit, le taux de récupération d'un composé dans une matrice complexe n'est que rarement total.

2 Autres paramètres jouant sur l'efficacité de l'extraction

La cinétique d'extraction dépend des conditions opératoires (pression, température, débit et composition du fluide) et de la nature et de la granulométrie du produit à traiter.

La plupart des extractions sont très complexes et sont influencées à la fois par des paramètres thermodynamiques et cinétique. Dans de nombreux cas l'extrait n'est pas distribué de façon homogène dans la charge, une fraction de l'extrait est très accessible et est extraite en priorité, puis l'extraction du reste de l'extrait est à la fois limitée par la solubilité et la diffusion dans les particules de charge (Figure 14).

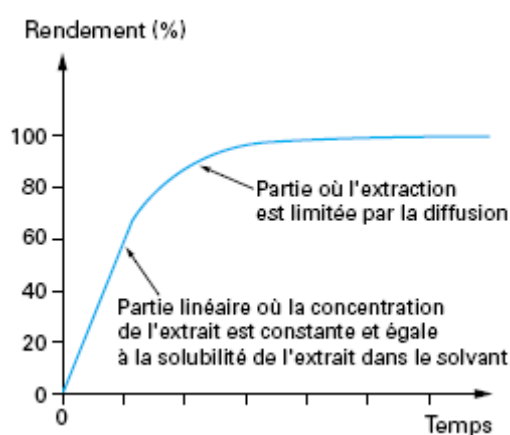


Figure 14: Allure générale des courbes d'extraction (Perrut, 1999).

2.1 Agitation

L'homogénéisation du solvant lors de l'extraction est un paramètre à considérer puisqu'il permet de ne pas avoir une couche limite de solvant saturé au contact de la matière solide. Il est donc nécessaire d'avoir une agitation suffisante pour permettre une meilleure extraction.

2.2 Taille des particules

L'extraction dépend également de la rapidité avec laquelle le composé se dissout et atteint la concentration d'équilibre dans le liquide. On peut améliorer le taux d'extraction en augmentant le gradient de concentration ou le coefficient de diffusion ou en diminuant la taille des particules. A ce jour, les seules conditions optimales étudiées (température et rapport solvant/solide) sont celles pour l'extraction des composés phénoliques du cassis, et plus particulièrement des anthocyanines (Cacace & Mazza, 2002; Spigno *et al.*, 2007).

L'effet du ratio solvant/ échantillon a été étudié pour différents aliments : plus le ratio est grand, plus le rendement d'extraction est meilleur, tout solvant confondus (Cacace & Mazza, 2003). Dans notre cas, il est donc important de maintenir ce ratio constant afin de pouvoir comparer les résultats en eux et ne pas favoriser ou défavoriser telle ou telle matrice alimentaire.

2.3 Effet Temps - Température

En général, le profil d'une extraction est un processus qui se déroule en 3 phases. La phase initiale est limitée par la solubilité du composé dans le solvant, la phase intermédiaire est contrôlée par la diffusion du composé au sein de la matrice et la phase finale est liée à la désorption du composé.

Lorsque le rendement n'est pas satisfaisant ou lorsque la durée de l'extraction est trop longue, il est possible d'améliorer les résultats en jouant sur différents paramètres.

Une augmentation de température entraîne généralement une diminution de la viscosité, augmentant ainsi significativement la diffusion des molécules dans le solvant. Par exemple, l'extraction des anthocyanes dépend de la température utilisée. Mais l'augmentation de la

température d'extraction avec de l'eau sulfitée de 20° à 80°C conduit à une diminution du taux d'anthocyanes. Cacace et Mazza (2002) recommandent plutôt d'extraire les anthocyanes de cassis à une température comprise entre 30 et 35°C afin d'éviter la dégradation thermique. Néanmoins, contrairement à l'extraction effectuée avec l'eau sulfitée, de hautes températures en présence de solvant hydro alcoolique augmentent l'extraction des anthocyanes de cassis (Cacace & Mazza, 2003).

CHAPITRE 2 : Méthodes permettant la mesure du pouvoir antiradicalaire

Le terme antioxydant n'est pas restreint à une seule définition, en effet il existe plusieurs types d'antioxydants et plusieurs mécanismes d'actions des antioxydants, comme nous l'avons vu au chapitre 2.

Rappelons qu'il existe plusieurs types de systèmes antioxydants :

- Les enzymes antioxydantes : superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase,
- Des molécules à haut poids moléculaire : albumine, ferritine et autres protéines,
- Des molécules de plus petites tailles: acide ascorbique, acide urique, tocophérol, caroténoïdes, polyphénols...
- Et plusieurs hormones : œstrogènes, mélatonine....

D'un autre côté, il existe de multiples types de radicaux libres et de sources oxydantes, par exemple : $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , $HO^{\cdot}$, $NO^{\cdot}$, $ONOO^{\cdot}$, $HOCl$, $RO(O)^{\cdot}$, $LO(O)^{\cdot}$...

Les antioxydants et oxydants ont différentes caractéristiques physiques et chimiques. Chaque antioxydant pouvant, dans la plupart des cas, agir de façon différente dans un système simple. De plus, les antioxydants peuvent réagir de manière différente face à différents radicaux ou sources oxydantes (Prior *et al.*, 2005).

Les dosages de capacité antioxydante totale mesurent la capacité des antioxydants à neutraliser un radical libre. Ce dosage prend donc en considération les antioxydants capables

d'un transfert d'électron ou d'hydrogène, c'est un dosage de capacité antiradicalaire spécifique.

1 Choix de la méthode de mesure du pouvoir anti radicalaire

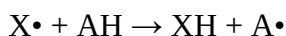
1.1 Différence entre transfert d'atome d'hydrogène et transfert d'électron unique

Les antioxydants peuvent désactiver les radicaux par 2 mécanismes majeurs : HAT (transfert d'hydrogène) et SET (transfert d'électron).

L'énergie de dissociation des liaisons (BDE) et le potentiel d'ionisation (IP) sont 2 facteurs majeurs qui déterminent le mécanisme et l'efficacité des antioxydants. Le résultat est le même, considérant le mécanisme, cependant la cinétique et le potentiel d'ionisation diffère pour chaque réaction.

Méthode basée sur le transfert d'hydrogène (HAT):

Cette méthode mesure la capacité d'un antioxydant à neutraliser un radical libre en lui cédant un hydrogène (AH= donneur de H)

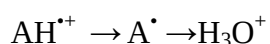
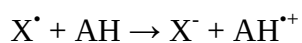


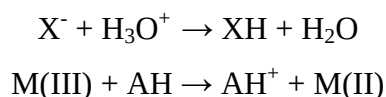
La réactivité relative dans la méthode basée sur le transfert de H est déterminée par le BDE du groupement donneur de H dans le potentiel d'ionisation.

Elle mesure la capacité d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres par donation d'hydrogène. L'activité relative de la méthode HAT est déterminée par le BDE du groupe donneur de H. La réaction HAT est plutôt rapide (quelques secondes ou minutes). L'implication d'agents réducteurs (métaux) complique les tests HAT et peut fausser l'activité apparente. La réaction HAT serait indépendante du solvant et du pH utilisé. Cette réaction est rapide, elle est de l'ordre de la minute. La présence d'agent réducteurs tels que les métaux, pourrait erroner la mesure (Prior *et al.*, 2005).

Méthodes basées sur le transfert d'électron (SET) :

Elle détecte l'habilité d'un composé antioxydant à transférer un électron pour réduire un autre composé tel que les métaux, les carbonyles et les radicaux.





La réactivité de la méthode SET est ainsi basée d'une part sur la déprotonation et d'autre part sur le potentiel d'ionisation du groupe fonctionnel de l'antioxydant.

La méthode SET est très sensible à l'acide ascorbique et l'acide urique. Les traces de contaminants (surtout métaux) interfèrent avec la méthode SET et peuvent être une cause de la forte variabilité des résultats et la faible reproductibilité.

Les mécanismes de transfert d'hydrogène ou d'électron se produisent ensemble dans tous les échantillons. Ces réactions sont relativement lentes. Lors des réactions de transfert d'électron, la capacité antioxydante est calculée à partir du pourcentage d'inhibition du radical en présence de l'antioxydant. Il peut exister également des interférences avec les métaux.

SET et HAT ont lieu la plupart du temps ensemble dans les échantillons, l'équilibre étant déterminé par la structure de l'antioxydant et le pH. En général, les valeurs de l'IP diminuent en fonction de l'augmentation du pH, reflétant la capacité de donation d'électron augmentée ainsi que la déprotonation.

1.2 Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'hydrogène

Un certain nombre de méthodes a été développé pour la détection de l'activité antioxydante spécifique ou générale. Parmi elles, la méthode appelée ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et la méthode appelée TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter) et plusieurs de leurs variantes.

1.2.1 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Basé sur le travail de Ghiselli (1995) et Glazer (1990) développé par Cao (1998).

La méthode ORAC mesure l'inhibition antioxydante des radicaux peroxydes et donc reflète l'activité antioxydant classique par cassage de chaîne de radicaux par HAT.

Le radical peroxyde réagit avec un indicateur fluorescent pour former un produit non fluorescent qui peut facilement être quantifié. La capacité antioxydante est déterminée par la diminution de la quantité de produit formé en fonction du temps. Plusieurs composés sont peuvent être utilisés: la fluorescéine (FL), la dichlorofluoresceine (H₂DCF-dA) ou d'autres.

Le test est réalisé en spectrofluorimétrie. La dégradation de la fluorescéine (FL : 3',6'-dihydroxyspiro [isobenzofuran-1[3H] ,9'[9H]-3-one]) est induite par la décomposition thermique (37°C) de l'AAPH (2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride) en deux radicaux libres. La présence d'antioxydants dans l'échantillon en retarde la dégradation. Il s'agit donc à proprement parler de la mesure d'un pouvoir antiradicalaire. Les valeurs d'ORAC sont reportées en équivalent Trolox.

Le trolox, non autorisé en alimentation, est utilisé dans les travaux de recherche et d'analyse. Sa molécule ressemble à celle de l' α -tocophérol, alors que la chaîne hydrocarbonée y a été remplacée par une fonction carboxyle. Il est soluble dans l'eau (certains l'appellent improprement « la forme soluble de la vitamine E »).

Remarques sur ce test

La réaction avec la fluorescéine a été déterminée étant un mécanisme HAT. Le principe de la méthode ORAC peut être adapté pour utiliser d'autres sources de radicaux.

Cette méthode est facilement automatisée. Parce que les réactions ORAC sont sensibles à la température, il est essentiel de contrôler la stabilité de la température. Une faible différence de température peut diminuer la reproductibilité des tests.

Les marqueurs de la fluorescence, bien que sensibles, demandent une détection par spectrofluorimètre, qui doit être disponible dans les laboratoires. ORAC est l'essai dans lequel l'influence du solvant d'extraction est la plus importante (Perez-Jimenez & Saura-Calixto, 2006). Le temps d'analyse important (~1h) est aussi critiqué (Prior *et al.*, 2005).

1.2.2 TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)

Ce test contrôle la capacité des composés antioxydants à interférer avec les réactions entre les radicaux peroxydes générés par AAPH ou ABAP et un indicateur cible. Différentes variations de la méthode ont été utilisées : l'oxygène, la fluorescence de R-phycoérythrine ou l'absorbance de l'ABTS comme indicateur de réaction.

La réaction de base est similaire au test ORAC. L'indicateur doit réagir avec ROO• à faible concentration, il doit avoir une grande différence spectroscopique entre le produit natif et le produit oxydé (pour maximiser la sensibilité) et pas de réaction en chaîne de radicaux au-delà de l'oxydation de l'indicateur ne devrait se produire. L'oxydation de l'indicateur est suivie

en spectroscopie ou par fluorescence. L'activité antioxydante est déterminée comme le temps de consommation de tous les antioxydants.

Remarques sur ce test

La méthode est relativement longue. Différents indicateurs ont été utilisés, ce qui rend les comparaisons difficiles entre les résultats. L'activité antioxydante est basée sur la phase de multiplication de radicaux, on a donc une sous estimation de l'activité antioxydante totale, car on ne considère pas l'activité après la phase de propagation.

1.3 Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'électron

1.3.1 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La réaction mesure la réduction du fer 2, 4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) en un produit coloré. A la base, ce test a été élaboré pour tester l'activité antioxydante du plasma humain.



Remarques sur ce test

La méthode FRAP se base sur l'hypothèse que les réactions d'oxydoréduction procèdent si rapidement que les réactions sont complètes à partir de 4 à 6 minutes mais ce n'est pas toujours la réalité. Les résultats de FRAP dépendent surtout de l'échelle de temps des analyses. De plus, certains phénols réagissent plus lentement et demande des temps de réactions plus long pour leur détection (30 minutes). FRAP est simple à utiliser, rapide, bon marché, robuste et ne demande pas d'équipement spécifique. Cette méthode peut être utilisée manuellement, semi-automatiquement ou automatiquement.

1.4 Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'électron ou d'hydrogène

Bien que les méthodes TEAC utilisant l'ABTS ou le DPPH soient classées en réaction SET, ils peuvent neutraliser les radicaux via les deux méthodes.

1.4.1 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity) utilisant ABTS^{•+}

Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical ABTS^{•+}. Dans ce test, l'ABTS oxydé est intensivement coloré, et l'activité antioxydante est mesurée comme la capacité des composés tests à diminuer l'intensité de la coloration, relativement au Trolox. A la base, ce test utilise metmyoglobine et H₂O₂ pour générer la ferrylmyoglobine qui réagit avec l'ABTS pour former l'ABTS^{•+}.

ABTS^{•+} peut être généré par des réactions chimiques (ex: dioxyde de manganèse, ABAP, persulfate de potassium) ou par des réactions enzymatiques (ex : metmyoglobine, hémoglobine, raifort peroxydase). Généralement, la génération chimique demande beaucoup de temps (plus de 16h pour le persulfate de potassium) et une haute température (60°C pour ABAP) alors que la génération par les enzymes est plus rapide et les conditions de réaction sont plus douces. Le pH peut jouer un rôle (ex : le transfert d'électron est facilité à pH acide).

Les réactions solubles dans l'eau semblent être les plus favorables. L'absorbance maximale de l'ABTS^{•+} ont été montré comme étant aux longueurs d'ondes 415, 645, 734 et 815nm. Parmi ces longueurs d'ondes, 415 et 734nm ont été retenues pour la plupart des études spectroscopiques entre l'antioxydant et l'ABTS^{•+}. La capacité antiradicalaire est calculée en équivalent Trolox[®].

Remarques sur ce test

Parce que le test TEAC est simple, il est utilisé dans beaucoup de laboratoires pour l'étude de l'activité antioxydante. La valeur TEAC de beaucoup de composés végétaux a été rapportée. L'ABTS^{•+} réagit rapidement avec les antioxydants. Il peut être utilisé sur une large gamme de pH. L'ABTS^{•+} est soluble dans l'eau et dans les solvants organiques et n'est pas affecté par la force ionique, il peut donc déterminer la capacité antioxydant lipophile et hydrophile. Cependant, le radical utilisé dans le test TEAC est un radical non physiologique.

1.4.2 TEAC utilisant le radical DPPH[•]

Le radical DPPH[•] (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un des radicaux nitrogènes organiques les moins stables, qui porte une couleur pourpre. Le test est basé sur la mesure de la capacité des antioxydants à réduire DPPH[•]. La capacité peut être évaluée par résonance paramagnétique électronique ou en mesurant la diminution de l'absorbance, basé sur la perte de couleur à 515nm. Le pourcentage de DPPH restant est proportionnel à la concentration en

antioxydants. La concentration qui cause une diminution de la concentration initiale de DPPH° de 50% est définie comme EC₅₀. Le temps établi pour effectuer cet EC₅₀ est défini comme T_{EC50}. Un autre critère pour étudier la capacité antioxydant est appelé l'efficacité antiradicalaire (AE) déterminé comme :

$$AE = 1/EC_{50} T_{EC50}$$

AE : Antiradical Efficiency (Efficacité antiradicalaire)

EC₅₀ : Concentration en antioxydant permettant d'éliminer 50% du radical

T_{EC50} : Durée pour laquelle 50% des radicaux ont été éliminés

La méthode est généralement standardisée par rapport au Trolox.

Remarques sur ce test

Ce test est simple et rapide et ne nécessite que l'utilisation d'un spectrophotomètre à vis-UV. Cependant, l'interprétation est compliquée quand d'autres composés ont des absorbances qui chevauchent avec celles de DPPH à 515nm, comme les caroténoïdes. DPPH est un radical nitrogène stable qui ne porte pas de similarité avec le radical peroxy, hautement réactif et instable lors de la peroxydation lipidique. Beaucoup d'antioxydants peuvent réagir plus lentement avec DPPH voir être inactif.

2 Pourquoi a t-on besoin d'une méthode standardisée de calcul d'activité antioxydante totale?

Nous venons de le voir, plusieurs méthodes permettent de mesurer la capacité antiradicalaire totale. Ces méthodes diffèrent par leurs réactions chimiques (différents radicaux sont utilisés pouvant avoir différentes cibles) et par leur méthode de calcul. Ainsi aucune comparaison ne peut être faite entre les différents tests concernant les résultats en valeurs absolues, les comparaisons sont essentiellement faites à partir des classements (ou rang) des échantillons entre eux.

Il n'existe à l'heure actuelle aucune standardisation permettant de comparer les résultats entre eux.

La standardisation d'une méthode permettrait (Prior *et al.*, 2005):

- une meilleure information pour s'appropriier les tests d'application
- avoir des comparaisons significatives d'aliments
- avoir un moyen de contrôle des variations au niveau des produits ou entre les produits

- d'avoir à disposition des standards de qualité pour la réglementation et les revendications de santé

A l'heure actuelle, plusieurs auteurs mettent en relief la nécessité de caractériser un aliment ou un produit par plusieurs tests ou indices (Pellegrini *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Stratil *et al.*, 2006). En effet l'utilisation de plusieurs indices permet une validation des résultats, et la quantification annexe d'antioxydants spécifiques tels que les polyphénols serait un bon marqueur (Saura-Calixto & Goni, 2006).

2.1 Standardisation d'une méthode de mesure de la capacité antioxydante totale

Pour des raisons économiques et de praticité nous avons utilisé la méthode TEAC de préférence pour la majorité de nos dosages. Cependant, dans un souci de rigueur, 5 préparations seront dosées selon 3 méthodes : ORAC, TEAC et DPPH. D'autre part, nous l'avons vu, les composés phénoliques sont les phytonutriments les plus représentés dans les aliments, ils ont une capacité antioxydante forte et avérée au sein de l'aliment, ainsi que d'autres activités potentiellement bénéfiques pour l'homme. C'est pourquoi, en parallèle de la mesure de capacité antiradicalaire totale des différentes préparations, seront dosés les phénols totaux pour l'ensemble des échantillons.

2.2 Choix de la méthode du dosage des phénols totaux

L'analyse par spectrophotométrie est retenue pour l'expression des teneurs totales tandis que les méthodes chromatographiques précisent les déterminations individuelles. Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 (Singleton *et al.*, 1965). Depuis son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses.

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols ; il réagit avec les acides aminés ; tyrosine et tryptophane, des protéines, les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'acide ascorbique, l'acide tartrique et les sulfites. L'acétone aurait l'avantage de précipiter les protéines et d'extraire

faiblement les sucres. Néanmoins, il conviendrait d'évaluer au préalable pour chaque type de tissu la quantité de composés non phénoliques pouvant interférer avec le réactif de Folin.

La plus part des travaux sont réalisés par rapport à une gamme d'acide gallique qui est un composé de coût peu élevé et qui se solubilise facilement dans l'eau. La méthode d'évaluation du contenu en composés phénoliques utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisé dans les laboratoires et donne des résultats fiables et reproductibles. Elle reste néanmoins une méthode analytique destructive (prise d'échantillon, réalisation d'un extrait).

CHAPITRE 3 : Amélioration de certains paramètres d'extraction et validation de la méthode de dosage

Le procédé d'extraction des molécules antioxydantes sera optimisé en prenant comme critère la capacité antiradicalaire globale. Afin d'améliorer la perception du processus d'extraction et de diminuer le nombre d'expériences et par conséquent la quantité de matière première et de réactifs consommés, nous appliquerons la méthodologie des plans d'expériences. Sur la base des conditions optimales (et non « idéales) d'extraction obtenues grâce au plan d'expérience, une étape de comparaison de cette méthode à des aliments plus « classiques » sera ensuite menée afin d'évaluer ses performances.

Une validation de la technique d'extraction doit être effectuée avant d'entreprendre le dosage de différents plats complexes: évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité.

MATERIEL ET METHODE

1 Sources et description des échantillons

Dans toute la suite de l'étude, les produits pour lesquels les 2 paramètres (capacité antioxydante totale (TEAC) et composés phénoliques totaux (TPC) seront mesurés), sont des aliments : simples (fruits, légumes et autres ingrédients pouvant rentrer dans une recette alimentaire) ou complexes (préparation à base de viandes, poissons, légumes, féculents), solides ou liquides, crus ou cuits. Ils sont essentiellement dosés dans leur état le plus communément consommé. Ces échantillons proviennent soit directement de l'usine de

fabrication, en ayant contrôlé leur cycle de vie (temps et conditions de stockage, conservation de chaîne du froid lors du transport), soit d'un supermarché de proximité.

Un plat préparé a été choisi comme modèle de plat complexe, afin de valider la méthode d'extraction et de dosage. Bien qu'il soit abusif de considérer un plat comme modèle, dans la mesure où chaque matrice se comporte différemment, pour des raisons économiques et de temps, ce plat, on l'espère, nous apportera une idée du comportement d'une matrice complexe au cours de la recherche d'optimisation des paramètres d'extraction. Ce plat est la tarte saumon oseille vendue sous la marque Marie au rayon frais.

2 Préparations des échantillons

Dans tous les cas l'ensemble de ces étapes a été appliquée :

a) on mixe tout ou une partie représentative de l'aliment ou la préparation culinaire,

b) on extrait dans un solvant organique ou un mélange de solvants organiques et/ou dans de l'eau une quantité précise et homogène du produit obtenu à l'issue de l'étape a), à l'abri de la lumière et à une température et un temps donné.

c) on centrifuge à 6000 tr/min à l'aide d'une centrifugeuse (MR1812) et on filtre (sur un filtre en papier à 0,22µm) l'extrait obtenu, afin de récupérer un extrait limpide.

d) on évalue les propriétés antioxydantes du liquide d'extraction par mesure de la TEAC (Capacité totale antioxydante) et/ou de la TPC (Teneur en phénols totaux) de l'échantillon obtenu à l'issue de l'étape c).

L'étape a) d'homogénéisation peut être réalisée dans un mixeur à grande vitesse ou un hachoir de cuisine (le but recherché étant d'avoir une taille des particules et un mélange de ladite préparation la plus homogène possible et ce pour l'ensemble des échantillons). Une quantité précise et homogène du produit mixé (de $20 \pm 0,1$ g), est ensuite extraite dans un solvant organique, ou un mélange de solvants organiques et/ou dans de l'eau. Le rapport (S/S) solvant /solide devant être toujours le même pour permettre des comparaisons entre les différents aliments ou préparations culinaires.

Le solvant organique ou le mélange de solvants organiques sont tels que choisis parmi l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle-heptane, l'hexane, l'alcool tert-amyle.

La quantité de solvant organique et/ou d'eau dans laquelle est réalisée l'extraction est de $50 \pm 0,1$ ml. La solution obtenue est mise sous agitation entre 1 et 48 heures, de préférence 24 heures et à une température comprise entre 20 et 40°C, de préférence 24h.

Avant l'extraction, le composé est naturellement protégé dans sa matrice alimentaire ; mais une fois cet équilibre détruit par l'extraction, il perd cette protection et est exposé à des conditions de milieu souvent défavorables c'est pourquoi le dosage s'effectuera directement après l'extraction sans conservation pour la TAC.

La mesure de TPC s'effectue le lendemain après préparation :

-10ml du liquide d'extraction est prélevé, l'éthanol est évaporé , puis l'extrait est redilué dans 20 ml d'un mélange monopropylène glycol/eau (50/50 v/v).

3 Mode opératoire du dosage de pouvoir antiradicalaire

3.1 Principe de la méthode TEAC

Comme nous l'avons vu précédemment, la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) est utilisée prioritairement. L'activité antioxydante totale de l'extrait est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS•+, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E.

3.2 Dosage et interprétation

En réagissant avec le persulfate de potassium, l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical ABTS•+, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants. La méthode est standardisée par rapport au Trolox.

Le radical ABTS•+ (absorbant à 734 nm) est formé par arrachement d'un électron e- à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur

de H^+), l'atome d'azote concerné piège un H^+ conduisant à l'ABTS⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

Le radical ABTS^{•+}, en contact avec un donneur de $H^•$ conduit à l'ABTS⁺ et à la décoloration à 734 nm de la solution. La cinétique de réaction de l'antioxydant étudié doit être examinée préalablement pour déterminer la fin de réaction. La capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC) correspond à la concentration (mmole/l ou mg/l) de Trolox ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester. La figure 15 illustre les réactions pouvant avoir lieu.

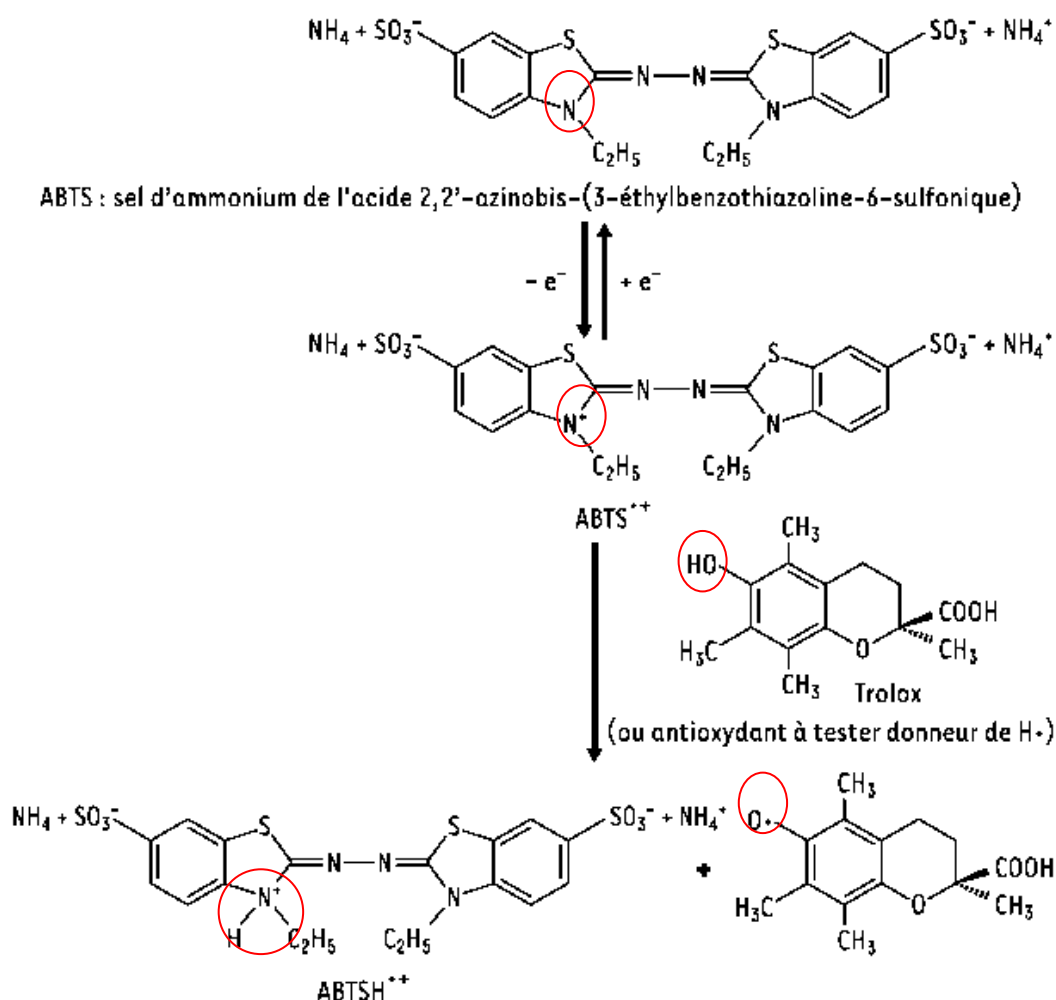


Figure 15: Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H^+

Préparation de la solution d'ABTS•+ pour le dosage

Du persulfate de potassium est ajouté à l'ABTS, le mélange est solubilisé pendant 5 minutes sous agitation dans de l'eau distillée. La solution est ensuite incubée pendant 1 nuit à température ambiante à l'abri de la lumière avant utilisation.

La solution d'ABTS à 7 mM est diluée avec de l'éthanol à une température de 37°C afin d'obtenir une DO de $0,70 \pm 0,02$ à la longueur d'onde de 734 nm.

Courbe d'étalonnage du Trolox :

Du trolox est solubilisé dans un volume adéquat d'éthanol, afin d'obtenir une solution à 2,5 mM. Une courbe d'étalonnage du trolox a été effectuée à partir de différentes dilutions afin d'obtenir le pourcentage d'inhibition pour $1\mu\text{mol/L}$. La concentration finale de Trolox dans l'ABTS devant être comprise entre 0 et $15\mu\text{M}$.

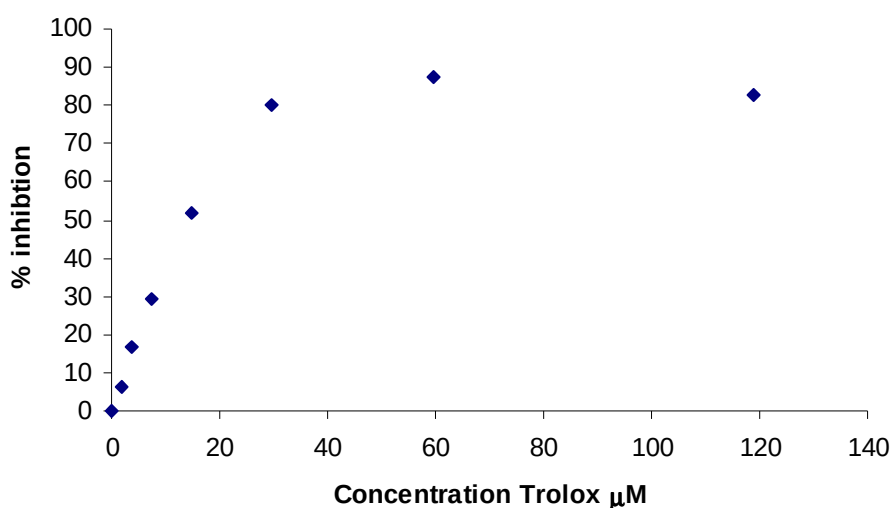


Figure 16 : Exemple de courbe d'étalonnage du Trolox

La figure 16 illustre la courbe représentative du pourcentage d'inhibition du radical en fonction de la concentration de Trolox. De cette courbe est déduite la pente à l'origine, dont le coefficient directeur est caractéristique de la concentration de trolox pour obtenir une inhibition de 1%. Il apparaît que pour obtenir une inhibition de 1% de radicaux, la concentration en trolox doit être de $4,04\mu\text{M}$.

Calcul du pouvoir antioxydant d'extraits alimentaires

La diminution d'absorbance de la solution d'ABTS est caractéristique de la diminution du nombre de radicaux. On ajoute 50µL d'extrait à 1,0ml d'ABTS⁺ ($A_{734nm}=0,70\pm0,02$), l'absorbance est ensuite lue au bout de 15min (temps ajusté caractéristique de la fin de la réaction). Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir de la formule :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{DO_{\text{initial}} - DO_{\text{final}}}{DO_{\text{initial}}} \times 100$$

DO initiale : Densité optique initiale

DO finale : Densité optique finale

La valeur du TEAC du produit est calculée à partir du pourcentage d'inhibition (correspondant à 1g/L d'extrait) dans l'équation de la droite du pourcentage d'inhibition du Trolox. Ceci correspond à la concentration molaire (en µM) de Trolox équivalent permettant d'avoir le même pourcentage d'inhibition pour 1g/L d'extrait.

4 Dosage des phénols totaux

Parmi les méthodes de quantification des composés phénoliques, nous utilisons préférentiellement dans notre laboratoire un protocole utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

4.1 Principe

Ce dosage s'effectue au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1998). Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux, dont l'absorption maximum peut être mesurée à 750 nm ou 660nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide chlorogénique ou acide gallique par exemple) permet de déterminer la quantité de phénols totaux présente dans l'extrait exprimée en mg d'équivalent le phénol de référence.

4.2 Dosage et interprétation

L'éthanol est évaporé de 10ml l'extrait éthanolique d'extraction, pour que seuls les pigments phénoliques soient dosés. L'extrait sec est dilué dans une solution comprenant

50% de mono propylène glycol et 50% d'eau distillée (v/v). On ajoute 1mL d'une solution de Na_2CO_3 à 10% à 1mL de la solution à doser et mis sous agitation pendant 10 minutes à 38°C. Puis 1mL de réactif de Folin (dilué au 1/3 dans de l'eau distillée) a été ajouté et mis sous agitation à température ambiante pendant 15 minutes. Trois mesures de la densité optique ont été effectuées à 660 nm. On réalise une gamme étalon en milieu aqueux avec l'acide gallique. La lecture de l'absorbance à 660 nm se fait sur les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et d'échantillon à différentes dilution.

La TPC a été exprimée en « GA équivalent » (à savoir en mg d'acide gallique équivalent pour 100g d'échantillon frais) grâce à une calibration réalisée avec l'acide gallique.

La TPC indiquée dans les différents exemples est la valeur moyenne de ces trois mesures. L'écart-type est aussi mentionné.

RESULTATS

1 Sélection de solvants

Une première étape consiste à sélectionner plusieurs solvants organiques pouvant convenir aux dosages. Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs solvants peuvent extraire les composés antioxydants et notamment les polyphénols, cependant ils ne sont pas tous compatibles avec les méthodes de dosages, et tous les solvants ne permettent pas une extraction optimale.

Nous avons donc procédé à différents tests permettant de sélectionner seulement quelques solvants. Ces tests ont été effectués par comparaison de résultats entre eux.

Le tableau 16 résume quelques caractéristiques des tests ayant été faits, et nous permet de sélectionner 3 solvants pouvant potentiellement convenir à une extraction optimum sur des plats complexes.

Tableau 16 : Tableau récapitulant différents tests de solvants effectués

Solvants	Caractéristiques	Test
Eau	Mauvaise extraction des composés antioxydants	oui
Acétone	Solvant trop volatile (non compatible avec le protocole de dosage)	oui
Acétate d'éthyle	Formation d'un précipité (incompatibilité avec la méthode)	oui
Heptane	Mauvaise extraction	oui
Mélange Eau /éthanol	Moins bonne extraction / éthanol seul	oui
Éthanol	Compatible avec le protocole de dosage	oui
Hexane	Compatible avec le protocole de dosage	oui
M ₂ B ₂ (Alcool tert-amyle)	Compatible avec le protocole de dosage	oui

Seulement trois solvants sont compatibles avec notre méthode de dosage et seront inclus dans notre plan d'expérience.

Un mélange (eau 50%-éthanol 50%) a été testé, d'autres mélanges dans différentes proportions auraient pu être testés, cependant compte tenu des tests plausibles pouvant être effectués, nous ne pouvions tester l'ensemble des mélanges pouvant jouer sur l'extraction.

2. Plan d'expériences : amélioration de certains paramètres d'extraction

L'objectif de cette partie est de rechercher, parmi 3 paramètres fixés, quels sont les meilleures conditions d'extraction pour une matrice alimentaire donnée. Pour une question de temps, nous ne pouvons rechercher à optimiser tous les paramètres affectant l'extraction sur chaque matrice alimentaire.

Nous avons choisi d'optimiser 3 facteurs : le temps, la température et le solvant d'extraction. La taille des particules est difficile à faire varier, nous utiliserons un hachoir ménager pour l'ensemble des préparations. Une agitation constante sera adoptée pour l'ensemble des extractions. L'extraction se fait avec 25g de tarte dans 50ml de solvant à des températures variant entre 32,5 et 40°C, et d'une durée variant de 4 à 48h. Pour chaque expérience, le volume de solvant et le poids du produit sont identiques, et l'extraction se fait à l'abri de la lumière. Le dosage de capacité antiradicalaire est la réponse expérimentale à optimiser, il se fait immédiatement après l'arrêt de l'extraction.

L'objectif du plan d'expérience est d'établir un nombre minimal d'expérience afin d'obtenir des informations expérimentales de qualité suffisantes pour répondre à notre problématique : « Quel triplet solvant, température et temps permet d'obtenir le meilleur rendement d'extraction sur une matrice complexe ? ».

Le plan d'expérience est construit à partir du domaine expérimental suivant :

- Température : entre 32,5°C et 40°C
- Temps : entre 4 et 48h
- Solvant : Hexane, Ethanol, M₂B₂

L'objectif est de pouvoir prévoir en tout point intérieur au domaine expérimental (et si possible au voisinage) la valeur de la réponse expérimentale, grâce à un modèle empirique que nous proposera le logiciel utilisé (MODDE 7 UMETRICS). Le plan factoriel complet sur les variables quantitatives (temps et température) est adopté.

A partir de ce domaine expérimental, le logiciel propose un plan d'expérience comportant 12 expériences, et 3 expériences nous permettant de tester la répétabilité au centre du domaine expérimental.

2.1 Résultats du plan d'expériences

Voici la mise en place du plan d'expérience : 15 expériences sont réalisées, les résultats des expériences étant l'activité antiradicalaire exprimée en μmol de Trolox.

Un problème de réglage de température de bain marie a engendré des extractions à 36°C, au lieu de 25°C. Ceci n'influencera pas l'efficacité de prédiction des résultats à travers ce plan d'expériences.

Tableau 17 : Matrice des résultats du plan d'expériences

N° exp	T°C	Temps	Solvant	TEAC μM Trolox/g
1	36°C	48h	M ₂ B ₂	0,75
2	36°C	4h	Ethanol	1,11
3	36°C	48h	Ethanol	1,2
4	36°C	4h	M ₂ B ₂	0,47
5	36°C	4h	Hexane	0,21
6	36°C	48h	Hexane	0,17
7	32,5°C	26h	Ethanol	1,83
8	32,5°C	26h	Ethanol	1,75
9	32,5°C	26h	Ethanol	1,58
10	40°C	48h	Hexane	0,33
11	40°C	4h	Hexane	0,27
12	40°C	4h	M ₂ B ₂	0,75
13	40°C	48h	Ethanol	0,93
14	40°C	4h	Ethanol	1,11
15	40°C	48h	M ₂ B ₂	0,75

Le modèle empirique choisit est validé par un coefficient de corrélation entre la réponse expérimentale et la réponse prédite. Le coefficient de corrélation est satisfaisant : $r = 0,98$ (test de fiabilité des résultats). Le coefficient de variation est acceptable, puisqu'il est de 7,42% sur les points centraux.

2.2 Matrice des coefficients et des interférences entre les différents paramètres

A partir du modèle de prédiction mathématique choisit, voici la matrice des coefficients représenté par le Tableau 18 :

Tableau 18 : Matrices des coefficients et des interférences entre différents paramètres d'extraction

X1 : Temps

X2 : Température

X3(A) : Ethanol

X3(B) : M₂B₂

X3(C) : Hexane

X1*X3(A) : Interaction

entre le temps d'extraction

et le solvant

DF : Degré de liberté

Coefficient SC : Coefficient

du facteur dans le modèle

mathématique choisit

P : P value

Conf.int : Intervalle de

confiance

Y	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)
Constant	0.732561	0.113749	0.00134186	0.292402
X1	0.133392	0.134846	0.36798	0.346633
X2	-0.0523315	0.149184	0.740046	0.383491
X3	DF = 2			
X3(A)	0.929698	0.124052	0.00066856	0.318886
X3(B)	-0.242705	0.176415	0.227327	0.45349
X3(C)	-0.686992	0.176415	0.0114764	0.45349
X1*X2	-0.169625	0.17281	0.371389	0.444222
X1*X3	DF = 2			
X1*X3(A)	-0.0321498	0.0651706	0.64269	0.167527
X1*X3(B)	0.0613249	0.0651706	0.389914	0.167527
X1*X3(C)	-0.029175	0.0651706	0.673119	0.167527
X2*X3	DF = 2			
X2*X3(A)	-0.668287	0.171165	0.0113594	0.439994
X2*X3(B)	0.316425	0.228296	0.22437	0.586855
X2*X3(C)	0.351862	0.228296	0.18389	0.586855

Cette matrice des corrélations nous permet de conclure que l'éthanol a un effet positif sur l'extraction ($p < 0,05$), alors que l'hexane influe de manière négative sur l'extraction ($p < 0,05$). L'hexane n'est donc pas le solvant à utiliser. On ne peut rien conclure quant aux interactions temps -température. Ce tableau nous permet simplement de conclure que le solvant à utiliser est préférentiellement l'éthanol.

2.3 Courbes d'iso-réponse

Dans la mesure où l'éthanol a été établi comme apportant le meilleur d'extraction par rapport aux deux autres testés, la courbe de prédiction des réponses peut nous apporter les informations nécessaires quant aux autres paramètres. Il est possible de calculer une réponse prévisionnelle en fonction de la température et du temps d'extraction dans le domaine expérimental testé (et aux alentours).

La Figure 17 est une représentation des courbes d'iso-réponse prévisionnelles en fonction du temps et de la température d'extraction testée.

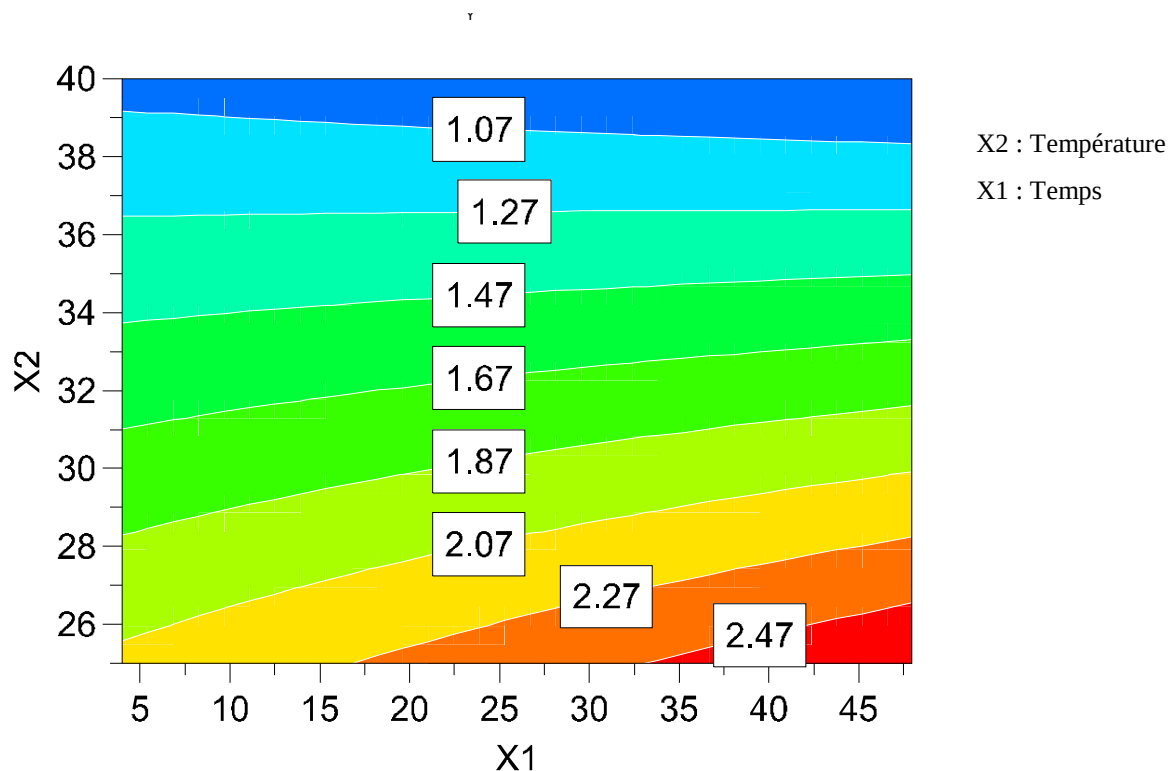


Figure 17 : Courbes d'iso réponse du plan d'expériences

Les résultats des courbes d'iso-réponse, nous permettent de conclure, que le rendement d'extraction est le meilleur lors d'une extraction à basse température et pendant une période longue.

D'autres modèles prévisionnels ont été testés, et nous permettent tous de conclure que le rendement d'extraction est le plus élevé pour des températures basses et à des temps longs. Cependant selon tous les modèles testés l'optimum de temps ne converge pas toujours vers 48h. Il apparaît donc que le nombre d'expériences réalisées est un facteur limitant pour fixer exactement un temps d'extraction optimum.

Pour la suite de l'étude, nous avons donc choisi de procéder à des extractions à 25°C pendant 24h (ce qui est une durée d'extraction relativement longue).

3 Validation du protocole de dosage

Le plan d'expérience a été établi en fixant 3 critères (temps, température, solvant) sur une réponse (la capacité antiradicalaire totale), d'autres paramètres peuvent influencer sur

l'extraction, il nous a paru nécessaire, de tester quelques un de ces autres paramètres afin de valider notre modèle d'extraction.

3.1 Effet Méthanol/Ethanol

La plupart des auteurs montrent que le méthanol est un meilleur solvant d'extraction que l'éthanol. Dans la mesure où nous ne l'avons pas pris en compte dans notre plan d'expérience, il nous a paru nécessaire de faire un test préalable sur notre matrice complexe. Ainsi, nous avons comparé l'activité antioxydante totale, ainsi que la teneur en phénols totaux d'une même matrice ayant été extraite à 25°C pendant 24h soit à l'éthanol, soit au méthanol. Les résultats sont les moyennes de dosages d'un même extrait.

Les figures 18 et 19 illustrent les résultats obtenus suivant les différentes extractions.

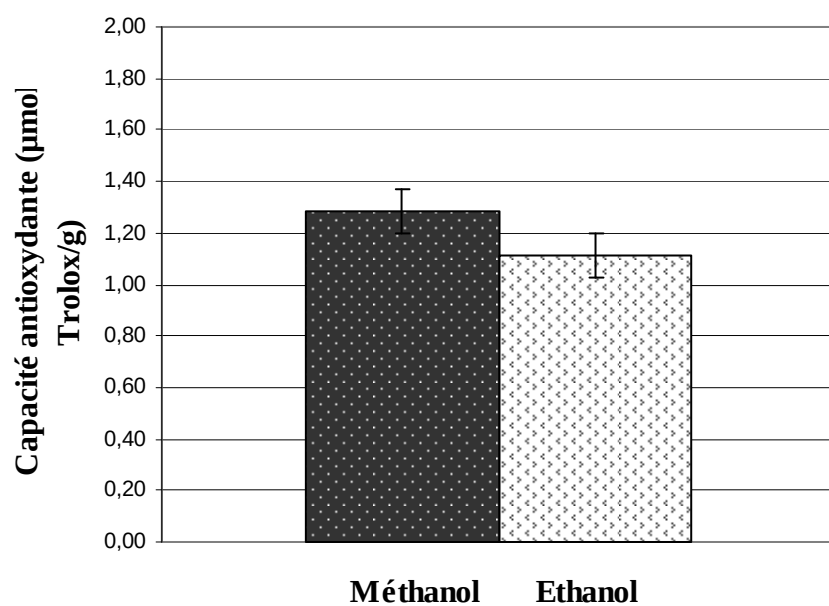


Figure 18 : Activité antiradicalaire en fonction du solvant d'extraction utilisé (méthanol ou éthanol)

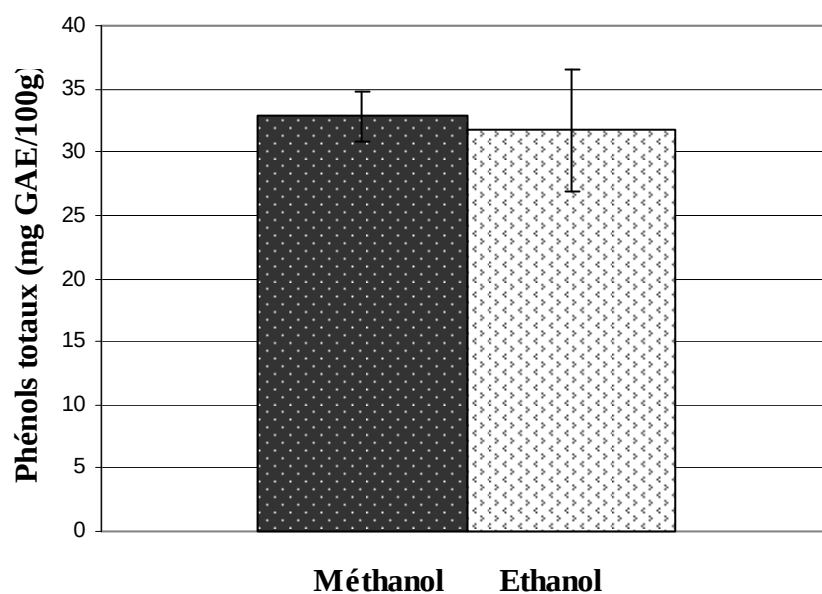


Figure 19 : Quantité de phénols totaux en fonction du solvant d'extraction utilisé (méthanol ou éthanol)

Il n'y a pas de différence significative entre l'extraction à l'éthanol et au méthanol dans les mêmes conditions de mesure sur notre matrice. Il semblerait donc, que le méthanol puisse être évité comme solvant d'extraction.

Les résultats en valeur absolue de ces tests ne peuvent être comparés avec ceux du plan d'expérience car ils ont été réalisés sur une recette modifiée de la tarte et avec un spectromètre différent. Ceci peut expliquer les différences observées d'activité antiradicalaire.

3.2 Test de l'effet volume solvant

Comme nous l'avons vu au préalable, le rapport S/S (solvant sur solide) est un facteur limitant de l'extraction quand celui-ci n'est pas assez grand. Cependant dans un souci économique et écologique, nous ne pouvons utiliser trop de solvant.

Nous avons donc fait un test d'extraction en doublant le volume de solvant (100ml) par rapport à notre plan d'expérience : $20 \pm 0,1$ g de tarte dans 50 ou 100ml d'éthanol.

Les résultats apparaissent dans les figures 20 et 21

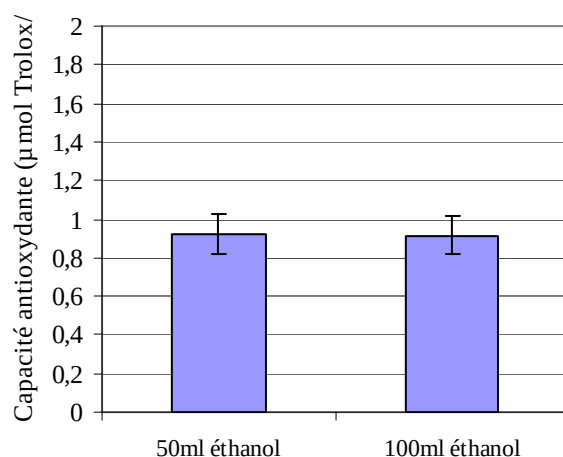


Figure 20 : TEAC en fonction du volume de solvant utilisé

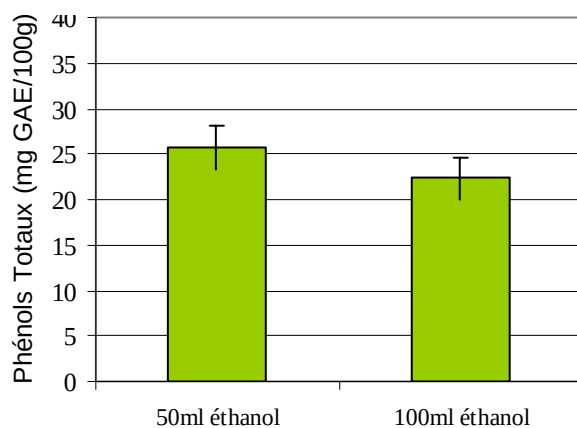


Figure 21 : Phénols totaux en fonction du volume de solvant utilisé

Il n'y a pas d'augmentation du rendement d'extraction en doublant le volume de solvant. Pour ce plat, il n'y a donc pas de saturation du solvant pour un volume de 50ml. Lors de l'utilisation d'aliment ayant un très fort pouvoir antiradicalaire, ce rapport pourra s'avérer trop petit, dû à une saturation de solvant, il devra alors être ajusté.

3.3 Comparaison avec des aliments simples de la littérature

Même si il est déconseillé de comparer les résultats obtenus dans différentes conditions expérimentales. Certains aliments ont fait l'objet de plusieurs études, et lorsque c'est possible une comparaison de nos résultats avec d'autres auteurs fait partie intégrante de la validation de notre protocole.

Voici le tableau récapitulatif, de la comparaison de la capacité anti-radicalaire totale et de la teneur en phénols totaux de l'oignon jaune et de la tomate avec les résultats d'autres auteurs (Tableau 19).

Tableau 19 : Comparaison des résultats avec ceux de la littérature

	TEAC (μ mol Trolox/g)	Phénols totaux (mg Acide gallique/100g)	Références
Oignon jaune	1,82		Pellegrini (2003)
		71	Chu (2002)
		90 à 150	Wu (2004)
	3,1	151	NOUS
Tomate	1,65		Pellegrini (2003)
	1,37 et 2,09	30 et 52	Podsdek (2003)
		38	Chang (2006)
	2,05	41	NOUS

D'après ce tableau, nous pouvons considérer que nous sommes dans les mêmes ordres de grandeurs que la littérature pour ces deux aliments. Les différences observées pouvant être dues à différents paramètres ; aux conditions de dosages, mais également aux variabilités entre cultivars (comme nous l'avons vu en détail dans le Chapitre 4 Partie 2 pour un même aliment les teneurs en phénols totaux peuvent aller du simple au double en fonction des différents cultivars ou en fonction d'autres paramètres tels que le conservation).

3.4 Répétabilité intra-échantillon

Ce test permet d'appréhender l'uniformité de la préparation des échantillons, en effet, dans la mesure où seulement une partie du plat est testée ($20 \pm 0,1\text{g}$), il convient de vérifier si cette partie est représentative de l'ensemble du plat. Après homogénéisation de l'échantillon, 5 parties de 20g ont été extraites et dosées de façon indépendante, les résultats sont représentés dans les figures 22 et 23 ci-après.

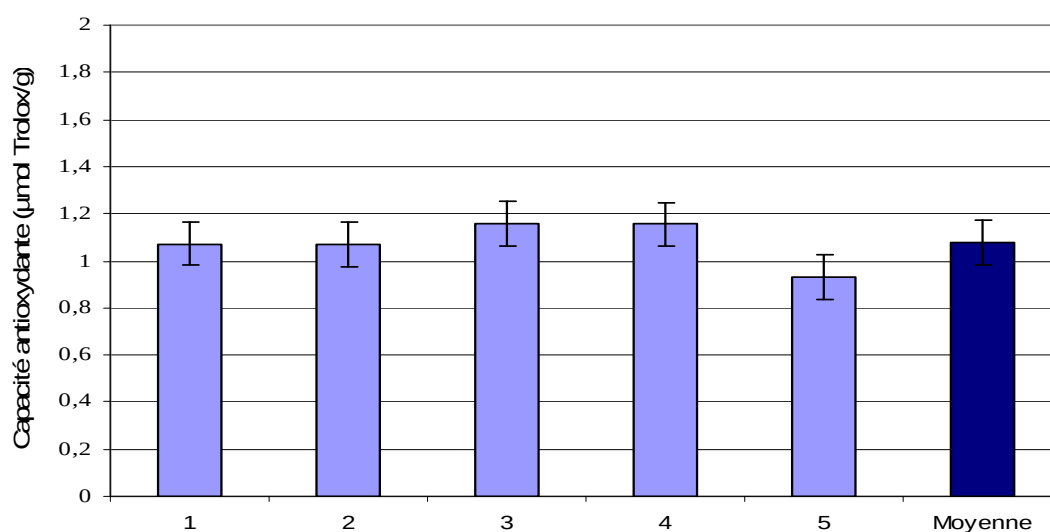


Figure 22 : Test de la répétabilité intra-échantillon sur la valeur TEAC (n=5)

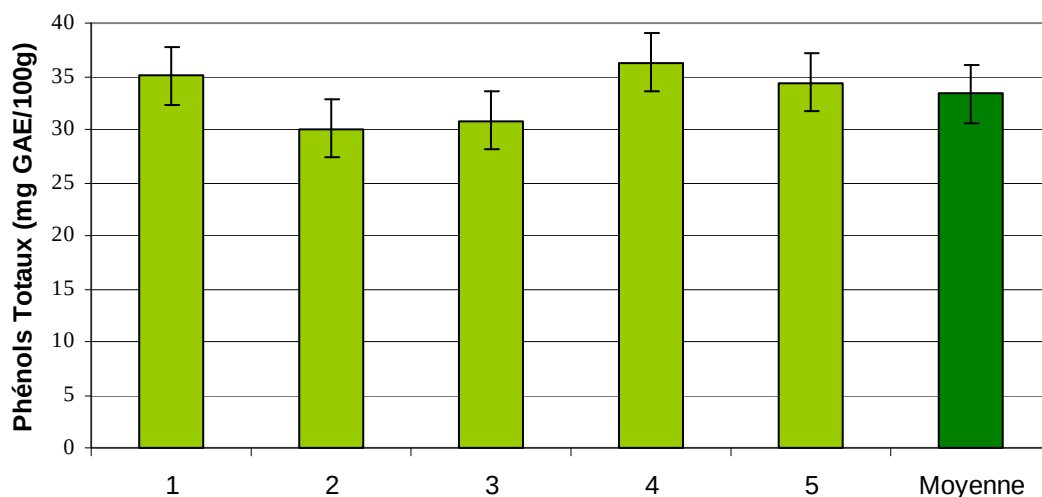


Figure 23 : Test de la répétabilité intra-échantillon sur la teneur en phénols totaux (n=5)

Il apparaît que quelle que soit la partie de l'échantillon testé après son homogénéisation, il n'y a pas de variation significative sur la TEAC et la TPC (les coefficients de variation intra-tarte étant respectivement de 8,6% et 8,2% pour les deux paramètres testés). L'homogénéisation réalisée est donc suffisante.

3.5 Répétabilité inter-échantillons

Ce test permet de rendre compte des variations pouvant subvenir entre différentes fabrications sur un même produit. Nous avons testé les 2 paramètres (TEAC et TPC) sur 5 tartes provenant de différentes fabrications (mais ayant la même recette).

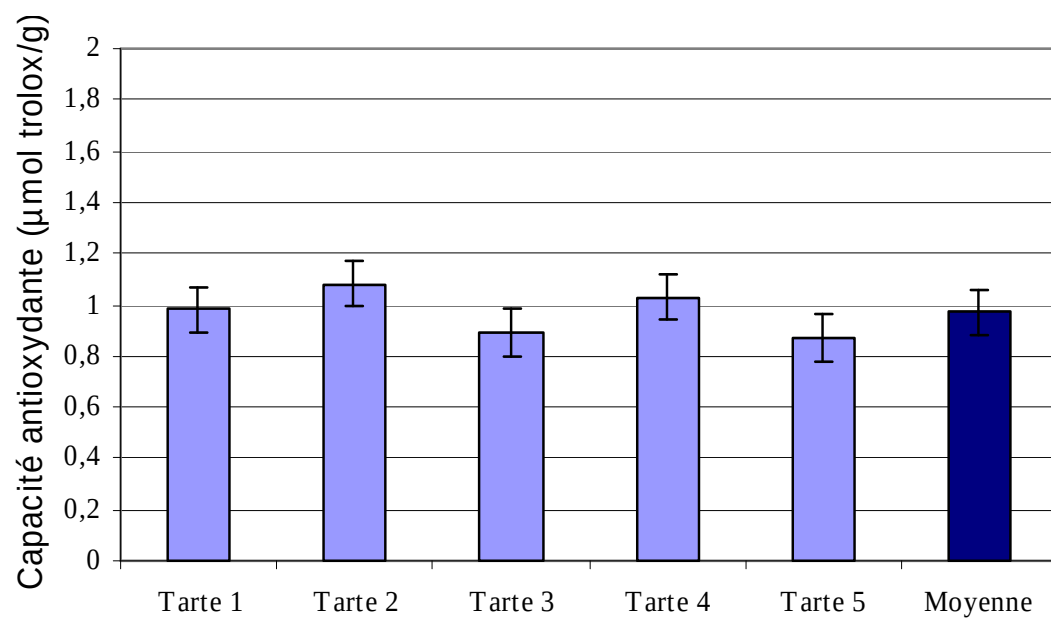


Figure 24 : Test de la répétabilité inter-échantillons sur la valeur TEAC (n=5)

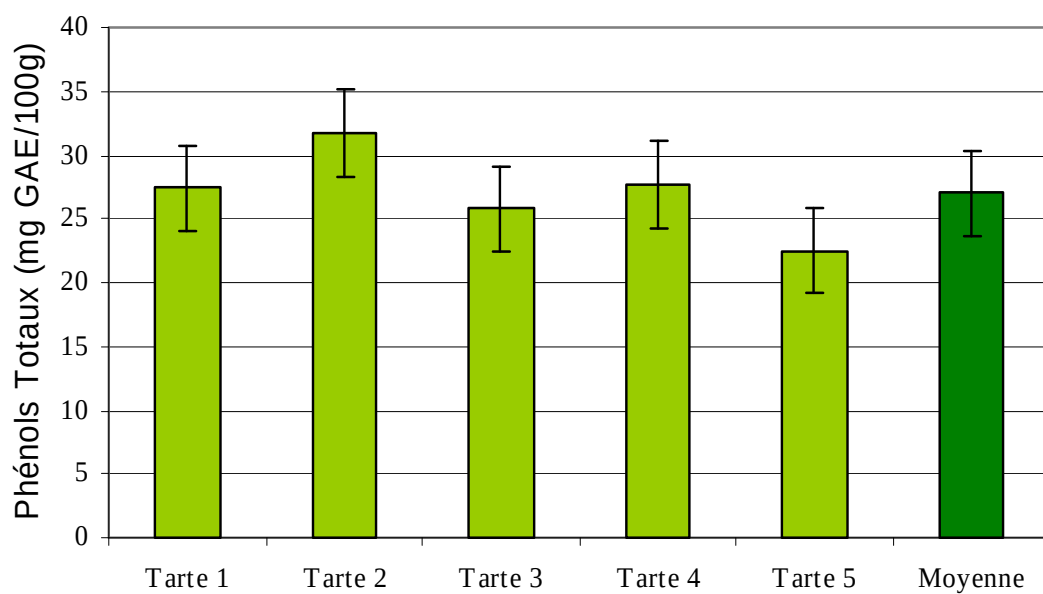


Figure 25 : Test de la répétabilité inter-échantillons sur la teneur en phénols totaux (n=5)

D'après ces graphes, nous trouvons une bonne répétabilité entre différents échantillons d'une même recette. Les coefficients de variations sont de 9,3 % pour la valeur TEAC et 12,4% pour les teneurs en phénols totaux.

Les différentes variations peuvent être dues aux différentes quantités d'incorporation d'ingrédients pouvant intervenir au cours de la fabrication du produit, ou même être dues à l'hétérogénéité de composition entre les ingrédients en fonction des fournisseurs. Dans la mesure où nous travaillons sur des plats préparés ayant un nombre d'ingrédients considérable, nous augmentons cette probabilité de variation. Ce test nous permet tout de même de limiter le nombre de dosages pour la suite de l'étude dans la mesure où il existe une faible variabilité entre plats de même recette.

DISCUSSION

1 Sur la préparation des échantillons

L'extraction de composés antioxydants est généralement effectuée directement à partir d'une matière végétale, telle qu'une plante ou une algue, qui a, par exemple, été au préalable séchée. Ce procédé permet d'exprimer les résultats sur matière sèche. Cependant, suivant le procédé de séchage, celui-ci peut occasionner des pertes significatives en composés antioxydants. Le séchage à haute température ou par un traitement prolongé engendre une baisse d'activité, c'est notamment le cas de la tomate lors d'un séchage à 42°C, pour laquelle a été noté une baisse d'activité, de ses composés polyphénoliques ainsi que son taux de vitamine C (Kerkhofs *et al.*, 2005). Cette perte serait minimisée lors d'une lyophilisation (Perez-Jimenez *et al.*, 2008). Plusieurs auteurs ont également observé une augmentation d'activité antiradicalaire après certains procédés de séchage (Cheng *et al.*, 2006; Mrkic *et al.*, 2006), due à la formation de nouveaux composés (molécules de la réaction de Maillard, structures polymériques de polyphénols ayant une forte activité antioxydante).

Le dosage des différents paramètres s'effectue dans notre cas sur matière « fraîche », ceci permet de limiter les pertes dues à ce procédé et d'évaluer ces indices sur un grammage réellement consommé.

Les conditions de mixage lors de la préparation des échantillons peuvent également avoir un impact sur les propriétés de ces échantillons. En effet, lors de ce procédé,

l'échantillon doit être exposé au minimum à l'air, afin d'éviter une oxydation (Perez-Jimenez *et al.*, 2008). Le fractionnement des particules permet cependant une libération des antioxydants de la matrice alimentaire qui sont alors mieux exposés en surface et permettrait une meilleure pénétration dans le solvant. Notons que la phase d'extraction est de toute façon une phase limitante, car elle génère une destruction de la matrice alimentaire et peut ainsi interférer sur les résultats.

2 Extraction au solvant

La capacité antioxydante totale d'extraits d'aliments est la plus part du temps obtenue à partir de solvant organiques. Comme nous l'avons précisé, aucun solvant est satisfaisant pour extraire la totalité des antioxydants présent dans une matrice alimentaire complexe, et spécifiquement lorsque ceux –ci tels que les composés phénoliques sont associés à des hydrates de carbones ou des protéines. Par conséquent, il peut exister une quantité non négligeable d'antioxydants restant dans les résidus d'extraction, qui est la plus part du temps ignorée lors des études chimiques et biologiques (Perez-Jimenez *et al.*, 2008).

L'extraction par les fluides supercritiques se présente de plus en plus comme une alternative aux techniques classiques d'extraction liquide-solide pour la préparation d'échantillons d'origine diverses. En effet, l'extraction par solvant possède un certain nombre d'inconvénients tant au niveau de la toxicité, de la durée, du coût et de la pollution de l'environnement.

2.1 Interférences possibles

Alors que tous les polyphénols peuvent ne pas être extraits, certaines autres molécules sont susceptibles de l'être. En effet, lors d'une extraction au solvant organique, l'extrait initial peut contenir d'autres molécules comme des sucres, des protéines, des acides aminés, des sels minéraux. Ces composants peuvent interférer avec les méthodes de dosage. Perez (2006) testa par exemple l'activité antiradicalaire de différents constituants tels que le glucose, la pectine, l'acide galacturonique, la tyrosine, le tryptophane, l'arginine, la cystéine et l'albumine, avec les 4 méthodes les plus répandues (ABTS, ORAC, FRAP, DPPH). Il montre alors que, la cystéine est le seul composant ayant une activité avec la méthode FRAP et l'arginine et la cystéine avec le test DPPH. Par contre, les tests ORAC et ABTS donnent des

valeurs positives pour tous les acides aminés et les protéines. Les glucides choisis ne reflètent dans aucun cas d'activité. Ces résultats indiquent que les protéines et acides aminés présents à forte concentration dans les aliments peuvent produire des interférences avec les tests de capacité antiradicalaire et ainsi générer une surestimation des résultats. Ils concluent que les activités antiradicalaire de plusieurs aliments ne peuvent être comparées que dans la méthode de dosage et en utilisant le même solvant d'extraction (Perez-Jimenez & Saura-Calixto, 2006).

2.2 Choix de l'éthanol

Ce solvant nous permet d'éliminer une partie des protéines, en effet, on peut facilement précipiter les protéines en présence d'éthanol 80%. La centrifugation permet alors de sédimenter les protéines précipitées. Il faut souligner cependant que la précipitation n'est pas complète, car certaines protéines sont plus ou moins solubles dans l'éthanol. Une variante plus efficace utilise de l'acétone car, contrairement à l'éthanol, très peu de protéines sont solubles dans l'acétone. Cependant, nous l'avons vu l'acétone n'est pas compatible avec notre méthode de dosage, notre choix qu'est l'éthanol restera donc la meilleure alternative.

2.3 Optimisation de l'extraction

Un plan d'expériences a été effectué afin d'améliorer certaines conditions d'extraction sur une matrice complexe, dans le cas idéal il aurait fallu établir un plan d'expériences pour chaque matrice alimentaire. C'est le cas d'une étude sur l'algue, où un plan d'expérience a été effectué afin d'obtenir un meilleur rendement d'extraction pour cette algue (Herrero *et al.*, 2005), de même pour les anthocyanes de tournesol (Gao & Mazza, 1996).

Seulement certains paramètres ont été testés et les conditions obtenues sont appliqués à l'ensemble des échantillons. Les conditions obtenues ne sont pas des conditions idéales, mais des conditions d'amélioration d'extraction par rapport à une matrice donnée. D'autres paramètres auraient pu être optimisés, telle l'acidification du milieu ou des tests d'extractions successives avec un ou plusieurs solvants.

Les résultats obtenus par la suite seront donc considérés donc comme des indices d'activités comparables essentiellement dans les mêmes conditions de mesure.

CHAPITRE 4 : Etude comparative de la capacité antiradicalaire d'aliments simples et complexes, effet de la formulation et du traitement industriel

La préparation des échantillons a été réalisée de la même manière aussi bien pour les aliments que pour les préparations culinaires, afin de pouvoir établir des comparaisons significatives au niveau des propriétés antioxydantes.

MATERIEL ET METHODE Complémentaire

1 Sources et description des échantillons

1.1 Aliments dits « simples » ou « potentiels ingrédients »

La sélection des aliments a été effectuée en fonction :

- de leurs valeurs de TEAC et TPC connues de la littérature, et donc supposés être de « bons candidats » quant à leurs propriétés antioxydantes,
- de leur fréquence de consommation.

De plus, la sélection s'est effectuée en choisissant différents groupes d'aliments, et ce, afin de cibler un très grand nombre d'antioxydants différents, présents dans les divers groupes d'aliments.

Les groupes d'aliments sélectionnés sont les suivants :

- les fruits (n=5): clémentine, fraise, raisin noir, olive verte, tomate fraîche
- les légumes (n=2) : oignon jaune, poivron vert,
- les boissons (n=2) : jus d'orange pasteurisé, le vin rouge, et
- divers autres aliments (n=5) : huile d'olive, lentilles cuites, moutarde, persil frais, chocolat noir.

Les aliments sélectionnés ont été préparés avant extraction de la même manière que lors d'une consommation réelle. Ainsi, les lentilles et les poivrons ont été cuits, avant l'extraction et le dosage. Nous avons choisi de doser la tomate fraîche non cuite.

Cette étape de préparation était nécessaire, pour que les valeurs de TEAC et de TPC soient représentatives d'aliments réellement consommés.

1.2 Plats préparés

Afin de refléter au mieux les habitudes alimentaires des consommateurs, il est intéressant d'étudier des plats cuisinés industriels. Seules de faibles quantités d'aliments sont de nos jours ingérées sous leur forme naturelle. La grande majorité des aliments consommés sont à l'heure actuelle transformés.

Les échantillons utilisés pour les plats cuisinés sont des plats cuisinés vendus en France sous la marque « Marie[®] ». Ces plats provenaient directement de l'usine de fabrication (5 jours après leur fabrication, conservés au froid durant leur transport).

Les plats cuisinés ont été classés ci-après en trois catégories :

- Les plats cuisinés frais, à base de poisson ou de viande avec un accompagnement tel que du riz, des pommes de terre, des pâtes ou bien encore des légumes. Ils sont vendus en portion individuelle, en moyenne d'un poids de 300 g. Ils sont déjà cuits, et les consommateurs doivent les réchauffer au micro-onde.
- Les plats cuisinés surgelés, à base de pâtes, de riz, de pommes de terre avec divers assaisonnements. Ils sont généralement vendus par paquet de 1 kg, et sont précuits ou cuits et doivent être réchauffés.
- Les tartes, à base de légumes ou poisson. Elles sont vendues déjà cuites, devant être réchauffées.

Le détail des recettes se trouve dans l'Annexe 1.

2 Mode opératoire dosage

La préparation des échantillons a été réalisée de la même manière aussi bien pour les aliments que pour les plats cuisinés, afin de pouvoir établir des comparaisons significatives au niveau des propriétés antioxydantes entre eux.

Ainsi, dans l'ensemble des exemples, une quantité homogène précise de $20 \pm 0,1$ g du mélange d'aliments ou de l'aliment a été extraite avec 50 ml d'éthanol sous agitation pendant 24 heures à 25 °C à l'abri de la lumière.

L'extrait obtenu a été centrifugé à 6000 tr/min pendant 15 minutes. Le surnageant a été collecté, puis filtré à 22 µm sur papier filtre, pour obtenir un extrait éthanolique de l'aliment ou du mélange d'aliments. Les mesures de la TEAC et de la TPC ont été dosées sur les extraits obtenus. Ces mesures ont été élaborées comme précédemment décrite dans le protocole général.

Les résultats indiqués ci-après sont les valeurs moyennes de trois mesures. L'écart-type est aussi mentionné.

L'effet de la formulation sera testé, ainsi que l'impact de la conservation (la consommation du plat pouvant être différée par rapport au moment de l'achat de l'aliment ou de la préparation culinaire) et du réchauffement culinaire.

RESULTATS

1. Aliments dits « simples » ou potentiels ingrédients

L'analyse des 14 échantillons a montré une grande variation de la TPC et de la TAC parmi les différents aliments testés et les différents types d'aliments sélectionnés, comme en témoigne le Tableau 20.

Tableau 20 : Pouvoir antioxydant et Phénols Totaux de différents types d'aliments classé par ordre décroissant de leur pouvoir antiradicalaire.

	TEAC		Phénols Totaux	
	$\mu\text{mol Trolox/g}$	Ecart-type	mg GAE pour 100g de produit	Ecart-type
Vin Rouge	27,35	0,71	338,59	29,72
Persil	19,00		368,89	
Moutarde	10,27	0,24	719,34	8,69
Fraise	9,88	0,28	135,81	7,93
Chocolat	9,25	0,27	214,86	1,67
Raisin	8,58	0,73	182,47	1,44
Olives vertes	4,97	0,03	110,73	8,55
Poivron vert	4,31	0,04	108,97	2,10
Lentilles	4,23	0,10	67,52	1,59
Oignon	3,10	0,19	151,61	0,68
Clémentine	2,41	0,07	118,85	13,87
Jus d'orange	2,40	0,02	89,20	11,11
Tomate fraîche	2,05	0,13	41,37	3,80

La TEAC a des valeurs comprises entre 2 $\mu\text{mol TE/g}$ (tomate) et 27,4 $\mu\text{mol TE/g}$ (vin rouge).

La TPC a des valeurs comprises entre 41,4 mg GAE (tomate) à 719 mg GAE (moutarde).

Les aliments contenant le plus de phénols totaux et ayant des activités anti radicalaires particulièrement fortes sont le vin rouge, le persil et la moutarde. Le vin rouge et le persil sont reconnus pour avoir un fort pouvoir antioxydant (Katalinic *et al.*, 2006; Saura-Calixto & Goni, 2006), cependant, la moutarde n'est que plus rarement étudiée.

La comparaison avec la bibliographie reste compliquée comme nous l'avons soulevée précédemment. Lorsque les études ont été faites avec la même méthode de mesure, et exprimée avec les mêmes unités, le plus souvent une autre technique d'extraction a été utilisée ou un autre solvant d'extraction. Quelques comparaisons peuvent cependant être faites bien que la méthode d'extraction soit différente.

Ainsi, Pellegrini *et al.*, (2003) dose plusieurs types d'aliments avec différents types d'extraction selon l'aliment considéré. Par exemple, les antioxydants des légumes sont extraits par extraction successive avec de l'acétone et de l'eau. Les résultats de cette étude sont exprimés en μmol de trolox par poids frais. Voici les comparaisons pouvant être faites avec nos résultats (Pellegrini 2003 / Résultats obtenus): tomate salade 1,65 / 2,05 μmol

Trolox/g, clémentine 3,10 / 2,81 $\mu\text{mol Trolox /g}$, raisin rouge 3,85 / 8,58 $\mu\text{mol Trolox /g}$. Les données restent dans le même ordre de grandeur compte tenu des différences entre cultivars pouvant avoir lieu. D'autre part, si nous comparons nos résultats avec ceux de Brat (2006), le persil que nous avons utilisé a une teneur en équivalent acide gallique nettement supérieur à la leur (368,9 / 280,2 mg GAE).

Cette étude prend en considération l'activité et le taux de phénols sur des poids frais, c'est pourquoi, des aliments ayant un plus faible taux de matière sèche tel que la tomate, se classent dans les aliments ayant une faible activité antioxydante. La moutarde apparaît être une très bonne source de phénols dans la ration alimentaire par rapport au persil, compte tenu de la dose habituellement ingérée lors d'un repas. La figure 26 permet de visualiser l'apport en équivalent Trolox de chacun des aliments dosés, ainsi il apparaît que le persil a un très fort pouvoir antioxydant par gramme, ainsi qu'un très fort taux en phénols totaux, cependant il ne participera que dans une faible proportion dans la capacité antioxydante totale ingérée par jour.

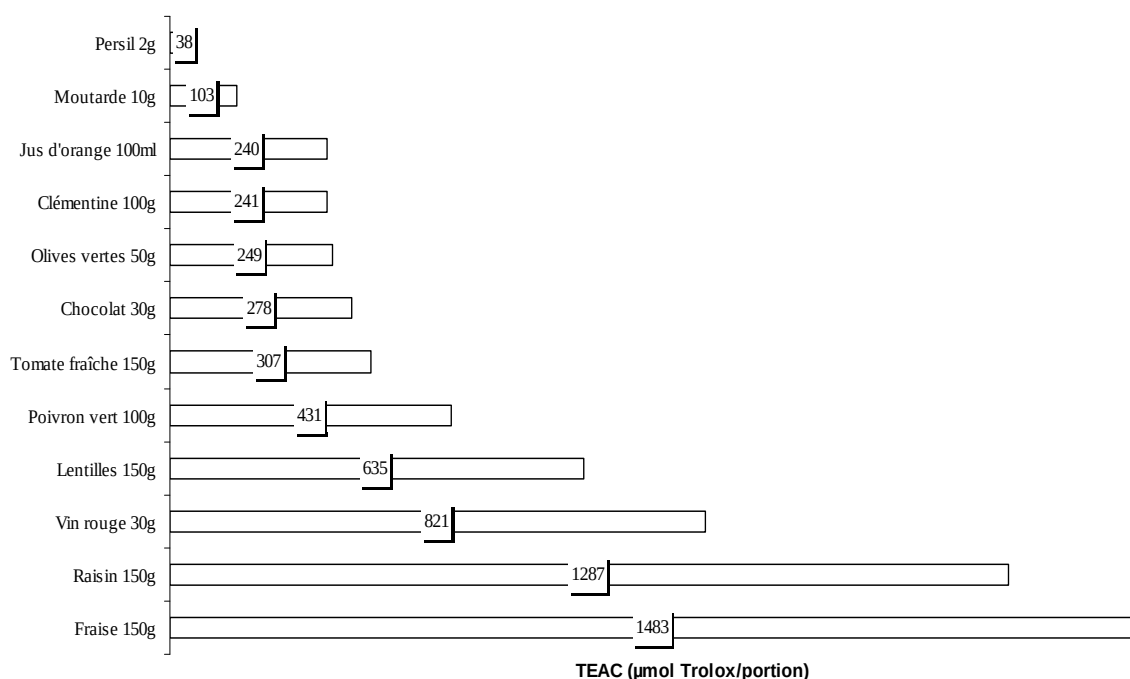


Figure 26 : Comparaison de l'apport de chaque portion d'aliment (en équivalent μmol de Trolox)

Parmi les aliments étudiés, la consommation d'une portion de 150g de fraise apporterait un équivalent de 1483 μmol de Trolox, alors que 2 g de persil apporterait l'équivalent de 38

μmol de Trolox. Plusieurs auteurs insistent sur le fait que certaines épices et aromates apportent une forte activité antioxydante, cependant, si l'on considère leur ingestion à la portion, leur apport reste relativement faible.

La consommation d'aliments ayant un fort pouvoir antiradicalaire doit s'accompagner d'une consommation régulière afin de pouvoir considérer leur apport significatif dans une alimentation globale (Saura-Calixto & Goni, 2006).

2 Corrélation entre la TEAC et la TPC d'ingrédients

Une corrélation significative entre la TEAC et la TPC (qui avait déjà été évoquée dans par plusieurs auteurs), exceptés pour la moutarde et le vin rouge ($r=0,90$, $p<0,05$, $n=11$) a pu être relevée de ces mesures d'aliments (Figure 27).

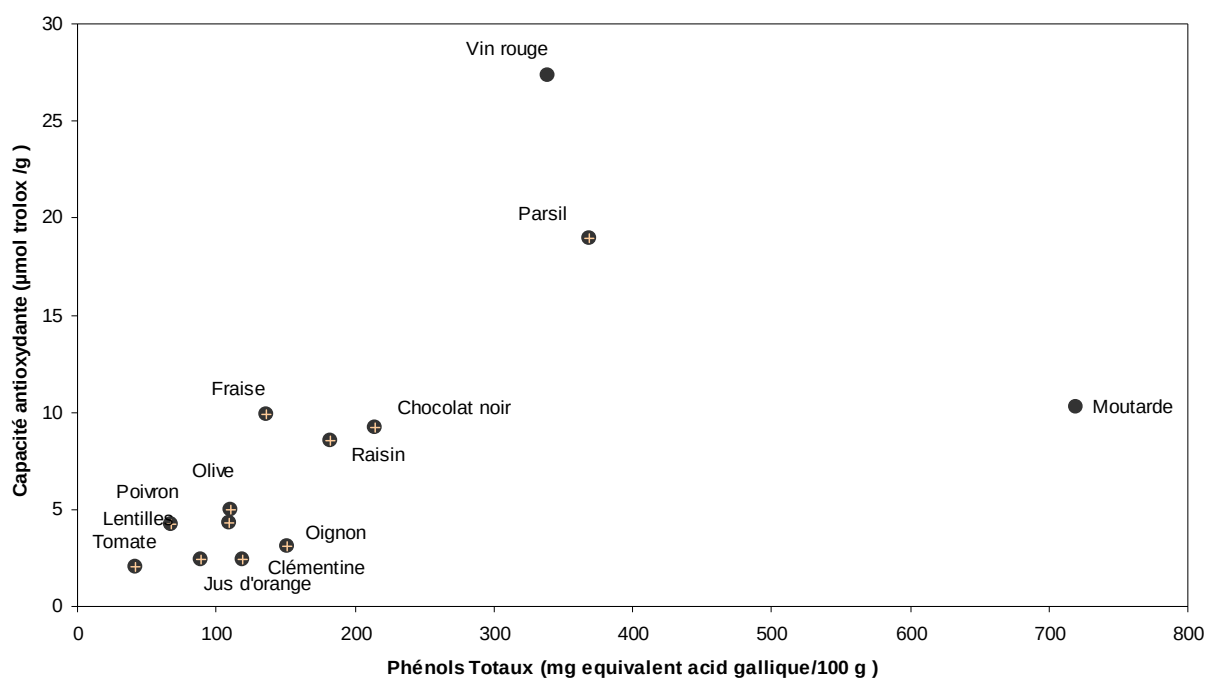


Figure 27 : Capacité antiradicalaire totale en fonction du taux de phénols totaux sur différents aliments dits « simples ».

Le vin rouge contient en majorité des catéchines et les principaux flavonoïdes de la moutarde sont la quercétine et le kaempferol (Fang *et al.*, 2008). Ces deux aliments ne rentrent pas dans la corrélation, chaque phénol ayant un pouvoir antioxydant spécifique, comme nous l'avons vu auparavant (Heo *et al.*, 2007), le mélange de phénols contenus dans la moutarde possède donc une activité antiradicalaire plus faible que ceux contenus dans le vin rouge, alors que la quantité de phénols totaux est plus élevée.

Nos résultats suggèrent que d'un point de vue global, les composés phénoliques contribuent significativement aux propriétés antioxydantes des aliments de différentes catégories (non seulement des fruits et légumes). Ils pourraient donc être considérés comme de bon marqueur de pouvoir antioxydant, et pourraient être des indicateurs suffisants pour estimer l'activité antioxydante de différents aliments et notamment de préparations culinaires.

3 Effet de la combinaison de différents aliments sur la TEAC et la TPC

Les études ayant été menées sur les combinaisons d'antioxydants ont essentiellement essayé de clarifier le comportement d'un antioxydant particulier ou de polyphénols particuliers. Le comportement de polyphénols pris isolément (catéchine, épigallocatechine, quercétine, acide chlorogénique ...) et l'effet de leur combinaison a été étudié (Heo *et al.*, 2007). Aucun effet synergique ne fut observé. Cependant différentes interactions entre les constituants antioxydants des fruits et légumes ont été énoncées par plusieurs autres auteurs. On leur attribue : des effets synergiques (Shao *et al.*, 2004; Cirico & Omaye, 2006; Wei *et al.*, 2006), des synergies négatives (Wang *et al.*, 2000; Pinelo *et al.*, 2004), un effet additif (Philpott *et al.*, 2004).

L'importance de l'environnement dans le quel un antioxydant exécute sa fonction avait déjà été relevé (Arts *et al.*, 2001). Cependant les interactions des activités au sein d'une matrice alimentaire complexe sont peu connues.

Aussi nous avons essayé d'appréhender le comportement des activités antioxydantes et de la teneur en phénols totaux de différentes formulations alimentaires. Deux systèmes ont été mis en place afin d'appréhender le comportement des activités lors de l'assemblage d'aliments :

- Addition de persil sur une tarte (Mix 1)

- Décomposition d'un plat complexe contenant du poisson, une sauce et un mix de légumes (Mix 2)

Pour chaque système, la TEAC et la TPC ont été mesurées sur les éléments du mélange pris individuellement et sur leur assemblage.

Les figures 28 et 29 illustrent la part de chaque aliment (en activité et en teneur de phénols totaux) dans le mélange Tarte –Persil.

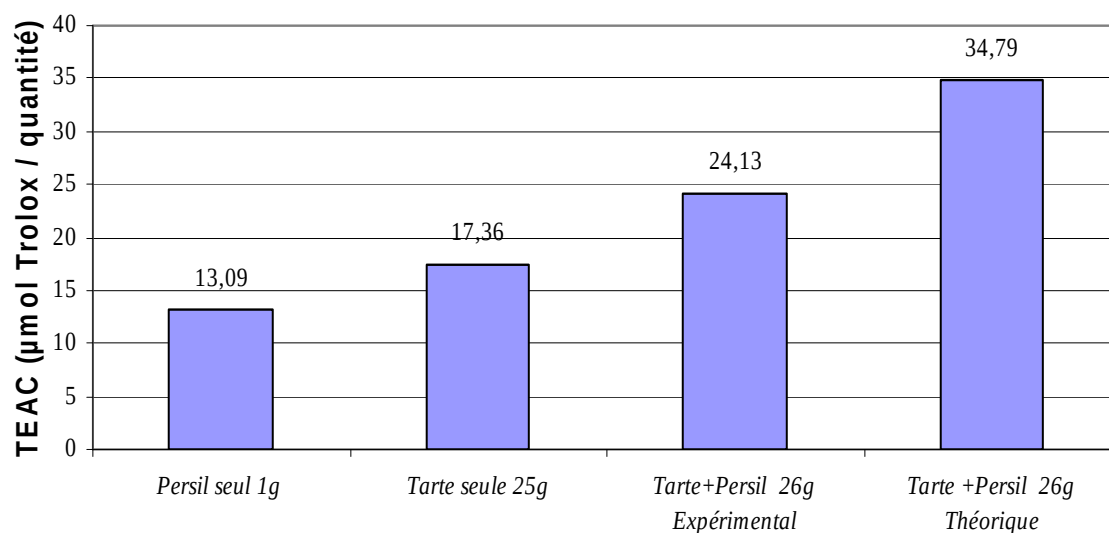


Figure 28 : Identification de la part (en μmol de trolox) de chaque composé dans l'assemblage Tarte-Persil

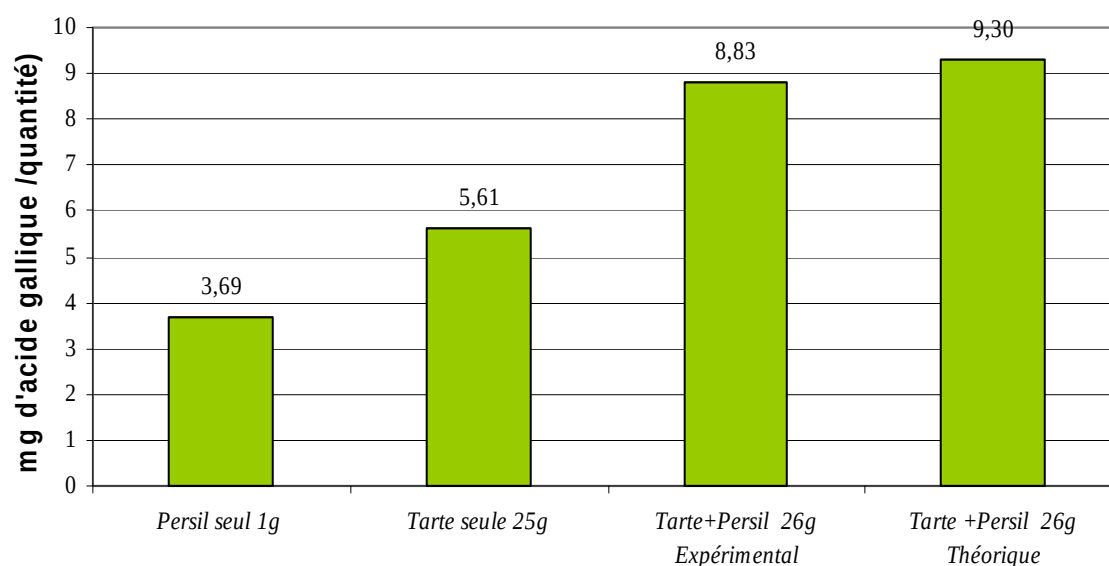


Figure 29 : Identification de la part (en mg d'Acide Gallique) de chaque composé dans l'assemblage Tarte-Persil

Ainsi 1g de persil apportant un équivalent de 13,09 μmol de trolox, et 25g de tarte 17,4 μmol de trolox, le mélange de 26g devrait apporter la somme des activités, soit 34,8 μmol de trolox, alors que le résultat de la mesure expérimentale est de 24,13 μmol de trolox. Le taux de phénol totaux est cependant additif.

La figure 30 illustre la comparaison entre la TEAC et la TPC mesurées et les valeurs estimées sur les 2 Mix alimentaires testés.

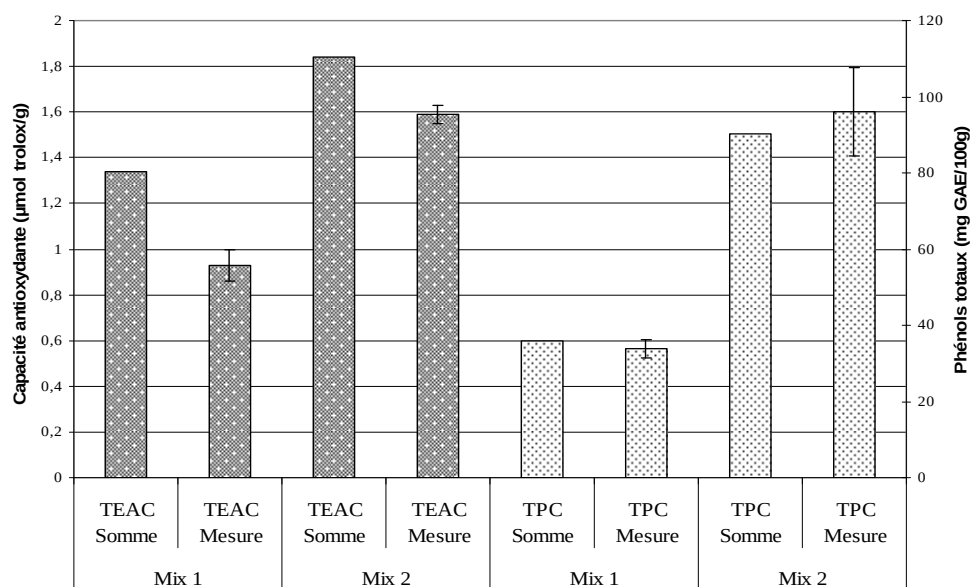


Figure 30 : Comparaison des activités antioxydantes et de la teneur en phénols totaux entre les valeurs estimées et les valeurs réelles de 2 types de Mix alimentaires.

TEAC / TPC Somme : représente la somme des activités antioxydantes (ou des phénols totaux) des ingrédients, la somme est donc une estimation de l'activité totale (ramenée par g de mélange)

TEAC / TPC Mesure : représente l'activité antioxydante totale (phénols totaux) mesuré des différents mélanges

Dans le cas du mix 1(Tarte –Persil), l'estimation des activités antioxydantes de la tarte après ajout de persil représente une activité totale de 1,34 μmol trolox/g, alors l'activité du mix mesuré est de 0,93 μmol de trolox/g. La teneur en phénols totaux reste constante (35,8 et 33,9 mg GAE/100g). Dans le cas du Mix 2 (Poisson-Sauce-Légumes), l'addition des activités

des 3 différents ingrédients donne une activité total de 1,84 μmol de trolox /g, alors que la mesure du mix possède une activité de 1,59 μmol de trolox/g. Cependant, il ya bien conservation du taux de phénols totaux (90,23 et 96, 21 mg GAE/100g).

La capacité antioxydante masquée avait été définie dans le cas d'ajout de flavonoïdes au plasma (Arts *et al.*, 2001), comme la différence entre l'augmentation d'activité due à l'ajout d'un composé fort en antioxydant et l'addition des activités des composés pris isolément. Arts avait trouvé un masquage de l'activité des flavonoïdes de 25 à 40 % en présence de plasma. Notre étude montre également un masquage d'activité pour les mix 1 et 2 (31% et 14% respectivement).

L'activité antiradicalaire des polyphénols étant due à leur aptitude à céder un hydrogène, plus le nombre de groupe hydroxyle est grand, plus cette activité est grande. Or la disponibilité des groupements hydroxyles, dépendent de leur structure chimique et de leur conformation spatiale. La présence de la matrice alimentaire peut modifier l'accessibilité des groupements actifs et donc la réactivité des molécules (Pinelo *et al.*, 2004). Les événements pouvant intervenir quand différentes matrices alimentaires sont assemblées (par exemple mélange de phases aqueuse et lipidique), ont presque toujours des conséquences imprédictibles sur les propriétés antioxydantes et la stabilité de l'aliment.

Cet exemple témoigne du fait que la TEAC d'un plat cuisiné ne peut être «estimée», et est difficilement prévisible à partir de la somme des TEAC d'aliments pris individuellement constituant le plat cuisiné, à la différence, semble-t-il, de la TPC. Il est donc nécessaire d'effectuer un dosage spécifique de l'activité sur chaque matrice. L'estimation du taux de phénols totaux restant insuffisante.

Il aurait été nécessaire de dresser l'inventaire de l'ensemble des antioxydants présent dans la tarte et dans le persil (notamment teneur en vitamine C, vitamine E, caroténoïdes, différenciation entre polyphénols) afin de mieux comprendre les mécanismes qui se sont déroulés au cours du mélange. Le masquage d'activité pourrait être dû à un masquage de l'activité de la vitamine C par exemple.

Alors que nous ne pouvons prédire l'activité de plats complexes et qu'il n'existe aucune uniformisation des méthodes de mesures, il apparaît pertinent de créer une échelle de capacité antioxydante totale de plats préparés.

4 Dosages de plats complexes

Afin de refléter au mieux les habitudes alimentaires des consommateurs, et ainsi essayer d'appréhender ce qui est réellement absorbé, il paraît judicieux d'étudier des préparations culinaires vendues en supermarché. Ceci permet d'étudier des assemblages d'aliments ayant subi des procédés industriels et pouvant refléter des mélanges alimentaires couramment consommés.

Le tableau 21 récapitule les résultats de mesures de TEAC et de la TPC obtenus pour les 26 préparations culinaires de différentes catégories (plats cuisinés frais, surgelés, et des tartes fraîches) par gramme d'échantillon (avec écart-type), ainsi que par portion (de 300g). Le tableau est classé par ordre décroissant des mesures de TEAC pour chacune des trois catégories.

Considérant l'ensemble des plats, les valeurs de TEAC sont comprises entre $0,81 \pm 0,02$ et $2,34 \pm 0,11$ μmol de trolox par gramme d'échantillon. Les valeurs de TPC sont comprises entre $32,27 \pm 2,80$ et $99,84 \pm 6,65$ mg d'acide gallique pour 100g. Nous pouvons noter que les variations de capacités antioxydantes sont beaucoup moins élevées que pour l'analyse des aliments simples.

Considérant les plats individuels vendus au rayon frais, les trois plats ayant les plus grandes TEAC et TPC sont :

- le poisson cuisiné à la grecque,
- les aubergines cuisinées à la provençale, et
- les courgettes cuisinées à l'indienne.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'il s'agit de plats contenant en quantités majeures des légumes, comme le montre la description des produits dans l'annexe 1. Ce sont les seuls plats ayant des légumes en position 1 de la recette de plats frais.

Ces plats contiennent respectivement des aubergines, des tomates et des courgettes.

Le fait que le plat cuisiné « poisson cuisiné à la grecque » ait la TEAC et la TPC les plus élevées n'est pas surprenant, étant donné que ce plat est riche en légumes (aubergines, pomme de terre, tomates, oignons, artichauts) et qu'il contient des épices (coriandre, curcuma, paprika).

Tableau 21 : TEAC et Phénols totaux de 26 plats préparés.

Type de plat	Nom de la recette	Capacité antioxydante totale ($\mu\text{mol Trolox /g}$)	Contenu en phénols totaux (mg GAE /100g)	Taille de la portion (g)	Capacité antioxydante par portion	Phénols totaux par portion
Plats Frais	Poisson à la Grecque	$2,34 \pm 0,11$	$87,73 \pm 12,37$	300	702	263,19
	Aubergines cuisinées à la provençale	$2,13 \pm 0,04$	$99,84 \pm 6,65$	300	639	299,52
	Courgettes à l'indienne	$1,94 \pm 0,02$	$85,09 \pm 3,25$	300	582	255,27
	Aiguillettes de poulet sauce moutarde	$1,87 \pm 0,07$	$69,00 \pm 2,23$	300	561	207
	Caviar de tomates confites au basilic	$1,43 \pm 0,10$	$71,58 \pm 7,23$	300	429	214,74
	Poisson à l'andalouse	$1,38 \pm 0,07$	$66,1 \pm 8,34$	300	414	198,3
	Hachis parmentier	$1,38 \pm 0,07$	$52,98 \pm 7,59$	300	414	158,94
	Poisson à l'italienne	$1,37 \pm 0,06$	$54,26 \pm 2,06$	300	411	162,78
	Lasagnes bolognaise	$1,35 \pm 0,05$	$51,04 \pm 6,21$	300	405	153,12
	Gratin Dauphinois	$1,19 \pm 0,03$	$61,29 \pm 3,91$	300	357	183,87
	Quenelles de brochet	$1,14 \pm 0,08$	$48,29 \pm 1,84$	300	342	144,87
	Cabillaud sauce citron	$0,81 \pm 0,02$	$32,27 \pm 2,80$	300	243	96,81
Plats surgelés	Poêlée savoyarde	$1,89 \pm 0,02$	$78,34 \pm 2,36$	300	567	235,02
	Paella	$1,88 \pm 0,01$	$63,49 \pm 1,10$	300	564	190,47
	Gratin de thon pomme de terre	$1,68 \pm 0,06$	$59,49 \pm 6,55$	300	504	178,47
	Gratin à la savoyarde	$1,63 \pm 0,05$	$76,41 \pm 1,63$	300	489	229,23
	Poulet Basquaise	$1,50 \pm 0,01$	$43,56 \pm 1,28$	300	450	130,68
	Gratin de pâtes au bœuf	$1,08 \pm 0,04$	$82,23 \pm 1,93$	300	324	246,69
	Fusillini escaloppine alla milanese	$1,02 \pm 0,01$	$77,77 \pm 1,58$	300	306	233,31
	Conchiglie al tonno e basilico	$0,89 \pm 0,21$	$52,59 \pm 7,70$	300	267	157,77
	Farfallini crema al gorgonzola	$0,78 \pm 0,01$	$34,77 \pm 1,92$	300	234	104,31
	Rigatoni a la bolognese della trattoria	$0,77 \pm 0,01$	$44,71 \pm 1,40$	300	231	134,13
Tartes	Tarte Trattatoria tomates mozzarella	$1,24 \pm 0,12$	$34,93 \pm 0,10$	200	248	69,86
	Tarte Chèvre épinard	$1,19 \pm 0,1$	$41,81 \pm 2,54$	200	238	83,62
	Tarte tomates provençales	$1,14 \pm 0,06$	$48,00 \pm 1,42$	200	228	96
	Tarte Poireaux	$1,13 \pm 0,08$	$41,19 \pm 1,42$	200	226	82,38
	Tarte saumon oseille	$0,97 \pm 0,09$	$33,77 \pm 3,82$	200	194	67,54
	Tarte Noix de St Jacques	$0,91 \pm 0,07$	$48,12 \pm 3,63$	200	182	96,24

Le plat cuisiné frais « aiguillettes de poulet sauce moutarde » a une TEAC plus élevée que le plat cuisiné frais « caviar de tomates confites au basilic », et ce bien que ce plat soit moins riche en légumes. En effet, le plat « aiguillettes de poulet sauce moutarde » contient seulement 3% de moutarde et 8% de carotte, comparé au plat « caviar de tomates confites au basilic » qui contient des tomates, des brocolis, des carottes, des pois chiches et du poivre, représentant 53% de la composition du plat. La moutarde apporte certainement des antioxydants ayant une activité plus forte que les légumes. Ce résultat témoigne du fait qu'il faut aussi tenir compte des condiments lorsque l'activité antioxydante totale consommée est étudiée.

Considérant les plats vendus au rayon surgelés (qui sont essentiellement à base de pomme de terre, pâtes et riz), les plats à base de pommes de terre (gratins) ont une TEAC plus élevée que les plats à base de pâtes et de riz, à l'exception de la paëlla, qui est le plat ayant une activité anti radicalaire la plus élevée des plats surgelés. En effet, la pomme de terre contient un taux de polyphénols et une activité antiradicalaire plus élevés que les pâtes et le riz comme l'avaient déjà décrit d'autres auteurs (Halvorsen *et al.*, 2002). La TEAC relativement élevée de la paëlla est peut être dû au curcuma du riz qui est réputé pour avoir une activité avérée, de plus ce plat contient des tomates, des petits pois, du poivron.

Considérant les tartes, de très faibles variations des 2 paramètres TEAC et TPC peuvent être observées. La garniture aurait un faible impact sur ces 2 paramètres, bien que celle-ci varie considérablement en termes d'ingrédients (cf. Annexe 1). Les tartes ayant le plus fort pouvoir antiradicalaire sont composées de végétaux, tels que les tomates et les épinards.

Dans la mesure où les plats préparés sont des plats industriels, ces aliments ont « très mauvaise réputation », tant au niveau des consommateurs que des nutritionnistes. Ils sont réputés pour être totalement dépourvus d'intérêt nutritionnel. L'analyse de la capacité antioxydante totale et de leurs taux de phénols totaux montrent que ces plats conservent certains intérêts des légumes. Cependant, afin de mieux appréhender l'impact « industriel », il aurait été judicieux de comparer la même recette fabriquée de façon artisanale avec celle fabriquée industriellement.

Les procédés de transformations des aliments peuvent avoir plusieurs effets sur l'aliment, mais n'engendrent pas dans tous les cas une perte des qualités nutritionnelles de l'aliment. Ainsi, le blanchiment, qui est opéré sur tous les fruits et légumes avant surgélation, permet de prévenir l'oxydation enzymatique qui est la principale cause de la perte des composés antioxydants des aliments. Les fruits et légumes soumis à un blanchiment retiennent la plus part de leurs propriétés antioxydantes (Nicoli *et al.*, 1999).

Il est vrai qu'il existe dans certains cas des pertes de composés (dus à leur instabilité) lors de transformations. Nombre sont les publications qui relatent des dégradations en acide ascorbique dues au blanchiment, à la cuisson, à la pasteurisation, à la stérilisation et à la congélation. Des études ont également énoncé l'effet de la lumière, de l'oxygène et de la chaleur sur l'oxydation des polyphénols et de la vitamine E. Cependant, des études concernant le comportement de l'activité de l'ensemble des antioxydants alimentaires manquent cruellement, alors que les plats préparés sont de plus en plus consommés.

Les conséquences des procédés de transformation et de conservation sont les résultats d'un ensemble d'événements se produisant simultanément ou consécutivement, ils ne peuvent être donc être prédits.

Voici les différentes situations pouvant engendrer un changement ou non au niveau des propriétés antioxydantes des aliments lors des procédés de transformation ou de conservations :

Aucun changement	Aucun changement de concentration des antioxydants naturels
	Perte d'antioxydant naturel compensée par une production simultanée de composés ayant plus ou moins forte activité antioxydante
Augmentation	Augmentation des propriétés antioxydantes des antioxydants naturels de l'aliment
	Formation de nouvelles molécules ayant des activités antioxydantes (produits de la réaction de Maillard)
Baisse	Perte des antioxydants naturels
	Formation des nouveaux composés ayant une activité pro-oxydante (produits de la réaction de Maillard)
	Masquage des groupements responsables des activités

Les produits de la réaction de Maillard (polymères bruns appelés mélanoidines), qui peuvent se former lors d'un chauffage intense ou lors d'un stockage, montrent des propriétés antioxydantes ou pro-oxydantes (ce qui pourrait expliquer une augmentation ou une baisse de capacité antiradicalaire) (Nicoli *et al.*, 1997). La structure et le mécanisme de formation des mélanoidines ne sont pas encore très bien connus. L'évaluation de la couleur et de l'intensité du brunissement dont ils sont responsables est effectuée par l'analyse de spectres d'absorption de la lumière.

Les polyphénoloxydases, comparées à d'autres enzymes responsables des dégradations de la qualité des fruits et légumes, ne sont pas très thermostables. Un traitement de pasteurisation est généralement suffisant pour les dénaturer totalement (Nicolas & Billaud, 2006) (ceci pourrait expliquer qu'il n'y ait aucun changement d'activité au cours de la conservation).

Il aurait certainement fallu se focaliser sur quelques plats, afin de mieux comprendre quelles molécules sont responsables de l'activité antiradicalaire. Dresser leur composition en antioxydants et analyser au cas par cas quelles molécules sont responsables de l'activité ou des événements pouvant engendrer les fluctuations d'activité.

5 Corrélation entre capacité antioxydante et phénols totaux des aliments complexes

IL existe une bonne corrélation entre l'activité antioxydante ET la teneur en phénols totaux sur les plats préparés dosés ($r = 0,84$, $p < 0,05$ $n = 26$) excepté pour 2 plats surgelés. La figure 31 illustre ce résultat.

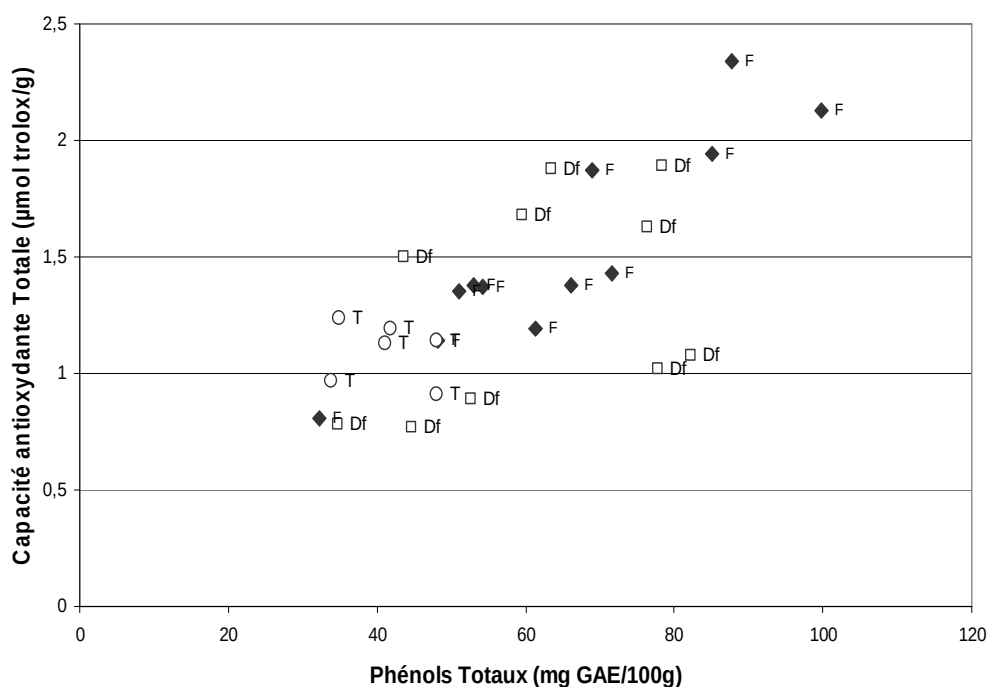


Figure 31 : Corrélation entre la TEAC et la TPC de plats complexes

(♦) F représente les plats frais, (□) Df représente les plats surgelés, (○) représente les tartes.

Nos résultats suggèrent que la teneur en phénols totaux contribue significativement aux propriétés antioxydantes mesurées par la méthode TEAC de différentes catégories de plats.

6 Effet Procédés

6.1 Effet du stockage

L'influence du stockage est un paramètre à étudier, étant donné que la plupart des aliments ne sont pas immédiatement consommés après leur fabrication. En effet, un certain délai s'écoule entre le moment où l'aliment a été fabriqué industriellement et celui de sa consommation, du fait :

- d'un stockage au niveau de la chaîne industrielle (en usine, en transport, en magasin),
- d'un stockage chez le consommateur, qui dispose jusqu'à la date limite de consommation

La conservation est généralement réputée comme étant responsable de pertes en composés nutritionnels et notamment d'une perte en composés antioxydants dans les aliments. En effet, l'acide ascorbique, qui est relativement instable et particulièrement sensible, est considéré comme un indicateur des dommages causés par les procédés de transformation. Cependant, l'ensemble des composés antioxydants ne se comportent pas tous de la même manière et notamment au sein d'une matrice alimentaire, qui est susceptible de protéger ces composants.

Les temps de stockage peuvent influencer ou accélérer la progression enzymatique ou l'oxydation chimique de composés phénoliques ; ces réactions qui s'opèrent à différents stades sont dépendantes de certains paramètres tels que les conditions de transformation industrielle (pH, temps, température, disponibilité en oxygène...).

Afin d'évaluer si le stockage affectait la TEAC et la TPC de plats cuisinés, un plat cuisiné a été choisi, et les paramètres ont été mesurés à différents moments de conservation. Ainsi, la TEAC et la TPC ont été mesurées à 9, 13, 15, 16 et 23 jours après la fabrication du plat cuisiné.

Les figures 32 et 33 illustrent l'évolution de la TAC ou de la TPC en fonction du temps de conservation de la préparation culinaire. Les mesures de TAC d'une sont mesurées au bout de 9, 13, 15 et 16 et 23 jours.

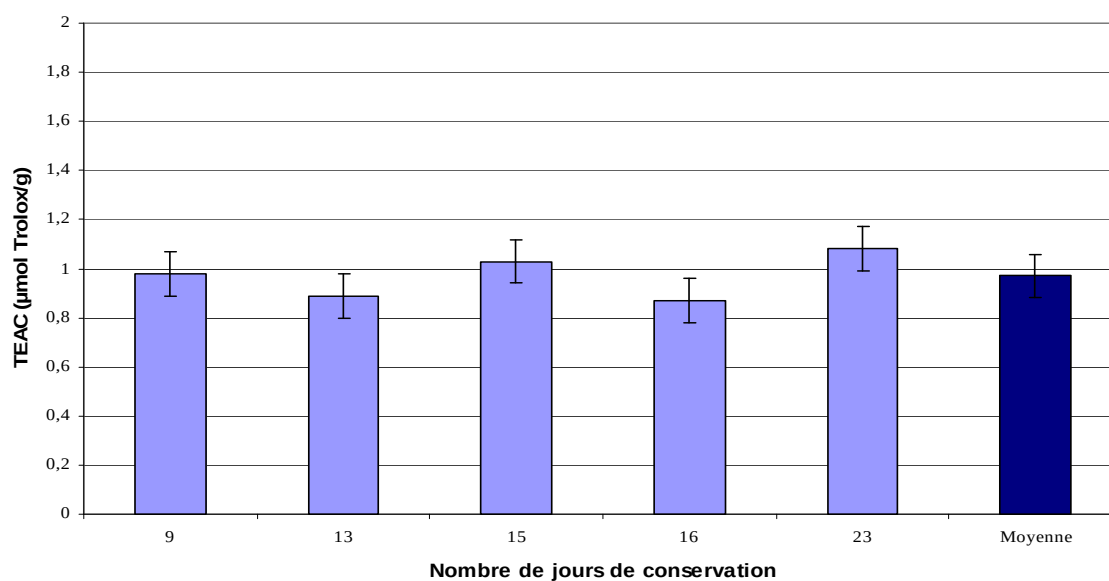


Figure 32 : Evolution de la TEAC ($\mu\text{mol trolox/g}$) en fonction du temps de conservation d'une préparation culinaire

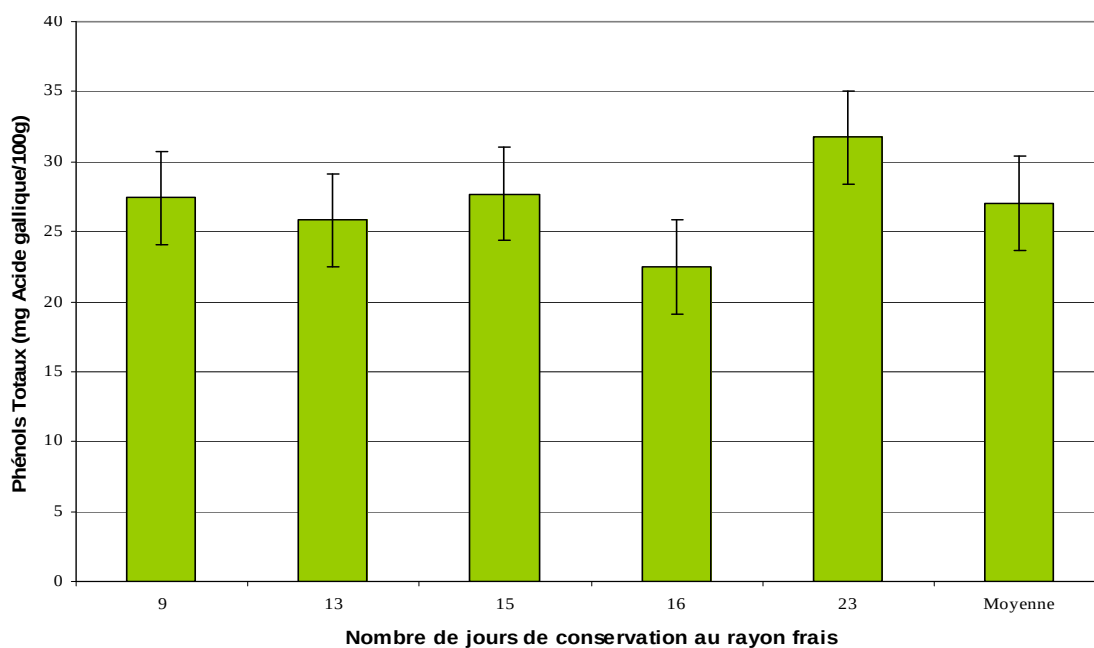


Figure 33 : Evolution des phénols totaux (mg d'équivalent acide gallique/100g) en fonction du temps de conservation d'une préparation culinaire.

Aucun effet significatif n'est observé au cours de la conservation, tant au niveau de l'activité antioxydante que du taux de phénols totaux. Les coefficients de variation sont de 9,3% pour

les valeurs TEAC et 12,4% pour les valeurs de TPC, ce qui est correct compte tenu des différences de composition pouvant avoir lieu.

Une hypothèse serait que les composés d'intérêts soient protégés dans la matrice alimentaire, ou que l'ensemble des réactions se compensent : il peut y avoir formation de nouvelles molécules et dégradations d'autres. La succession de ces réactions n'aurait aucun impact sur ces 2 paramètres : la baisse de composés naturels pourrait être contrebalancée par la production de nouvelles molécules ayant de nouvelles activités.

6.2 Effet réchauffage

Dans la majorité des cas, les propriétés antioxydantes des aliments sont susceptibles d'évoluer :

- lors de la fabrication du plat, de sa conservation, mais surtout
- lors de la préparation du plat au moment de sa consommation, qui peut être responsable d'une modulation significative du taux d'antioxydants naturels ou de leur activité, comme toute manipulation.

Pour évaluer si le réchauffage affecte ou non la TEAC et la TPC, des mesures de ces deux paramètres ont été effectuées sur cinq plats cuisinés (plats cuisinés) avant et après réchauffage culinaire. Ces plats cuisinés ont été préparés en utilisant les méthodes usuelles (micro-onde, four) comme indiquées sur l'emballage.

Les résultats sont visibles sur les figures ci-dessous. La figure 34 représente le diagramme des mesures de TAC des 5 plats cuisinés avant et après réchauffage. La figure 35 représente le diagramme des mesures de TPC des 5 plats cuisinés avant et après réchauffage.

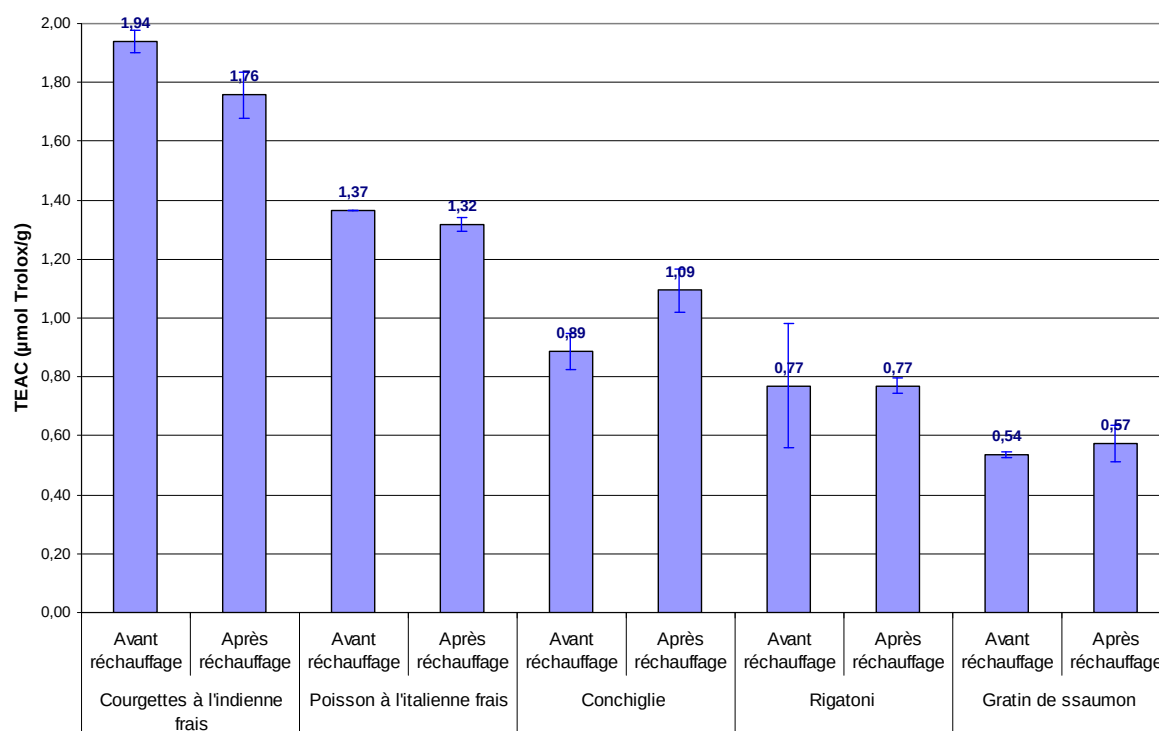


Figure 34 : Diagramme des mesures de TEAC des 5 plats cuisinés avant et après réchauffage.

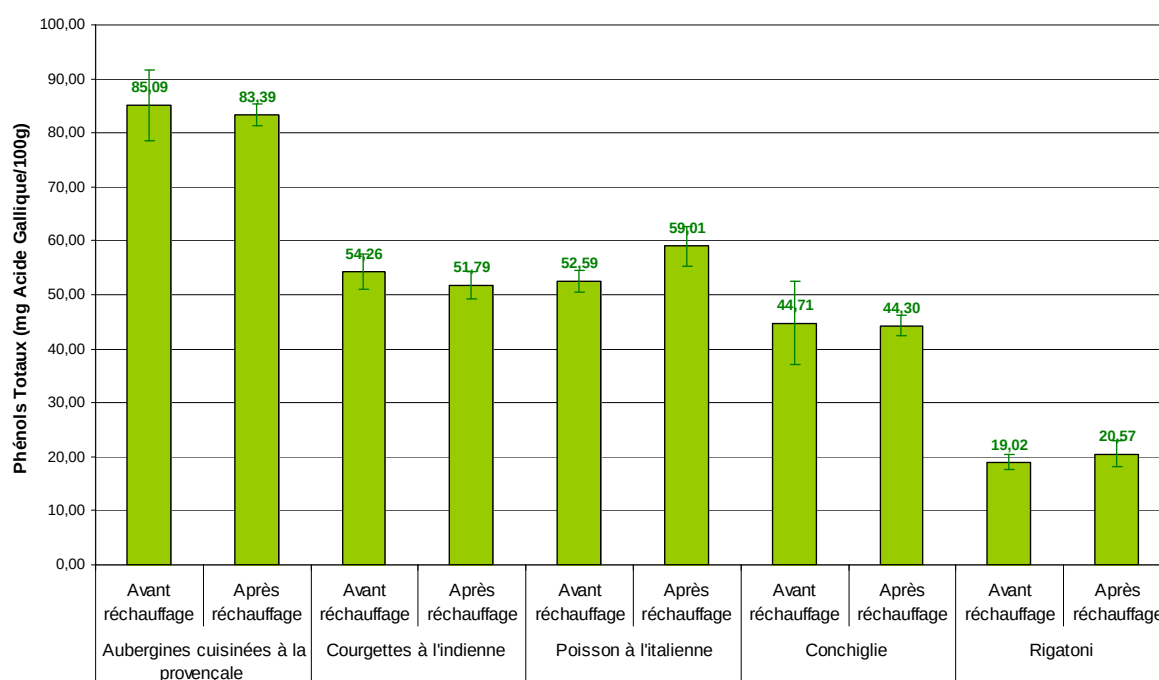


Figure 35 : Diagramme des mesures de TPC des 5 plats cuisinés avant et après réchauffage.

Il n'y a pas de variation significative due au réchauffage culinaire d'un point de vue global. Pour ce qui est des courgettes à l'indienne, une variation significative peut être observée, en effet il y a une faible baisse significative de la valeur TEAC. L'augmentation en phénols totaux pourrait être due à une concentration de matière.

CHAPITRE 5 : Index de capacité antioxydante et consommation

Plusieurs auteurs conseillent de mesurer le pouvoir antiradicalaire via plusieurs méthodes, c'est pourquoi dans un souci de justesse, nous avons sélectionné quelques plats et aliments simples pour qu'ils soient analysés par les méthodes ABTS, DPPH et ORAC dans un laboratoire externe. Comme nous l'avons précisé dans le Chapitre 1, plusieurs méthodes existent pour mesurer le pouvoir antiradicalaire d'aliments, ces méthodes diffèrent tant au niveau du radical utilisé que de la méthode de calcul. Cependant dans ces 3 méthodes, les résultats peuvent être exprimés en équivalent Trolox.

Ces résultats nous permettront d'évaluer les corrélations entre les méthodes de dosage, ainsi l'apport de chaque aliment par rapport à une consommation préconisée dans chaque type de dosage.

Alors que la capacité antioxydante est de plus en plus considérée comme une fonctionnalité positive émergente. Il est nécessaire de mettre en place des repères de consommation, pour pouvoir rendre accessible cette fonctionnalité au grand public. Cependant, plusieurs méthodes de mesures sont utilisées, les repères de consommation varient en fonction du type de dosage et aucun objectif de consommation n'est universellement admis.

MATERIEL ET METHODE Complémentaire

1. Description des échantillons

Quatre plats ayant un pouvoir anti radicalaire fort d'après la méthode TEAC ont été sélectionnés : Le poisson à la grecque, les aubergines à la provençale, les courgettes à l'indienne et le caviar de tomates. Ces plats sont à base de légumes et leur composition nutritionnelle est contrôlée (faible teneur en lipides et notamment en saturés, apport énergétique à la portion < 450 kcal, teneur en sel < 1g /100g). Ainsi que la poêlée savoyarde, riche en pomme de terre, mais dont l'apport en lipides est assez conséquent (~20g par portion). Ce plat est la préparation surgelée ayant le plus fort pouvoir anti-radicalaire. Deux aliments dits « simples » couramment consommés ont également été dosés par ces 3 méthodes : pomme de terre épluchée cuite à l'eau, ainsi que des courgettes cuites à la vapeur avec peau.

2. Préparation des échantillons

L'extraction des aliments s'est faite dans notre laboratoire comme précédemment décrit. Les extraits éthanoliques de 7 échantillons ont été envoyés au CEDEVIT en Belgique. Le transport s'est fait en chambre froide.

RESULTATS

1 Résultats selon les méthodes DPPH, ABTS et ORAC

Le tableau 22 représente les résultats des différents échantillons exprimés en μmol de trolox par gramme.

Tableau 22 : Capacité antioxydante (en $\mu\text{mol trolox/g}$) de 7 aliments selon les 3 méthodes DPPH, ABTS et ORAC.

	DPPH		ABTS		ORAC	
	$\mu\text{mol/g}$	Ecart-type	$\mu\text{mol/g}$	Ecart-type	$\mu\text{mol/g}$	Ecart-type
Poisson à la grecque	0,84	0,005	1,65	0,270	20,27	0,376
Pomme de terre cuite à l'eau	0,53	0,041	1,29	0,038	12,02	1,142
Aubergines à la provençales	0,48	0,022	1,79	0,007	18,51	0,658
Courgettes à l'indienne	0,36	0,030	1,63	0,084	21,01	1,964
Poêlée savoyarde	0,35	0,053	1,29	0,363	17,42	0,388
Caviar Tomates Confites	0,34	0,008	1,16	0,079	16,03	1,003
Courgettes cuites à la vapeur	0,14	0,009	0,66	0,036	13,08	1,565

D'après ces résultats selon la méthode DPPH, le plat ayant le plus fort pouvoir anti radicalaire est le poisson à la grecque ($0,84 \pm 0,01 \mu\text{mol Trolox/g}$), alors que les courgettes cuites à la vapeur ont la valeur la plus basse ($0,14 \pm 0,01 \mu\text{mol}$) par gramme de produit.

Selon la méthode utilisant le radical ABTS, les plats ayant le plus fort pouvoir antioxydant sont les aubergines à la provençale ($1,79 \pm 0,01 \mu\text{mol}$) et le poisson à la grecque ($1,65 \pm 0,27 \mu\text{mol}$), les courgettes à la vapeur se placent également en dernière position ($0,66 \pm 0,04 \mu\text{mol}$).

Pour ce qui est de la méthode ORAC, les plats ayant le plus fort pouvoir antioxydant sont les courgettes à l'indienne ($21,01 \pm 1,96 \mu\text{mol}$), le poisson à la grecque ($20,27 \pm 0,38 \mu\text{mol}$). Les aliments ayant le plus bas potentiel selon cette méthode sont les pommes de terre cuites à l'eau ($12,02 \pm 1,14 \mu\text{mol}$) et les courgettes cuites à la vapeur ($13,08 \pm 1,57 \mu\text{mol}$).

Ces valeurs en tant que telles sont difficilement exploitables, il est plus judicieux de les exploiter en tant qu'index ou en tant qu'apport dans une alimentation globale.

2 Corrélation entre les différentes méthodes

Les figures 36, 37 et 38 représentent les corrélations pouvant être établies entre les différentes techniques de mesure.

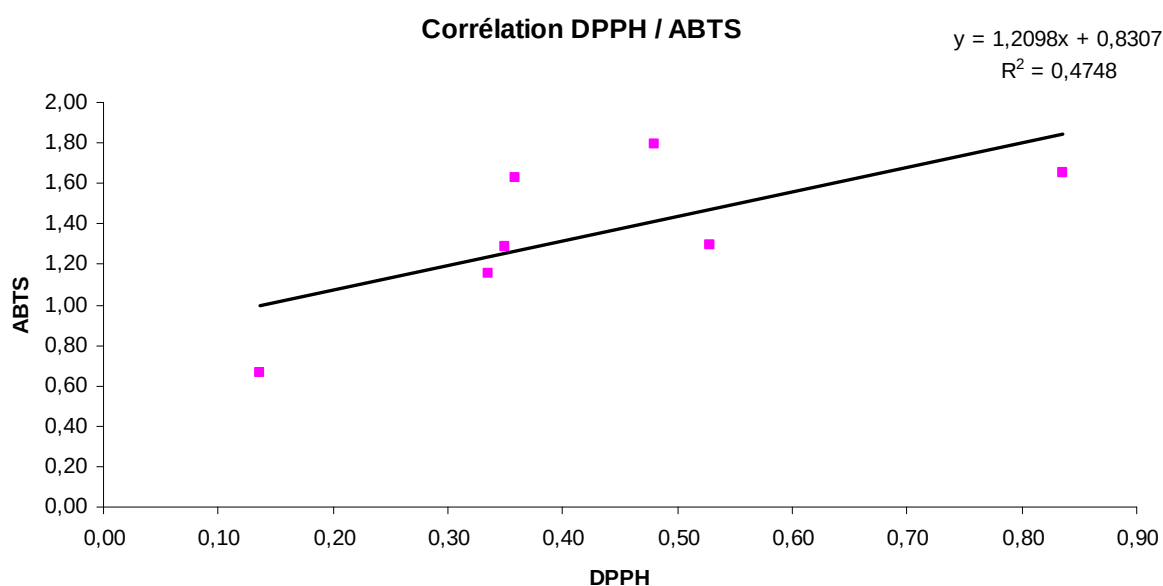


Figure 36 : Corrélation entre les méthodes DPPH et ABTS établie à partir de 7 aliments

Il apparaît que la corrélation entre les valeurs DPPH et ABTS soit moyenne ($r=0,7$ $n=7$)

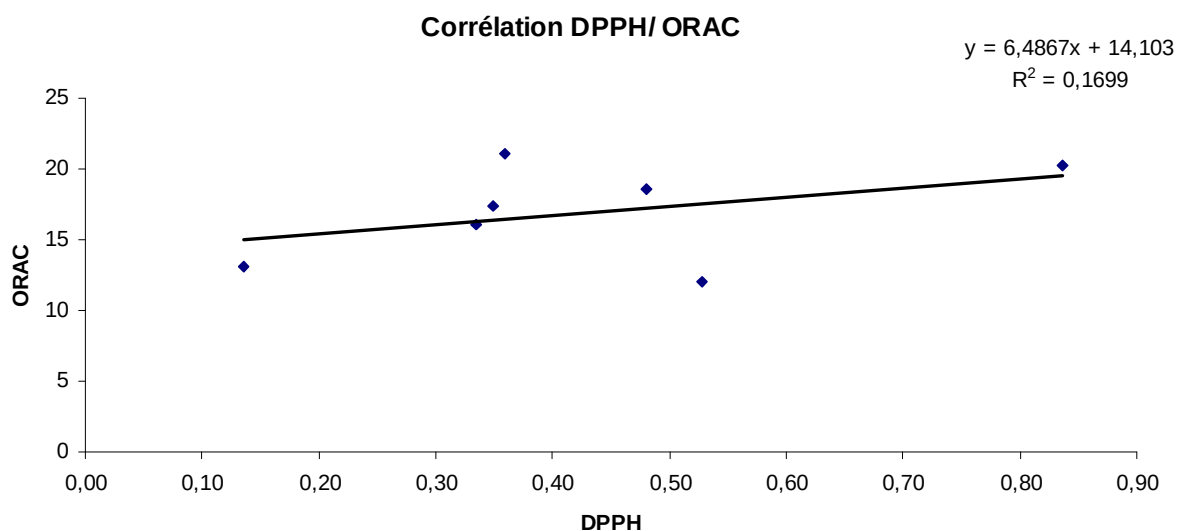


Figure 37 : Corrélation entre les méthodes DPPH et ORAC établie à partir de 7 aliments

La corrélation entre les mesures ORAC et DPPH est très faible ($r=0,4$, $n=7$).

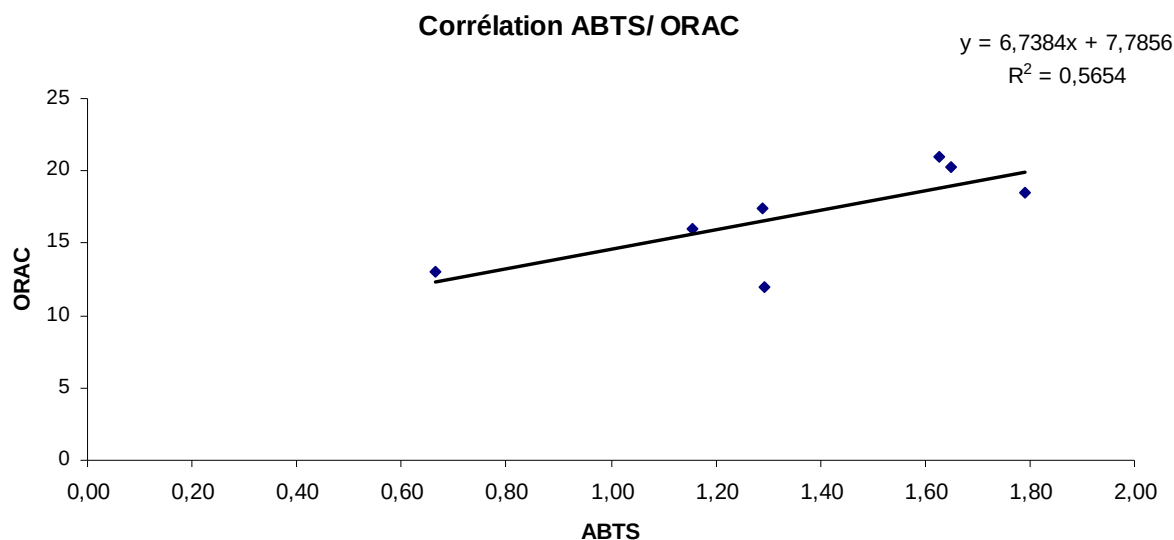


Figure 38 : Corrélation entre les méthodes ABTS et ORAC établie à partir de 7 aliments

La corrélation entre les valeurs d'ORAC et de l'ABTS est moyenne ($r=0,7$, $n=7$).

Ces résultats sont difficilement comparables à la littérature , car pour différents types d'aliments, les corrélations apparaissent soient bonnes , soient mauvaises entre les différentes techniques de dosage (Ou *et al.*, 2002; Pellegrini *et al.*, 2003; Seeram *et al.*, 2008)

.

3 Index global de capacité antiradicalaire

Dans la mesure où les corrélations sont faibles entre les méthodes de dosages, et qu'il n'existe aucun consensus au niveau de la ou des méthodes à employer. L'exploitation des résultats par un index global semble le plus judicieuse.

Très récemment, Seernam (2008) propose un score antioxydant pour chaque méthode calculée selon la formule : (score de l'échantillon/ meilleur score parmi les échantillons dosés)*100. Le score global étant la moyenne des scores de l'ensemble des dosages.

Tableau 23 : Index global d'activité antiradicalaire établi à partir de trois types de dosage

	DPPH		ABTS		ORAC		Index Global	Rang Global
	Index	Rang	Index	rang	Index	Rang		
Poisson à la grecque	100	1	92	2	96	2	96	1
Pomme de terre cuite à l'eau	63	2	72	4	57	7	64	5
Aubergines à la provençales	57	3	100	1	88	3	82	2
Courgettes à l'indienne	43	4	91	3	100	1	78	3
Poêlée savoyarde	42	5	72	5	83	4	66	4
Caviar Tomates Confites	40	6	65	6	76	5	60	6
Courgettes cuites à la vapeur	16	7	37	7	62	6	39	7

D'après ce tableau, il apparaît que le score le plus fort est attribué au poisson à la Grecque avec un score de 96 sur une échelle allant de 1 à 100 parmi les aliments dosés. L'aliment ayant le score le plus bas est la courgette vapeur (score 39).

L'avantage de cette technique de calcul est :

- que l'on compare des échantillons ayant suivi le même protocole de dosage (index par type de dosage)
- qu'aucune méthode n'est favorisée ou défavorisée (index global)

L'exploitation par rang ne rend pas compte des écarts pouvant avoir lieu dans le classement. D'autre part, un effet limitant de l'utilisation de cet index est le cout global des dosages, car pour obtenir un index exploitable, il faudrait doser un maximum d'aliments qu'ils soient simples ou complexes, afin que le consommateur sache situer ce qu'il consomme. Un autre index pourrait être exploité, en fonction de la portion de consommation, de la capacité antiradicalaire et de la teneur en polyphénols.

Cet index pourrait être mis en place, comme l'a été l'index glycémique, en tant que repère pour le consommateur.

4 Index de consommation

Le tableau 24 met en relief la place de 3 plats préparés au milieu d'aliments connus pour leur potentiel antioxydant et leur teneur en polyphénols.

Le classement s'effectue selon un index global, calculé à partir de l'index de capacité antiradicalaire (mesuré à partir de la méthode utilisant l'ABTS) et de l'index des polyphénols

Tableau 24 : Index global de capacité antioxydante établi à partir de la teneur en phénol totaux et de la capacité antiradicalaire.

Aliments	Portion	Consommation TEAC μ mol Trolox	Consommation mg GAE	Index TEAC	Index Phénols	Index Global	Rang global
Raisin	150	1287	274	87	100	93	1
Fraise	150	1483	204	100	74	87	2
Poisson à la grecque	300	702	264	47	96	72	3
Poisson andalouse	300	414	198	28	72	50	4
Lentilles	150	635	101	43	37	40	5
Poisson à l'italienne	300	410	115	28	42	35	6
Poivron vert	100	431	109	29	40	34	7
Clémentine	100	241	119	16	43	30	8
Jus d'orange	100	240	89	16	33	24	9
Chocolat	30	278	64	19	24	21	10
Oignon	50	155	76	10	28	19	11
Olives vertes	50	249	55	17	20	19	12
Tomate fraîche	120	246	50	17	18	17	13
Moutarde	10	103	72	7	26	17	14
Persil	5	95	18	6	7	7	15

D'après ce classement, il apparaît qu'une portion de poisson à la grecque a un index global de 72 sur une échelle de 1 à 100 parmi les index des portions usuelles d'aliments couramment consommés. La portion de poisson andalouse, ainsi que la portion de poisson à l'italienne ont respectivement des index de 50 et 35. Le raisin rouge obtient le meilleur score 93, car il se place en première position.

Cependant, ces résultats sont à prendre avec circonspection, car d'une part, seulement quelques aliments ont été dosés (le classement pourrait se décaler totalement par l'ajout

d'autres aliments ou boisson) et d'autre par, car cette échelle ne reflète que l'activité antiradicalaire de ces aliments et non leur profil nutritionnel global.

4 Estimation des consommations

4.1 Comparaison des consommations selon la méthode ABTS

L'étude de l'activité antioxydante globale et des polyphénols n'a d'intérêt que si elle est prise en compte dans la globalité d'un régime. Ces facteurs sont de plus en plus mis en relief, comme ayant un intérêt fonctionnel spécifique et plusieurs auteurs préconisent d'étudier leurs impacts dans les études nutritionnelles et de fixer des objectifs de consommation.

Des travaux ont été réalisés sur l'étude du régime méditerranéen. Il a été en effet prouvé que les antioxydants issus de l'alimentation du régime méditerranéen peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé (Anderson *et al.*, 2001; Trichopoulou, 2007). L'étude de Saura-Calisto et de Goni (2006) a montré que la TAC d'une alimentation espagnole était estimée à 3549 μmol trolox équivalent par la méthode ABTS, et à 1171 mg d'acide gallique/personne/jour par la méthode Folin-Ciocalteu (Saura-Calixto & Goni, 2006).

Toutefois, on peut relever certaines limites à cette étude :

- elle a été réalisée en « reconstituant » l'alimentation « typique » espagnole, à savoir en effectuant des mesures de la TAC d'aliments représentatifs de cette alimentation, puis en extrapolant ces mesures en fonction des estimations de consommation de ces aliments, et ce sans tenir compte :
 - o des interactions entre les aliments lorsqu'ils sont mélangés entre eux pour constituer des plats cuisinés représentatifs d'un repas complet, et
 - o des répercussions que cela peut avoir au niveau des propriétés antioxydantes,
 - o de l'influence sur les propriétés antioxydantes des processus industriels que peuvent subir les aliments,
- elle n'a pris en considération que les fruits et les légumes, ainsi que diverses boissons, ce qui n'est pas complètement représentatif d'une alimentation.

Notre étude a permis d'établir une table de la fonctionnalité antioxydante de la carte Marie. Cette étude suggère également la nécessité d'évaluer l'ensemble des aliments tels que consommés pour une meilleure appréciation de la consommation en antioxydant.

Voici la répartition de l'apport global en activité antioxydante et en polyphénols totaux du régime méditerranéen (Tableau 25).

Tableau 25 : Répartition de l'activité antiradicalaire et de la teneur en phénols totaux de chaque aliments dosés du régime méditerranéen (Saura-Calixto & Goni, 2006).

Aliments	Consommation /jour (g)	TEAC (μ mol Trolox /quantité ingérée)	Polyphénols (mg)/quantité ingérée
Noix	6,8	176	47,1
Fruits	266	342	178
Légumes	331	272	117
Légumineuses	22,3	134,7	33
Céréales	222	33,4	174
Boissons (ml) Thé, Café, Vin, Bière	505	2576	614
Huile d'olive (ml)	31,2	12,8	5,4
Huile de tournesol (ml)	20,8	13,6	2,9
TOTAL		3549	1171

Ce tableau permet de mettre en relief la part des boissons dans l'apport du pouvoir anti-radicalaire du régime méditerranéen. Celles-ci représentent près des 2/3 du total ingéré. Ainsi les aliments solides type fruits et légumes ne représentent que 1000 unités sur un total d'environ 3500.

La figure 39 est un graphique permettant de comparer l'apport d'activité antioxydante et l'apport de polyphénols totaux de différents groupes d'aliments (déterminés à partir de la consommation d'aliments du régime méditerranéen), aux 5 plats de la carte Marie ayant le plus fort pouvoir antioxydant.

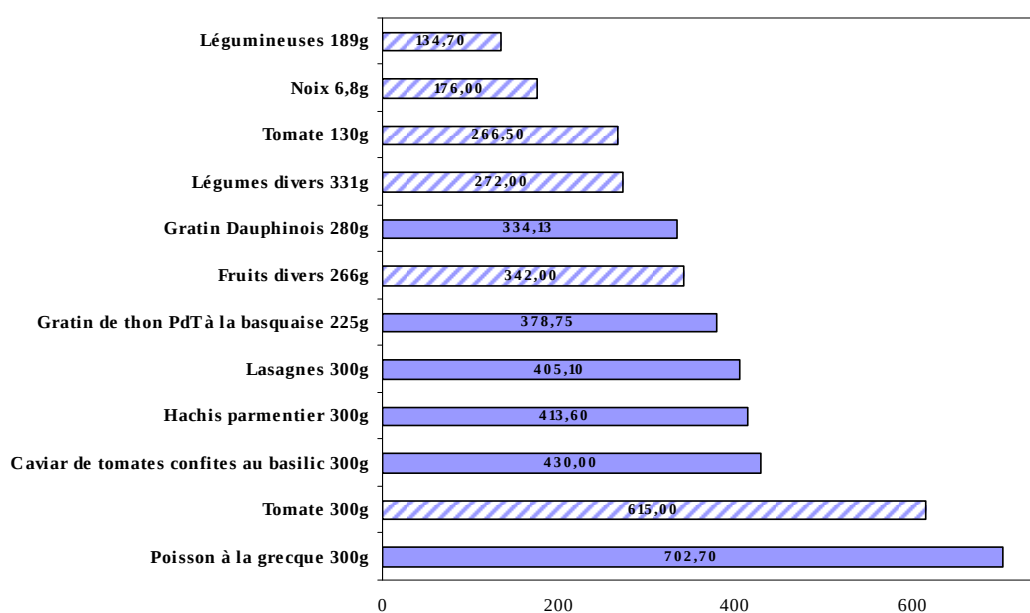


Figure 39 : Echelle permettant de comparer le pouvoir anti radicalaire (en μmol de trolox) de 5 plats complexes à des groupes d'aliments couramment consommés selon la publication de Saura –Calisto et Goni (2006).

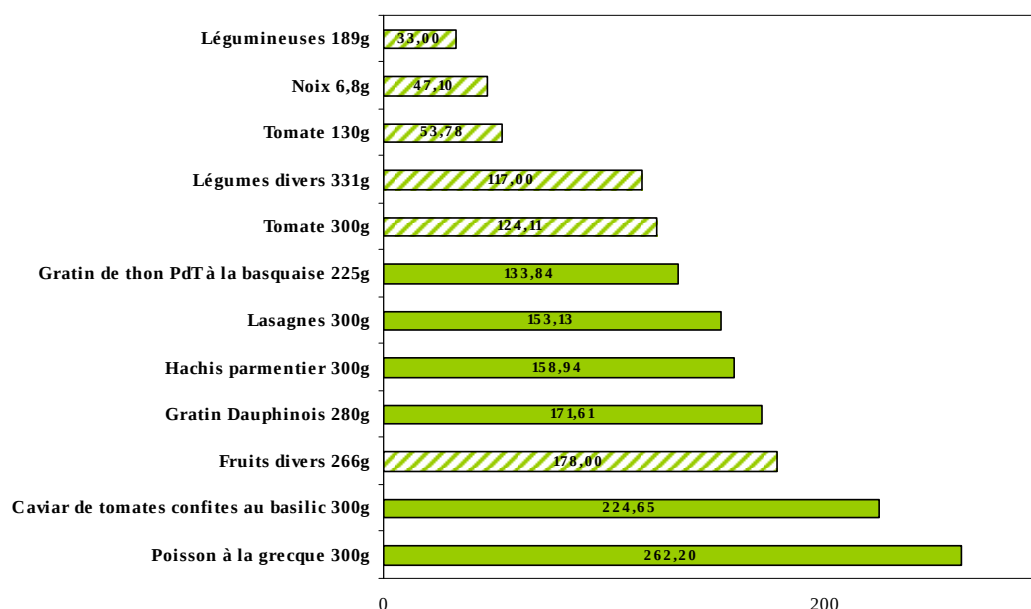


Figure 40 : Echelle permettant de comparer la teneur en phénols totaux de 5 plats complexes à des groupes d'aliments couramment consommés selon la publication de Saura –Calisto et Goni (2006).

D'après ces figures, il apparaît qu'une portion de « Poisson à la grecque » permet d'obtenir une activité équivalente à environ 703 μmol de trolox, qui est supérieure à une consommation journalière de fruits divers (342 μmol) et de légumes divers (272 μmol). D'autre part, l'apport de 702 μmol de trolox, représenterait environ 20% de l'apport total du régime méditerranéen et 72% du total des aliments solides.

De même, l'apport en polyphénols totaux d'un plat de 300g de « Poisson à la grecque » apporterait un équivalent de 262 mg d'acide gallique, ce qui est supérieur à l'apport de 266g de fruits divers (178 mg GAE) et supérieur à l'apport journalier de légumes divers (117 mg GAE). Le poisson à la grecque apporterait l'équivalent de 20% de l'apport journalier total en polyphénols du régime méditerranéen espagnol tel que dosé par Saura – Callisto et Goni (2006).

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure quant à un l'apport nutritionnel global de ce plat, ils nous permettent seulement de comparer ce plat par rapport aux deux paramètres testés. En aucun cas, une équivalence ne peut être faite entre une portion de légume et un plat complet. Cette démonstration peut également mettre l'accent sur les limites de ce type de comparaison.

4.2 Différents objectifs de consommation

Le Département de l'agriculture des Etats-Unis (USDA) a réalisé un inventaire détaillé sur plus de 100 végétaux, dont les fruits et légumes, mais aussi les noix et les épices. Cet inventaire confirme que des aliments tels que les petits fruits rouges (myrtille, mûre, framboise...) ont un bon potentiel antioxydant. Mais certains résultats sont plus surprenants, et bousculent l'idée selon laquelle ce sont les fruits et les légumes qui sont les aliments les plus riches en antioxydants (notion née essentiellement de leur richesse en vitamine C et en bêta-carotène). Ainsi, les légumineuses (pois et haricots secs), les artichauts, peu connus pour leur richesse en antioxydants, sont également très bien classés. Les noix et certaines herbes et épices telles que l'origan et la cannelle, apportent aussi une contribution non négligeable. A l'inverse, certains végétaux tels que le concombre et la pastèque sont pratiquement dépourvus de capacité antioxydante.

Pryor et Cao qui sont les inventeurs de cette méthode, estiment qu'il est nécessaire d'avoir un apport quotidien compris entre 3000 et 5000 unités ORAC (l'équivalent d'au moins

5 portions de fruits et légumes) pour maintenir la capacité antioxydante totale du plasma à son niveau optimal. Comme expliqué toutefois ci-dessus, les valeurs ORAC varient tellement d'un fruit ou d'un légume à l'autre, qu'il est possible de manger 7 fruits et légumes par jour et de ne recevoir que 1 300 unités ou simplement consommer un seul bol de myrtilles et avoir plus de 3 000 unités.

Le tableau 26 illustre l'apport de l'activité antiradicalaire par portion dans les différentes méthodes

Tableau 26 : Apport (en μmol de Trolox) par portion de différents plats dans 3 méthodes de dosages

	Portion (g)	DPPH		ABTS		ORAC	
		$\mu\text{mol/g}$	/portion	$\mu\text{mol/g}$	/portion	$\mu\text{mol/g}$	/portion
Poisson à la grecque	300	0,84	250,88	1,65	495,33	20,27	6079,88
Pomme de terre cuite à l'eau	200	0,53	105,60	1,29	258,57	12,02	2403,05
Aubergines à la provençales	300	0,48	143,93	1,79	537,15	18,51	5553,90
Courgettes à l'indienne	300	0,36	107,78	1,63	488,27	21,01	6303,75
Poêlée savoyarde	300	0,35	104,93	1,29	387,12	17,42	5224,65
Caviar Tomates Confites	300	0,34	100,50	1,16	347,00	16,03	4810,35
Courgettes cuites à la vapeur	150	0,14	20,40	0,66	99,70	13,08	1961,89

D'après la méthode ORAC, le poisson à la grecque semble apporter un équivalent de plus de 6000 unités soit un apport supérieur, à ce qu'il serait préconisé pour maintenir une capacité antioxydante du plasma à son niveau optimal. Ainsi, que ce soit dans la méthode de l'ABTS ou ORAC, où à l'heure actuelle des repères sont établis, les plats ayant un pouvoir antioxydant avéré dans une méthode ont également un pouvoir antioxydant avéré dans une autre.

Ces comparaisons mettent en évidence les qualités fonctionnelles de ces plats : leurs teneurs en polyphénols et leur activité antiradicalaire. Cependant, ils peuvent également mettre en évidence une sous estimation des besoins en unité ORAC, ou que les objectifs de consommation ne prennent en compte que les fruits et légumes.

Naturellement, pour envisager une valorisation, il faut s'assurer que le profil nutritionnel global du plat est bon. Et que la densité énergétique globale du plat n'est pas trop élevée, car on ne peut pas remplacer la consommation de 150g de fraise par 300g d'un plat préparé. En effet, cette méthode d'équivalence, ne s'applique que sur les paramètres testés. Cette visualisation permet de mettre en évidence le fait que certaines propriétés de l'aliment ne sont pas forcément détruites au cours de l'industrialisation, et que notamment les propriétés fonctionnelles de légumes peuvent être préservées.

Cependant, il aurait été opportun de quantifier l'ensemble toutes les molécules antioxydantes du plat, ce qui n'a pas été réalisé. En effet, les dosages ont porté seulement sur les polyphénols (qui ne sont pas les seuls antioxydants des plats). Il faudrait donc réaliser d'autres dosages portant sur l'ensemble des molécules antioxydantes des plats, telles que les caroténoïdes, le sélénium et les vitamines C et E. D'autre part, ces résultats représentent l'activité antiradicalaire et la teneur en phénols totaux de recettes spécifiques produites sur une période déterminée. Le renouvellement des dosages est à effectuer à chaque changement de recettes, de fournisseurs ou de procédés industriels.

A l'heure actuelle, la valorisation de la fonctionnalité d'un aliment, passe également par l'étude de sa biodisponibilité. Et dans le cas des antioxydants et notamment des polyphénols, il n'est, à l'heure actuelle, pas aisée de démontrer l'impact direct d'un plat sur la santé, notamment sur une consommation unique.

CHAPITRE 6 : Biodisponibilité des composants antioxydants et leur activité

La valeur fonctionnelle des polyphénols est établie au niveau de l'aliment, grâce notamment à leur capacité antiradicalaire.

Néanmoins, forts de leur importante valeur fonctionnelle, les polyphénols n'en restent pas moins des constituants ingérés, surmontant de nombreux obstacles tels que la barrière intestinale, l'attaque de la flore intestinale et le passage du foie avant de réaliser leur activité antioxydante. Leur biodisponibilité est variable, suivant la nature de ces polyphénols, leur mode d'ingestion (avec un repas ou individuellement) ou la variabilité de chaque individu. De nombreuses méthodes existent cependant aucun consensus n'a été trouvé afin de déterminer une méthode de référence pour évaluer la biodisponibilité de l'antioxydabilité des polyphénols.

La notion de biodisponibilité intègre un grand nombre de paramètres comme l'absorption intestinale, l'excrétion des conjugués dans la lumière intestinale, le métabolisme par la microflore, le métabolisme intestinal et hépatique, la nature des métabolites circulants, la liaison à l'albumine, le métabolisme dans les tissus cibles, la sécrétion biliaire et l'excrétion urinaire.

Les polyphénols les plus abondants dans l'alimentation humaine ne sont pas nécessairement ceux qui sont retrouvés majoritairement dans l'organisme, soit parce qu'ils sont mal absorbés au niveau intestinal, soit parce qu'ils sont fortement métabolisés et rapidement éliminés après absorption.

Des travaux montrent que l'organisme considère les polyphénols comme des substances toxiques, et va chercher à s'en débarrasser en limitant leur absorption au niveau de l'intestin grêle et/ou en les modifiant de façon à les rendre plus facilement éliminables par les reins et le foie. Ces modifications bloquent les groupements chimiques (hydroxyles) responsables des propriétés antiradicalaires des polyphénols.

Au niveau du plasma, l'effet biologique des polyphénols ne semble pas être attribuable à un effet antiradicalaire direct. En revanche, les polyphénols peuvent moduler l'expression ou l'activité de molécules impliquées dans le processus athérosclérotique, et par exemple diminuer la production de facteurs pro-inflammatoires, et stimuler celle de facteurs anti-inflammatoires (En effet ces microconstituants seraient capables d'induire la transcription de certains gènes codant des enzymes antioxydantes, de moduler le profil inflammatoire d'un

type cellulaire donné, ou d'induire des systèmes de détoxification.). Les polyphénols seraient aussi capables de diminuer d'autres facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires, comme l'hyperlipémie : en inhibant certaines des enzymes clés de la synthèse du cholestérol, et en diminuant l'absorption intestinale des triglycérides. Un effet antiradicalaire des polyphénols reste toutefois possible au niveau du tube digestif, où ils sont largement majoritaires lors de la digestion. Ils pourraient alors agir en limitant les effets délétères des substances pro-oxydantes présentes dans le repas et protéger les autres antioxydants alimentaires de la dégradation.

La plupart de ces mécanismes d'action des microconstituants constituent des pistes explicatives quant à leurs effets santé. Il faut toutefois garder à l'esprit que la plupart des mécanismes moléculaires ont été démontrés *in vitro* et nécessiteraient à ce titre une validation *in vivo*.(Tourniaire, 2006).

Ainsi bien que les polyphénols aient un fort pouvoir antioxydant, ils sont peu biodisponibles, du fait de leur forte métabolisation, leur rapidité d'élimination et leur faible absorption intestinale. Cela signifie qu'un plat contenant des polyphénols ne pourra pas obligatoirement apporter une forte capacité antioxydante à notre organisme et qu'il ne faut pas se limiter à l'étude des polyphénols mais à l'ensemble des composants ayant un pouvoir antioxydant présents dans les plats.

Pour envisager une valorisation, il est nécessaire non seulement ne pas se limiter à l'étude des polyphénols et de tester la biodisponibilité des produits MARIE pour apposer une allégation nutritionnelle ou de santé.

**PARTIE 4 : FONCTIONNALITE ET
COMMUNICATION AU CONSOMMATEUR**

Les tendances nationales, européennes et mondiales montrent l'importance de la santé dans tous les secteurs de la grande consommation. Un cadre réglementaire pour gérer les allégations et les communications devient un besoin impérieux, à la fois pour protéger les consommateurs et les industriels et développer un environnement loyal, sûr, clair et pérenne (Sanogo & Reynal, 2006).

Pour ce faire, l'Union européenne a décidé d'adopter un règlement sur « les allégations nutritionnelles et de santé, portant sur les denrées alimentaires ». Directement applicable au 1^{er} juillet 2007 dans les Etats membres, ce texte s'appuie sur la nécessaire protection de la concurrence intra-communautaire pour justifier l'harmonisation des dispositions nationales en la matière. Leurs disparités peuvent en effet entraver la libre circulation des aliments. Au-delà de cette justification juridique, le règlement est à replacer dans une démarche générale de lutte contre l'obésité engagée par les autorités européennes.

Ce domaine qui touche la santé publique exige un cadre rigoureux, précis, évolutif avec l'accroissement des connaissances. L'administration européenne entend contribuer à une mission importante : assurer au consommateur que les produits qu'il trouve sur le marché ne sont pas nuisibles à sa santé et veiller à ce que chacun des produits qu'il trouve ne puisse véhiculer des propriétés qu'il ne possède. Les liens entre la science nutritionnelle et le développement d'un produit alimentaire atteindraient les consommateurs seulement si les canaux d'une communication adéquate sont développés.

CHAPITRE 1 : Fonctionnalité, consommateur et industriel

1 Fonctionnalité et équilibre alimentaire

L'alimentation est un ensemble de produits d'origine agricole ayant le plus souvent subi un processus industriel dont la consommation sert à couvrir les besoins nutritionnels (ou les dépenses de l'organisme) de l'individu et à lui procurer des satisfactions sensorielles.

Les aliments sont les sources dont l'organisme tire les nutriments banaux et essentiels qui lui sont nécessaires (protéines, lipides, glucides, sels minéraux, vitamines ...) dans la quasi-totalité des produits alimentaires. Les nutriments ne sont pas à l'état libre, mais sous forme combinée que la digestion va transformer en nutriments absorbables et utilisables métaboliquement. Nous mangeons des aliments et non des nutriments et le critère de " qualité nutritionnelle " n'entre que pour une part souvent modeste dans l'éventail des produits que chacun choisit pour son alimentation. Pour des raisons de commodité d'emploi, on classe les aliments en " groupes ". Les aliments d'un même groupe présentent des similitudes dans leur composition et peuvent donc se substituer les uns aux autres sans modification sensible de l'équilibre d'une ration.

Mais, qu'est-ce qu'une alimentation équilibrée ?

La réponse est complexe quand on sait que chaque individu a des besoins particuliers en fonction de sa physiologie, sa génétique, son environnement. Elle semble cependant s'orienter vers un concept de nutrition préventive car bien que nous soyons largement inégaux devant les risques et la maladie, les mêmes règles concernant les grands équilibres nutritionnels et les mécanismes de protection sont applicables à tous.

Ces règles ou Apports Nutritionnels Conseillés servent de base à l'élaboration de conseils pour un ensemble important d'individus considérés comme en bonne santé. Ces conseils s'inscrivent dans une démarche de santé publique.

En général, l'alimentation équilibrée est avant tout variée pour réaliser une synergie entre les différents aliments dont la composition nutritionnelle est le plus souvent complexe.

On traduit en pratique cette synergie en donnant des repères de fréquences, de rythmes de repas et d'associations d'aliments pour des groupes d'individus.

Cependant, de nos jours, le consommateur qui achète des denrées alimentaires est bombardé d'informations. En outre la présentation de ces informations est de plus en plus variée et complexe, et la qualité des étiquettes est fort inégale d'un produit à l'autre et d'un Etat membre à l'autre. Des études ont montré que nombre de consommateurs ne s'y retrouvent plus, qu'ils se sentent submergés face aux étiquettes modernes et qu'il leur est difficile de repérer les informations essentielles.

En matière de santé publique, une des priorités consiste à encourager les Européens à mieux s'alimenter. A cet effet le consommateur doit notamment disposer des outils lui permettant des choix nutritionnels en connaissance de cause. La présence sur les étiquettes des denrées alimentaires, d'informations claires, précises et pertinentes se révèle précieuse pour que le consommateur puisse vérifier exactement ce qu'il achète et ce qu'il mange.

2 Rôle de l'industrie agroalimentaire

Les industries agro-alimentaires communiquent très largement sur leurs produits et sur tous supports d'information, vers les prescripteurs et vers les consommateurs, sur la base de messages à caractère diététique. La réglementation française encadre déjà cette communication, mais les professionnels de la santé attendent des futures directives européennes que les industriels soient tenus à plus de rigueur scientifique dans les formulations de leurs messages nutritionnels.

Le schéma opérationnel classique, rationnel et prudent, implique très largement l'avis de scientifiques dans le processus de développement d'un produit. Or cette représentation est devenue largement virtuelle et, en réalité, le schéma le plus courant est celui où un secteur technologique réalise une percée sur un ingrédient (nouveau, coût) pour lequel un marché doit être trouvé. Un transformateur peut alors s'intéresser à cet ingrédient pour commercialiser des produits nouveaux assortis d'allégations santé. Ces allégations santé ne sont souvent pas valables à court ou moyen terme, et se limitent alors à des impacts montrés sur un marqueur. Le poids des nutritionnistes est alors faible dans ce processus, puisqu'on leur demande avant tout de valider scientifiquement (parfois à posteriori) des arguments de marketing.

Les risques inhérents à cette situation sont nombreux :

- Utilisation d'allégations santé abusive ou insuffisamment validées,
- Perte de crédibilité de la communication scientifique,
- Prise de part de marché par des aliments fonctionnels au détriment d'aliments de base plus protecteurs,
- Avec des ingrédients biologiquement très actifs, sous estimation d'effets secondaires défavorables (on rejoindrait la problématique des médicaments).

Un autre risque, avec une approche trop mercantile des allégations santé, réside dans l'existence d'effets de « mode » avec la mise en avant d'un effet biologique ponctuel jugé vendeur, alors que d'autres fonctionnalités importantes resteraient dans l'ombre. Ceci pourrait de surcroît s'accompagner d'une rotation rapide des arguments de fonctionnalité affichés, puisque le marketing moderne impose un turn over élevé des produits comme des concepts (Demigne, 2003) Il est évident qu'on ne peut bâtir une politique de prévention nutritionnelle cohérente sur de telles bases. En réalité, il faut être conscient du fait que le concept de fonctionnalité n'a de sens qu'au niveau de l'ensemble de la ration alimentaire : quel est l'intérêt de consommer tel ou tel aliment (quelle que soit son efficacité) si le restant de la ration contrecarre son action ?

CHAPITRE 2 : Réglementation

1 Situation des allégations nutritionnelles et de santé avant 2007

Dans l'Union Européenne, on ne disposait pas, avant 2007 de cadre légal en la matière. En effet, les allégations étaient traitées à l'échelon national. Le défi des Etats membres de l'UE était de communiquer des messages qui évitent toute référence à la réduction du risque de maladie. La législation européenne sur l'étiquetage interdit d'attribuer à tout produit alimentaire des propriétés de prévention, de traitement ou de guérison d'un maladie humaine ou toute référence à de telles propriétés. En l'absence d'une Directive sur les allégations, les états membres de l'UE ont appliqué des interprétations différentes de la législation existante sur l'étiquetage.

Cependant dans le même temps, il y a un large consensus sur le fait que les allégations doivent être justifiées pour protéger le consommateur, promouvoir le commerce et encourager la recherche et l'innovation dans l'industrie alimentaire.

2 Nouvelles mesures

Afin de mieux encadrer les pratiques des entreprises, notamment en matière de communication, plusieurs mesures ont été prises.

2.1 Plan d'action de lutte contre l'obésité

Des actions ont été entreprises, tant par les autorités communautaires que nationales pour combattre l'obésité. En France, l'action passe par l'éducation, la concertation, mais également par la réglementation. Le ministère de la santé a lancé en 2001 le Programme national nutrition santé, qui connaît une seconde édition en 2006 (PNNS 2006-2010). Le PNNS a pour objectif d'améliorer l'état de santé de la population en agissant sur le comportement alimentaire. A travers ce projet, l'Etat appelle notamment les acteurs économiques de l'industrie alimentaire à signer des engagements portant sur la composition nutritionnelle des aliments, leur présentation et leur promotion.

Selon le PNNS2 : *« ces engagements représentent une première étape d'une démarche « qualité » nutritionnelle dans laquelle les acteurs économiques recherchent une validation externe de leur politique nutritionnelle ».*

2.2 Proposition de règlement sur les allégations nutritionnelles et de santé du 16 juillet 2003

La proposition traite des allégations nutritionnelles, ou des allégations santé, telles que les messages soulignant une relation positive entre une denrée précise et la santé.

Le règlement établit des règles concernant l'utilisation de ces allégations et autorise aussi certaines allégations de santé (y compris, celles relatives à « une réduction du risque de maladies ») qui étaient auparavant interdites. Le règlement aura pour effet de protéger les consommateurs, d'améliorer la libre circulation des marchandises, de renforcer la sécurité juridique des opérateurs, de prévenir les allégations abusives, et, ce faisant, d'assurer une

concurrence équitable. Les messages relatifs aux maladies, jusqu'à présent strictement interdits par la législation communautaire, seront désormais permis à condition d'être scientifiquement justifiés, et autorisés à l'échelle européenne.

2.3 Règlement de décembre 2006

Le règlement 1924/2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires a été publié le 20 décembre 2006. L'application a été effective à partir du 1^{er} juillet 2007 dans les Etats membres de l'Union Européenne.

- Objectifs : Protection du consommateur

Une publicité nutritionnelle ou de santé qui serait trompeuse ou fausse peut avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur en l'incitant à consommer une denrée ou un type de denrée alimentaire ou en l'en dissuadant. Les allégations autorisées sont reprises dans une liste harmonisée pour toute l'Union européenne (UE). Chaque allégation est définie avec des valeurs précises et quantifiables.

La législation sur les allégations nutritionnelles et de santé protège le consommateur en interdisant toute information:

- inexacte, peu compréhensible ou trompeuse (par exemple qui attribue, à tort ou sans que cela soit avéré scientifiquement, à la denrée des vertus médicinales);
- qui suscite des doutes concernant la sécurité ou l'adéquation nutritionnelle d'autres produits (publicité comparative);
- qui encourage ou tolère une consommation excessive d'un produit;
- qui incite à consommer un produit en affirmant ou suggérant directement ou indirectement qu'une alimentation équilibrée ne fournit pas tous les nutriments nécessaires ;
- qui essaie d'effrayer le consommateur en mentionnant des modifications des fonctions corporelles.

- **Conditions d'utilisation**

Les allégations doivent remplir certaines conditions pour être utilisées en tant que publicité sur une denrée alimentaire. La substance (par exemple vitamines, fibres, etc.) doit être présente en quantité suffisante pour avoir des effets bénéfiques. Si l'allégation porte sur une valeur énergétique réduite, elle doit correspondre à une réduction d'au moins 30% de la valeur énergétique totale de la denrée alimentaire (25% pour le sel).

- **Allégations de santé et étiquetage**

Lorsqu'une allégation de santé est faite, les normes d'étiquetage nutritionnel prévues par la directive 90/496/CEE doivent être appliquées. L'étiquetage doit donc inclure:

- la valeur énergétique;
- la quantité de protéines, de glucides, de sucres, de lipides, d'acides gras saturés, de fibres alimentaires et de sodium.

L'étiquetage ou la campagne publicitaire incluant une allégation de santé doit fournir certaines informations obligatoires:

- l'importance d'une alimentation et d'un mode de vie sains;
- la quantité de la denrée alimentaire et le mode de consommation assurant le bénéfice allégué;
- les personnes qui doivent éviter cette substance;
- une indication des risques pour la santé en cas de consommation excessive.

Le présent règlement interdit toutes les allégations de santé faisant référence au rythme ou à l'importance de la perte de poids, de même que celles qui indiquent qu'il est préjudiciable pour la santé de ne pas consommer un certain type d'aliment, les références à un médecin ou un professionnel de la santé déterminé, aux associations autres que les associations médicales nationales et organismes philanthropiques actifs dans le domaine de la santé et les allégations donnant à penser que s'abstenir de consommer la denrée pourrait être préjudiciable à la santé.

Le règlement autorise, par contre, par dérogation à la directive 2000/13/CE concernant l'étiquetage (qui interdit toute référence à des propriétés concernant la guérison, le traitement

et la prévention d'une maladie humaine), les allégations sur la réduction du risque d'une maladie, pour autant que la demande d'autorisation soit approuvée (voir ci-dessous).

- Demande d'autorisation

Pour autoriser une nouvelle allégation ou modifier la liste existante, le fabricant introduit sa demande auprès de l'État membre concerné qui la transmet à l'Autorité européenne de sécurité des aliments ([EFSA](#)). Sur la base de l'avis de l'EFSA, une décision relative à l'utilisation est prise par la Commission.

CHAPITRE 3 : Critères pour alléguer

1 Etablissement de la base scientifique légale des allégations santé

Il n'existait pas de consensus scientifique européen quant à l'évaluation des allégations. L'International Life Science Institute (ILSI Europe) a initié l'action concertée PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods). Son objectif est de définir des critères d'évaluation du soutien scientifique aux allégations de santé liées aux produits alimentaires. Ce projet s'appuie sur un autre projet européen majeur : FUFOSE (Functional Foods Science in Europe)

2 Les différents types d'allégations concernées par le règlement

Trois types d'allégations seront autorisés sur les denrées alimentaires commercialisées dans l'Union européenne :

- Allégations nutritionnelles qui affirment, suggèrent ou impliquent qu'une denrée alimentaire possède des propriétés nutritionnelles bénéfiques particulières de par sa composition (valeur énergétique ou teneur dans un nutriment particulier). Exemples de ce type d'allégation : « source de », « sans », « riche en », « faible en » ou « à teneur réduite en » calories ou dans un nutriment en particulier.

- Allégations de santé qui affirment, suggèrent ou impliquent l'existence d'une relation entre, d'une part une denrée alimentaire ou l'un de ses composants et d'autre part, la santé. Ce type d'allégation précise la fonction physiologique d'un composant, comme par exemple « le calcium peut renforcer les os ». L'allégation doit être basée sur des données scientifiques généralement acceptées et être bien comprise par le consommateur moyen.

- Le troisième type d'allégation concerne les allégations relatives à la réduction d'un risque de maladie. Il s'agit d'allégations de santé qui affirment, suggèrent ou impliquent qu'une denrée alimentaire ou l'un de ses composants réduit sensiblement un facteur de risque de développement d'une maladie humaine. Par exemple, les phytostérols peuvent réduire le taux de cholestérol sanguin et atténuer ainsi le risque de maladie cardiovasculaire. Pour la première fois, la mention des maladies sera autorisée sur les denrées alimentaires, mais uniquement après approbation de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESA).

Les autres allégations de santé autorisées sont de trois types. Ce sont celles qui décrivent ou mentionnent :

- le rôle d'un nutriment ou d'une autre substance dans la croissance, dans le développement et dans les fonctions de l'organisme. Il s'agit de ce qu'on désignait habituellement par « allégation fonctionnelle » ou « allégation nutritionnelle fonctionnelle » ;
- les fonctions psychologiques et comportementales ;
- l'amaigrissement, le contrôle du poids, la réduction de la sensation de faim, l'accentuation de la sensation de satiété ou la réduction de la valeur énergétique du régime alimentaire.

3 Profils nutritionnels et allégations : les « bons et les mauvais régimes »

Le principe de base de la nutrition est qu'il n'existe pas de « bon aliments » et de mauvais « aliments », mais plutôt de « bons régimes » et de « mauvais régimes ». Tous les aliments peuvent être inclus dans un régime alimentaire varié sur le long terme. Cependant, les denrées alimentaires portant une allégation seront automatiquement perçues par les consommateurs comme étant de « bonnes » denrées alimentaires. En outre les allégations qui vantent les

bienfaits de la consommation d'un certain produit peuvent inciter les consommateurs à manger trop de quelques choses qui ne devraient représenter qu'une petite partie d'un bon régime alimentaire. Il convient donc de restreindre l'utilisation des allégations portant sur certaines denrées alimentaires en fonction du profil nutritionnel de ces dernières. Les teneurs en matières grasses totales, graisses saturées, glucides ou sel sont des critères caractérisant le profil nutritionnel des produits, puisque les données scientifiques montrent le lien entre une surconsommation de ces nutriments et certaines maladies chroniques (rapport OMS 2003).

Les allégations sont formulées pour insister sur le fait que les produits présentent un bénéfice supplémentaire en termes de santé ou de nutrition. Dans la plupart des cas les consommateurs pensent que les produits porteurs de certaines allégations sont meilleurs pour la santé et leur bien-être. Toutefois, pour le moment, une denrée alimentaire qui est riche en matière grasses, en sel et ou en sucre peut quand même utiliser des allégations de type « riche en vitamine C ou « riche en fibres », même si ses bénéfices globaux en termes de santé et de nutrition sont faibles.

Le règlement vise à protéger les consommateurs contre des informations trompeuses de ce type, en contrôlant les allégations nutritionnelles et de santé. Dans le cas des allégations santé, ce contrôle sera exercé grâce à l'établissement d'une liste positive d'allégations dont l'établissement sera fait en trois temps :

- Les Etats membres ont envoyé la liste des allégations qu'ils considèrent comme valides, en fonctions des données scientifiques généralement acceptées sur leur territoire de compétence (janvier 2008)
- L'EFSA évalue ces allégations dans un délai de 2 ans et la Commission décide *in fine*
- La liste des allégations de santé sera versée à un registre public (2010)

Pour l'approbation d'une nouvelle allégation de santé, le fabricant devra constituer un dossier, accompagné de tous les justificatifs qu'il présentera à l'EFSA, laquelle suivra la procédure d'approbation.

Pour les allégations relatives à la réduction d'un risque de maladie et les allégations portant sur la santé des enfants, des procédures plus complexes seront mises en place.

Le règlement exige que la Commission Européenne établisse des profils nutritionnels qui correspondent aux critères que les denrées alimentaires doivent respecter avant de donner lieu à des allégations nutritionnelles ou de santé. L'établissement des profils nutritionnels repose sur l'avis scientifique de l'EFSA. Si des profils nutritionnels sont acceptés par les

Etats membres, ceux-ci seront adoptés par la Commission et utilisés comme critère pour l'approbation des allégations.

Par dérogation et pour faciliter l'application de cette mesure, les allégations nutritionnelles sont autorisées dans le cas où un nutriment particulier excède le profil nutritionnel, pourvu qu'une mention portant spécialement sur ledit nutriment apparaisse à proximité de l'allégation, avec la même visibilité. Si deux nutriments ou plus excèdent le profil, aucune allégation nutritionnelle ne pourra être formulée.

4 Quelles démonstrations scientifiques ?

La démonstration scientifique des allégations est une constante depuis les premières propositions communautaires. S'il est vrai que le degré de « démonstration » a varié selon le type d'allégation, il est tout aussi vrai que son exigence s'est définitivement imposée dans le texte du règlement CE 1924/2006.

Or *Sur* quoi et *comment* doit elle être scientifiquement fondée ?

La proposition actuelle se caractérise par un pragmatisme peu fréquent dans le cadre juridique. Ainsi, et en ce qui concerne les allégations, la norme établit que « *les allégations nutritionnelles et de santé reposent sur des données scientifiques généralement admises et sont justifiées par de telles preuves* », elle va même jusqu'à préciser le type de substance ou nutriment et les effets que l'on peut attendre d'eux. En général il s'agit de constater l'existence d'effets nutritionnels ou physiologiques bénéfiques pour l'organisme, provoqués par la présence ou l'absence de substance (s) sur laquelle (lesquelles) on effectue l'allégation. Par conséquent, il s'agit d'un nutriment ou d'une substance qui devra être présente (ou absente) en quantités réduites permettant de produire l'effet nutritionnel ou physiologique escompté. De plus, la quantité consommée devra être normale pour une denrée alimentaire et sous une forme assimilable.

Quant au *comment* ou selon quels critères cette évaluation sera effectuée, il faudra arriver à un consensus sur les conditions scientifiques exigées : l'Union Européenne travaille depuis longtemps sur ces critères, et il y a plusieurs années elle a mis en œuvre une action concertée à caractère scientifique (« PASSCLAIM »). Celle-ci s'est fixée comme objectif d'établir des protocoles concordant et homogènes au sein de l'Europe. Et si les différentes

propositions précédentes ont expressément mentionné l'action Passclaim, force est de constater que ces références ont été éliminées dans la version définitive du règlement (CE) 1924/2006 ,ce qui n'empêche pas que l'European Food Safety Agency (EFSA) d'en tenir compte dans ses évaluations. (Banares Vilella, 2008)

5 Le PASSCLAIM, un outil de validation des allégations et d'information du consommateur

Le PASSCLAIM aspire à établir des critères communs pour évaluer la justification scientifique des allégations de santé fournissant la structure pour préparer des dossiers scientifiques soutenant des allégations. Le document de consensus PASSCLAIM aidera les personnes qui formulent les allégations, celles qui en définissent le cadre légal et il améliorera aussi la crédibilité des allégations auprès des consommateurs. Cette stratégie intégrée augmentera la confiance du consommateur envers les allégations de santé et cernera mieux ses attentes.

Les produits alimentaires arborant une allégation de santé doivent apporter des informations complémentaires : notamment :

- sur la quantité et la fréquence de consommation,
- les interactions potentielles avec d'autres constituants de l'alimentation,
- l'impact potentiel sur le métabolisme,
- et les éventuels effets défavorables, comme les allergies ou les intolérances.

Les critères finaux présentés sont accompagnés d'une synthèse de leurs motifs, explication, commentaires et discussions sous-jacents à leur développement.

- L'alimentation ou les produits alimentaires ayant suscité les allégations doivent être caractérisées
- La justification d'une allégation doit être basée sur des données humaines, issues principalement d'expérimentations qui doivent être conçues en tenant compte des considérations suivantes :
 - o Groupe étudiés représentatifs du groupe cible
 - o Contrôles appropriés
 - o Durée de l'exposition et suivi adéquats pour démontrer l'effet escompté

- o Caractérisation du régime alimentaire et des autres aspects du style de vie des groupes étudiés
- o Quantité de nourriture ou de produits alimentaires sur l'effet fonctionnel du produit
- o Surveillance de la conformité avec la consommation de nourriture ou de produits alimentaires testés
- o Capacité statistiques de tester les hypothèses
- Lorsque le critère réel d'une allégation ne peut pas être mesuré directement, les études doivent recourir à des marqueurs
- Les marqueurs doivent être
 - o Biologiquement valides dans le sens où ils représentent une relation connue avec le résultat final et où leur variabilité au sein de la population cible est connue ;
 - o Méthodologiquement valides par rapport à leurs caractéristiques analytiques
- Au sein d'une étude, la variable cible doit changer de façon significative d'un point de vue statistique. Ce changement doit avoir une signification biologique pour les groupe cible, en accord avec l'allégation soutenue
- Une allégation doit être justifiée scientifiquement. L'ensemble des données disponibles et la pondération des preuves doivent être pris en compte.

Les résultats présentent une vue de consensus de critères qui, s'ils sont atteints, garantissent que les effets scientifiques soutenant les allégations de santé sont appropriés et que ces allégations peuvent être considérées comme valides. Ils évoquent également les atouts et les limites des types d'approches et de données scientifiques, et synthétisent les marqueurs des résultats choisis comme exemples par les groupes d'experts et correspondant aux différents états de santé et de maladie.

La fonctionnalité alimentaire constitue sans nul doute le plus grand défi scientifique, aujourd'hui et à l'avenir. La communication aux consommateurs est également vitale pour les aider à faire des choix éclairés sur les produits alimentaires.

L'EFSA aura un rôle scientifique majeur à jouer en aidant la Commission européenne et les Etats membres à mettre en œuvre la nouvelle législation concernant les allégations nutritionnelles et de santé.

L'EFSA se réfèrera au PASSCLAIM dans le but de développer les moyens nécessaires à la justification scientifique de ces allégations.

6 Problématique de la valorisation des antioxydants

Concernant la valorisation, les polyphénols ont le double avantage d'avoir une image naturelle « végétale » et d'être rapportés comme de puissants pouvoirs antioxydants *in vitro*.

Malgré l'effet bénéfique prouvé de la consommation suffisante de fruits et légumes, l'efficacité des différentes substances prises séparément reste à démontrer de façon irréfutable. Il n'est pas dit qu'un extrait poly phénolique incorporé dans un aliment reproduira fidèlement les effets dus à la consommation du végétal d'origine. Il est logique d'admettre qu'en fait, ce sont l'ensemble des antioxydants présents dans le végétal qui agissent de façon synergique. Par ailleurs ces composés pris isolément et consommés en grandes quantités pourraient provoquer des effets indésirables contraires au but recherché.

Cas des polyphénols et de leur activité antioxydante

A l'heure actuelle, les textes qui existent pour les nutriments ne sont pas adaptés aux polyphénols et aux antioxydants en général. Il est important et urgent que des travaux de recherches soient menés sur l'homme afin de pouvoir déterminer le niveau d'apport souhaitable.

Pour l'instant, en France, l'administration estime que les polyphénols n'étant pas prévus dans la liste positive des nutriments ayant accès aux allégations, une telle allégation n'est pas autorisée. Pourtant, et avec toute l'équivoque que cela présente, cette même administration estime possible qu'un professionnel puisse indiquer les bénéfices que représentent ces polyphénols pour le consommateur.

Les allégations ne sont possibles que lorsque le nutriment ou la substance concernée font l'objet d'un apport journalier recommandé (AJR). L'allégation fonctionnelle est également acceptable lorsque les éléments concernés ont un « rôle fondé scientifiquement et admis dans les recommandations diététiques généralement reconnues comme scientifiquement établies ».

A ce jour, il existe encore peu de données sur la composition des aliments en polyphénols. De même il n'y a pas d'apport journalier recommandé (AJR). En revanche, le rôle des polyphénols dans l'activité antioxydante des produits végétaux est reconnu par la communauté scientifique. En France, l'AFSSA reconnaît un statut antioxydant aux extraits végétaux. Mais elle ne va pas plus loin. De ce fait, la revendication fonctionnelle pour ce type de substance et son lien avec une fonction physiologique nécessitent l'examen de dossiers au cas par cas.

Dès le départ, l'action concertée FUFLOSE avait mis l'accent sur les « fonctions » de l'organisme. Dans le document final de l'action FUFLOSE, on trouve quelques exemples, les plus plausibles, de possibilités de modulation de « fonctions clés » par des constituants alimentaires « candidats », ainsi que de marqueurs possibles. Dans le champ thématique, défense contre les espèces réactives de l'oxygène, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes occupent une place importante parmi les constituants alimentaires sélectionnés comme candidats. Cependant, les effets santé des polyphénols dépendent de leur niveau de consommation et de leur biodisponibilité, paramètres qui peuvent varier énormément d'un composé à un autre. Les études connues concernent principalement les aliments simples (fruits et légumes, thé, café ou chocolat) et les études sur les interactions entre aliments nous empêchent d'extrapoler les études sur les aliments simples.

L'absorption et le métabolisme de polyphénols dépendent de nombreux facteurs : leur structure chimique, leur niveau de glycosylation et d'acylation, leur poids moléculaire, leur taux de polymérisation, leur solubilité, leur conjugaison avec d'autres polyphénols, leur combinaison éventuelle sous forme de complexes à divers ingrédients (notamment les protéines). Les phytonutriments peuvent subir une biotransformation par des enzymes de l'intestin grêle, puis être métabolisés par la flore intestinale. Une fois entrés dans l'organisme, ils peuvent être métabolisés par le foie et par les reins, notamment sous l'effet de diverses enzymes. Enfin, ils demeurent dans le corps plus ou moins longtemps, avant d'être éliminés avec l'urine. L'exploration de ces mécanismes est loin d'être achevée et les méthodes d'analyse sont souvent de maniement délicat. L'immense diversité des phytonutriments phénoliques fait que tous n'ont pu recevoir une égale attention : la quercétine a été la molécule la plus étudiée.

Lorsque l'on procède à des tests avec des extraits de plante qui contiennent un mélange de plusieurs composants phénoliques, on ne peut en déduire que des renseignements sur leur

comportement en groupe ; si l'on veut observer celui d'une molécule déterminée, il faut qu'elle soit ingérée à l'état pur, comme supplément alimentaire, mais alors les résultats ne sont pas forcément les mêmes, car l'insertion de la molécule au sein d'une matrice alimentaire ou même dans le bol alimentaire est susceptible de modifier sa réactivité (comme nous l'avons vu dans la Partie 2). L'effet de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité des polyphénols n'a pas été étudié de manière approfondie. Des interactions directes entre polyphénols et certains constituants de la ration tels que les protéines ou les polysaccharides pourraient affecter leur absorption intestinale. De plus, des effets plus indirects de l'alimentation sur divers paramètres de la physiologie intestinale (pH, fermentation intestinales, stimulation de la sécrétion biliaire, temps de transit...). Enfin les enzymes et les éventuels transporteurs impliqués dans l'absorption et le métabolisme des polyphénols pourraient être induits ou inhibés en présence de certains micronutriments.

Les connaissances acquises sur la biodisponibilité des polyphénols devraient conduire à l'identification de marqueurs permettant d'évaluer ou comparer les consommations de polyphénols dans diverses populations. L'identification de tels marqueurs contribuera au développement des études épidémiologiques, et permettra de préciser les liens entre la consommation des polyphénols et la santé. Ceci permettra à terme de déterminer la nature des polyphénols et les niveaux d'apport les plus favorables au maintien de la santé.

CONCLUSION

La France s'est dotée depuis 2001 du Programme National nutrition Santé (PNNS), programme qui montre la volonté des pouvoirs publics de réduire le risque de maladies telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, l'obésité ou l'ostéoporose dans lesquelles l'alimentation joue un rôle déterminant de protection ou d'aggravation.

Le PNNS est entré dans sa seconde phase (2006-2010). L'accent est mis sur la prévention nutritionnelle et prévoit d'agir sur l'offre alimentaire. Des actions voient le jour pour :

- inciter à optimiser la qualité nutritionnelle des aliments mis sur le marché tout en respectant la gastronomie, sans nuire à leur accessibilité pour tous,
- orienter la demande des consommateurs, notamment en donnant une information pratique et simple pour orienter les choix des consommateurs au moment de l'acte d'achat.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les réflexions sur l'information nutritionnelle et ses représentations.

De nombreuses études en nutrition humaine ont été réalisées dans le but de définir le rôle de chaque constituant alimentaire sur la santé et le bien être, ainsi que la quantité quotidienne nécessaire à l'expression de leur fonctionnalité sur l'organisme. Mais ces recherches ont négligé jusqu'à présent un point essentiel : les nutriments font partie intégrante d'un ensemble, d'une entité, l'« aliment », lequel est exposé à de nombreux facteurs environnementaux (associations alimentaires, procédés agro alimentaires et préparations ménagères, conservation) et individuels (facteurs génétiques, habitudes alimentaires).

Les constituants de l'aliment, comme toutes molécules, peuvent interagir avec d'autres. Leurs qualités fonctionnelles, nutritives ou encore sensibles ne sont ni immuables, ni stables, mais dépendent d'un grand nombre de facteurs de variations essentiels : conditions de stockage, de préparation, de transformation.

Ainsi, pour approcher le plus adéquatement possible la notion de fonctionnalité alimentaire, il faudrait évaluer les propriétés des constituants de l'aliment sur la santé et le bien être des individus au sein même de leur matrice, l'« aliment », dans les conditions physiologiques de consommation et considérer à la fois, les facteurs génétiques propres à chaque individu et essentiels à l'expression de cette fonctionnalité, et les facteurs inhérents aux habitudes du consommateur (mode de préparation, méthode de conservation).

Dans la pratique on ne devrait donc pas parler de fonctionnalité de constituants de l'aliment particuliers, mais de fonctionnalité alimentaire, voire même de régime fonctionnel.

L'urbanisation, la mondialisation, l'industrialisation de nos aliments ont contribué au changement des habitudes alimentaires. L'explosion du tout portatif a gagné notre alimentation, apportant une réponse immédiate à une faim individuelle, n'importe où, n'importe quand. Le temps consacré au repas est de plus en plus court, et sa préparation encore plus. Ainsi, le plat préparé devient une alternative de repas, cependant il doit pouvoir s'intégrer dans une journée équilibrée, et doit donner une information claire sur la composition, les valeurs nutritionnelles du produit et des suggestions de menus équilibrés autour du produit dans le respect des apports nutritionnels conseillés.

Le produit que nous mangeons doit rester agréable, nutritionnellement et fonctionnellement correct. Une meilleure connaissance du plat prêt à l'emploi, permet non seulement d'orienter les développements produits vers la maîtrise de leurs propriétés nutritionnelles et fonctionnelles putatives, mais également une meilleure protection du consommateur. C'est pourquoi ce travail a été entrepris, avant l'étude d'une fonctionnalité.

Bien qu'encore à leur début, les études sur les interactions entre composés fonctionnels se développent aujourd'hui pour améliorer les formulations alimentaires et les recommandations nutritionnelles, ainsi que les conseils en termes de préparation culinaire et de conservation. Les études, qui en résultent, ne sont qu'à leur balbutiement et de nouvelles recommandations et allégations doivent voir le jour dans les prochaines années.

La révision progressive de l'attribution des allégations fonctionnelles et santé, mais aussi la maîtrise des qualités fonctionnelles de ces aliments par une bonne connaissance des interactions entre les différents ingrédients qui les constituent, devraient permettre peu à peu une meilleure approche de la fonctionnalité alimentaire.

La plupart de ces antioxydants se retrouvent dans les fruits et légumes, ce qui en renforce tout leur intérêt de ceci en matière de prévention des diverses pathologies citées ci-dessus. Plusieurs pays ont ainsi mené des campagnes de type « 5 or 6 – a – day », visant à inciter le grand public à consommer au moins entre 5 et 10 portions de fruits et légumes par jour, soit un équivalent minimal de 600 g par jour.

En termes de fonctionnalité, les polyphénols au sein de l'alimentation sont prometteurs, mais la course à leur exploitation commerciale peut inciter à jouer les apprentis

sorciers dans la mesure où il manque un certain nombre d'études élucidant leurs mécanismes d'action.

Forts de leur importante valeur fonctionnelle grâce à leurs activités antioxydantes, les polyphénols n'en restent pas moins des constituants ingérés, surmontant de nombreux obstacles tels que la barrière intestinale, l'attaque de la flore intestinale et le passage du foie avant de réaliser leur activité antioxydante. Leur biodisponibilité est donc variable, suivant la nature de ces polyphénols, leur mode d'ingestion (avec un repas ou individuellement) ou la variabilité de chaque individu.

Si l'on extrapole les connaissances accumulées dans le domaine des antioxydants en général, des synergies et des complémentarités qui existent dans leur devenir, tout porte à croire qu'il vaut mieux chercher à trouver cette grande diversité parmi les polyphénols, que de chercher à augmenter de façon importante l'un ou l'autre d'entre eux.

REFERENCES

- Allwood MC & Martin HJ (2000) The photodegradation of vitamins A and E in parenteral nutrition mixtures during infusion. *Clinical Nutrition* **19**, 339-342.
- Amiot-Carlin M-J, Barberger-Gateau P, Dallongeville J, Dauchet L, Delcourt C, Demigné C, Dupont C, Latino-Martel P, Roy C & Verger P (2007) Rapport INRA " Les fruits et légumes dans l'alimentation", pp. 374.
- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL & Steinberg FM (2001) Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *Journal of Nutrition* **131**, 2837-2842.
- Arts MJTJ, Haenen GRMM, Voss H-P & Bast A (2001) Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology* **39**, 787-791.
- Banares Vilella S (2008) Aliments fonctionnels et allégations alimentaires dans l'Union Européenne: une approche juridique. In *Aliments fonctionnels*, pp. 23-51 [L Tec&Doc, editor]. Paris.
- Bergquist SAM, Gertsson UE & Olsson ME (2006) Influence of growth stage and postharvest storage on ascorbic acid and carotenoid content and visual quality of baby spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 346-355.
- Bors W, Heller W, Michel C & Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* **186**, 343-355.
- Brat P, George S, Bellamy A, Du Chaffaut L, Scalbert A, Mennen L, Arnault N & Amiot MJ (2006) Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *Journal of Nutrition* **136**, 2368-2373.
- Bravo L (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**, 317-333.
- Cacace JE & Mazza G (2002) Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5939-5946.
- Cacace JE & Mazza G (2003) Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* **68**, 240-248.
- Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL & Sauvaigo S (2002) Recent aspects of oxidative DNA damage: Guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biological Chemistry* **383**, 933-943.

- Cao G, Booth SL, Sadowski JA & Prior RL (1998a) Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition* **68**, 1081-1087.
- Cao G, Russell RM, Lischner N & Prior RL (1998b) Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *Journal of Nutrition* **128**, 2383-2390.
- Cheng Z, Su L, Moore J, Zhou K, Luther M, Yin JJ & Yu L (2006) Effects of postharvest treatment and heat stress on availability of wheat antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 5623-5629.
- Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R & Larondelle Y (2007) Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers. *Separation and Purification Technology* **55**, 217-225.
- Cho SJ, Rhee DK & Pyo S (2006) Allicin, a major component of garlic, inhibits apoptosis of macrophage in a depleted nutritional state. *Nutrition* **22**, 1177-1184.
- Chung SY & Champagne ET (1999) Allergenicity of Maillard reaction products from peanut proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 5227-5231.
- Cirico TL & Omaye ST (2006) Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 510-516.
- Dacosta Y (2003) *Les phytonutriments bioactifs*, YVES DACOSTA ed. Paris.
- Dangles O (2006) Propriétés chimiques des polyphénols. In *Les polyphénols en agroalimentaire*, pp. 29-50 [Tec&Doc, editor]. Paris: Lavoisier.
- Davies JN & Hobson GE (1981) The constituents of tomato fruit--the influence of environment, nutrition, and genotype. *Critical reviews in food science and nutrition* **15**, 205-280.
- Davis EA (1995) Functionality of sugars: Physicochemical interactions in foods. *American Journal of Clinical Nutrition* **62**.
- Demigne. C (2003) Aliments fonctionnels : Aspects historiques. Compte rendu de l'Université d'été de Nutrition. Clermont-Ferrand: INRA.
- Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB & Roberfroid MB (1999) Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition* **81**.

- Dragovic-Uzelac V, Levaj B, Mrkic V, Bursac D & Boras M (2007) The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry* **102**, 966-975.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**, 47-95.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H & Jurgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine* **13**, 341-390.
- Ewald C, Fjellkner-Modig S, Johansson K, Sjöholm I & Akesson B (1999) Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry* **64**, 231-235.
- Fang Z, Hu Y, Liu D, Chen J & Ye X (2008) Changes of phenolic acids and antioxidant activities during potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss.) pickling. *Food Chemistry* **108**, 811-817.
- Faure H, Fayol V, Galabert C, Grolier P, Le Moel G, Steghens JP, Van Kappel A & Nabet F (1999) Carotenoids: 1. Metabolism and physiology. *Annales de Biologie Clinique* **57**, 169-183.
- Favier A (2003) The oxidative stress: Concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. *Actualité Chimique*, 108-115.
- Favier A (2006) Oxidative stress in human diseases. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **64**, 390-396.
- Feinberg M (2006) Composition des aliments. In *Analyse des risques alimentaires*, pp. 398 [Tec&Doc, editor]. Paris: Lavoisier.
- Feinberg M, Ireland-Ripert J, Favier J-C & Toque C (1995) *Répertoire général des aliments*: Lavoisier.
- Finley JW (2005) Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Annals of Botany* **95**, 1075-1096.
- Fiocchi A, Restani P, Travaini M, Decet E, Gaiaschi A, Bernardo L & Riva E (1999) Carob is not allergenic in peanut-allergic subjects. *Clinical and Experimental Allergy* **29**, 402-406.
- Fish WW & Davis AR (2003) The effects of frozen storage conditions on lycopene stability in watermelon tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 3582-3585.

- Fontaine E (2001) Production and elimination of oxygen free radicals. In *Journées annuelles de diabetologie de l'Hotel-Dieu*, pp. 57-63.
- Fuhrman B & Aviram M (2001) Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* **12**, 41-48.
- Fulbert JC & Cals MJ (1992) Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathologie Biologie* **40**, 66-77.
- Ganther HE (1999) Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-1666.
- Gao L & Mazza G (1996) Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *Journal of Food Science* **61**, 600-603.
- Gärtner C, Stahl W & Sies H (1997) Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *American Journal of Clinical Nutrition* **66**, 116-122.
- Gorinstein S, Martin-Belloso O, Lojek A, C?i?z M, Soliva-Fortuny R, Park YS, Caspi A, Libman I & Trakhtenberg S (2002) Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 1166-1170.
- Gruber P, Vieths S, Wangorsch A, Nerkamp J & Hofmann T (2004) Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4002-4007.
- Gutteridge JMC (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* **41**, 1819-1828.
- Guyot S, Marnet N, Sanoner P & Drilleau JF (2003) Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6240-6247.
- Halliwel B, Rafter J & Jenner A (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American journal of clinical nutrition* **81**.
- Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerød H, Andersen LF, Moskaug JØ, Jacobs Jr DR & Blomhoff R (2002) A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition* **132**, 461-471.
- Hanson PM, Yang RY, Wu J, Chen JT, Ledesma D, Tsou SCS & Lee TC (2004) Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**, 704-711.

- Hasler CM (2002) Functional foods: Benefits, concerns and challenges - A position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition* **132**, 3772-3781.
- Heinecke JW (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: Implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* **141**, 1-15.
- Heo HJ, Kim YJ, Chung D & Kim DO (2007) Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry* **104**, 87-92.
- Herrero M, Martin-Alvarez PJ, Senorans FJ, Cifuentes A & Ibanez E (2005) Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry* **93**, 417-423.
- Huang D, Boxin OU & Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1841-1856.
- Irigaray P, Ogier V, Jacquenet S, Notet V, Sibille P, Me?jean L, Bihain BE & Yen FT (2006) Benzo[a]pyrene impairs b-adrenergic stimulation of adipose tissue lipolysis and causes weight gain in mice: A novel molecular mechanism of toxicity for a common food pollutant. *FEBS Journal* **273**, 1362-1372.
- Jeffery EH, Brown AF, Kurilich AC, Keck AS, Matusheski N, Klein BP & Juvik JA (2003) Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* **16**, 323-330.
- Jimenez-Escrig A, Santos-Hidalgo AB & Saura-Calixto F (2006) Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3462-3471.
- Jiratanan T & Liut RH (2004) Antioxidant Activity of Processed Table Beets (*Beta vulgaris* var, *conditiva*) and Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 2659-2670.
- Junien C (2002) Obesity and type 2 diabetes: The epigenetic inheritance hypothesis. *Cahier de Nutrition et Diététique* **37**, 261-272.
- Junien C (2003) *Nutrigénétique du risque cardiovasculaire: terrains génétiques et nutrition*. Paris: TEC&DOC.
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T & Jukic M (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* **94**, 550-557.

- Kerkhofs NS, Lister CE & Savage GP (2005) Change in colour and antioxidant content of tomato cultivars following forced-air drying. *Plant Foods for Human Nutrition* **60**, 117-121.
- King A & Young G (1999) Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* **99**, 213-218.
- Kuhnau 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.
- Lata B (2007) Relationship between apple peel and the whole fruit antioxidant content: year and cultivar variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 663-671.
- Lemoine ML, Civello PM, Martinez GA & Chaves AR (2007) Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 1132-1139.
- Léonil J, Bosc C, Maubois JL & Tomé D (2001) Protéines. In *Lait, Nutrition et santé* [TD Lavoisier, editor]. Paris: Tec & Doc
- Lorient D (2001a) Influence des traitements technologiques sur les propriétés nutritionnelles du lait. In *Lait, nutrition et santé*, pp. 192-231. Paris: Tec & Doc (Collection Sciences & techniques agroalimentaires, 3ème édition).
- Macheix J-J, Fleuriet A & P S-M (2006) Composés phénoliques dans la plante- Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In *Les polyphénols en agroalimentaires*, pp. 1-50 [Tec&Doc, editor]. Paris: Lavoisier.
- MacLean DD, Murr DP, DeEll JR & Horvat CR (2006) Postharvest variation in apple (*Malus x domestica* Borkh.) flavonoids following harvest, storage, and 1-MCP treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 870-878.
- Makris DP & Rossiter JT (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**, 3216-3222.
- Malien-Aubert C & Amiot-carlin M-J (2006) Pigments phénoliques - Structures, stabilité, marché des colorants naturels et effets sur la santé. In *Les polyphénols en agroalimentaire*, pp. 295-339 [Tec&Doc, editor]. Paris: Lavoisier.
- Manach C, Scalbert A, Remesy C & Morand C (2006) Consommation et biodisponibilité des polyphénols. In *Les polyphénols en agroalimentaire*, pp. 361-390 [Lavoisier, editor].
- Martin A (2001) *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Paris: Tec & Doc

- Martin A, Azaïs-Braesco V, Couet C, Cynober L, Guéguen L, Lairon D, Laville M, Legrand P, Patureau Mirand G, Pérès G, Poitier de Courcy G & Vidailhet M (2001) *Apports nutritionnels conseillés, 3ème édition*, Tec&Doc ed.
- Mates JM, Perez-Gomez C & De Castro IN (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* **32**, 595-603.
- Mayer-Miebach E, Behsnilian D, Regier M & Schuchmann HP (2005) Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential. *Food Research International* **38**, 1103-1108.
- Maynard L.A WO (1962) Atwater - a biographical sketch (May 3, 1844-October 6, 1907). *Journal of Nutrition*, 3-9.
- Megarbane A (2004) La génétique à la rescousse de l'épidémie d'obésité. In *L'observatoire de la génétique*.
- Miller ER, Appel LJ & Risby TH (1998) Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: Results from a randomized clinical trial. *Circulation* **98**, 2390-2395.
- Mithen RF, Dekker M, Verkerk R, Rabot S & Johnson IT (2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 967-984.
- Moll M & Moll N (2000) Allergies et intoérances alimentaires. In *Précis des risques alimentaires*. Paris: Tec & Doc
- Mrkic V, Cocci E, Dalla Rosa M & Sacchetti G (2006) Effect of drying conditions on bioactive compounds and antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 1559-1566.
- Multon JL (2002) *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries alimentaires*. Paris: Tec & Doc
- Nève J (2002) Antioxydants alimentaires : vitamines, oligoéléments et non-nutriments. In *Aliments fonctionnels*, pp. 282-313 [T Doc, editor]. Paris: Lavoisier.
- Nicolas J & Billaud C (2006) Brunissement enzymatique-Prévention. In *Les polyphénols en agroalimentaire* [Tec&Doc, editor]. Paris: Lavoisier.
- Nicoli MC, Anese M & Parpinel M (1999) Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* **10**, 94-100.
- Nicoli MC, Anese M, Parpinel MT, Franceschi S & Lericci CR (1997) Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters* **114**, 71-74.

- Nieto S, Garrido A, Sanhueza J, Loyola LA, Morales G, Leighton F & Valenzuela A (1993) Flavonoids as stabilizers of fish oil: An alternative to synthetic antioxidants. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **70**, 773-778.
- Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K & Van Leeuwen PAM (2001) Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 418-425.
- Niki E (1991) Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *American Journal of Clinical Nutrition* **54**.
- Noroozi M, Angerson WJ & Lean MEJ (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition* **67**, 1210-1218.
- Novelli GP (1997) Role of free radicals in septic shock. *Journal of Physiology and Pharmacology* **48**, 517-527.
- Ohta A, Uehara M, Sakai K, Takasaki M, Adlercreutz H, Morohashi T & Ishimi Y (2002) A combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice. *Journal of Nutrition* **132**, 2048-2054.
- Ortolani C & Vighi G (1995) Definition of adverse reactions to food. *Allergy*, 8-13.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA & Deemer EK (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3122-3128.
- Pascal G (2002) Role of vegetable microconstituents in the health impact of foods. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique* **37**, 171-176.
- Pascal G, Mareschi JP, Contor L & Antoine JM (2006) Rediscovering the functional food properties: General scientific foundations. *Redécouverte des propriétés fonctionnelles de l'aliment: Fondements scientifiques généraux* **41**, 39-45.
- Pascal G, Mareschi JP, Contor L & Antoine JM (2008) Scientific demonstration of health-associated functions of food. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique* **43**, 31-36.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M & Brighenti F (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition* **133**, 2812-2819.
- Perez-Jimenez J, Arranz S, Tabernero M, Diaz- Rubio ME, Serrano J, Goni I & Saura-Calixto F (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils

- and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International* **41**, 274-285.
- Perez-Jimenez J & Saura-Calixto F (2006) Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International* **39**, 791-800.
- Perrut M (1999) Extraction par fluide supercritique. *Techniques de l'ingénieur*, Dossier J2770.
- Peterson J & Dwyer J (1998) Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* **18**, 1995-2018.
- Philpott M, Gould KS, Lim C & Ferguson LR (2004) In Situ and In Vitro Antioxidant Activity of Sweetpotato Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1511-1513.
- Pinelo M, Manzocco L, Nunez MJ & Nicoli MC (2004) Interaction among Phenols in Food Fortification: Negative Synergism on Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1177-1180.
- Prior RL, Wu X & Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4290-4302.
- Reay PF (1998) The effects of maturity on colour and concentration of pigments in the blush and shaded sides of 'Gala' apple fruit during cool storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73**, 841-845.
- Reboul E, Borel P, Mikail C, Abou L, Charbonnier M, Caris-Veyrat C, Goupy P, Portugal H, Lairon D & Amiot MJ (2005) Enrichment of tomato paste with 6% tomato peel increases lycopene and b-carotene bioavailability in men. *Journal of Nutrition* **135**, 790-794.
- Renard C, Hyardin A & Verdellet P (2008) Source, consommation et principaux facteurs de variation des phytonutriments bioactifs. In *Les phytonutriments bioactifs*.
- Renard CMGC, Dupont N & Guillermin P (2007) Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. *Phytochemistry* **68**, 1128-1138.
- Rice-Evans CA, Miller NJ & Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**, 933-956.
- Roberfroid M (2002a) *Aliments fonctionnels*, Tec&Doc ed. Paris: Lavoisier.
- Roberfroid MB (2000) Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition* **71**.

- Roberfroid MB (2002b) *Aliments fonctionnels*, 3 ed. Paris: Tec & Doc (Collection Sciences & Techniques agroalimentaire, 3ème édition).
- Rock CL, Lovalvo JL, Emenhiser C, Ruffin MT, Flatt SW & Schwartz SJ (1998) Bioavailability of b-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *Journal of Nutrition* **128**, 913-916.
- Ross JA, Kasum CM, Davies SM, Jacobs DR, Folsom AR & Potter JD (2002) Diet and risk of leukemia in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **11**, 777-781.
- Sahlin E, Savage GP & Lister CE (2004) Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis* **17**, 635-647.
- Sandberg AS (2002) Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition* **88**.
- Sanogo T & Reynal B (2006) Aspects législatifs. In *Les polyphénols en agroalimentaire*, pp. 341-359 [Tec&Doc, editor]. Paris: Lavoisier.
- Sarni-Manchado P & Cheynier V (2006) *Les polyphénols en agroalimentaires*, Tec & Doc ed: Lavoisier.
- Saura-Calixto F & Goni I (2006) Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry* **94**, 442-447.
- Scalbert A & Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* **130**.
- Scalzo J, Mezzetti B & Battino M (2005) Total antioxidant capacity evaluation: Critical steps for assaying berry antioxidant features. *BioFactors* **23**, 221-227.
- Schreiner M (2005) Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition* **44**, 85-94.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M & Heber D (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 1415-1422.
- Shao ZH, Vanden Hoek TL, Li CQ, Schumacker PT, Becker LB, Chan KC, Qin Y, Yin JJ & Yuan CS (2004) Synergistic effect of Scutellaria baicalensis and grape seed proanthocyanidins on scavenging reactive oxygen species in vitro. *American Journal of Chinese Medicine* **32**, 89-95.
- Shen L, Ji HF & Zhang HY (2007) How to understand the dichotomy of antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362**, 543-545.

- Singleton VL, Orthofer R & Lamuela-Raventos RM (1998) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**, 152-178.
- Solomons NW (2002) Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *European Journal of Clinical Nutrition* **56**.
- Spigno G, Tramelli L & De Faveri DM (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* **81**, 200-208.
- Stopar M, Bolcina U, Vanzo A & Vrhovsek U (2002) Lower crop load for cv. Jonagold apples (*Malus × domestica* Borkh.) Increases polyphenol content and fruit quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1643-1646.
- Stratil P, Klejdus B & Kuban V (2006) Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 607-616.
- Sunram-Lea SI, Foster JK, Durlach P & Perez C (2004) The influence of fat co-administration on the glucose memory facilitation effect. *Nutritional Neuroscience* **7**, 21-32.
- Toor RK & Savage GP (2006) Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chemistry* **94**, 90-97.
- Tourniaire F (2006) Stabilité, transport et métabolisme de microconstituants phénoliques dans le tube digestif, Aix-Marseille II.
- Trichopoulou A (2007) Mediterranean diet, traditional foods, and health: Evidence from the Greek EPIC cohort. *Food and Nutrition Bulletin* **28**, 236-240.
- Van der Sluis AA, Dekker M, De Jager A & Jongen WMF (2001) Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3606-3613.
- Veit-Kohler U, Krumbein A & Kosegarten H (1999) Effect of different water supply on plant growth and fruit quality of *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **162**, 583-588.
- Velasco P, Cartea ME, Gonzalez C, Vilar M & Ordas A (2007) Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 955-962.
- Veronica D, Xianzhong W, Adom KK & Liu RH (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3010-3014.

- Wang W, Weng X & Cheng D (2000) Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chemistry* **71**, 45-49.
- Wei QY, Zhou B, Cai YJ, Yang L & Liu ZL (2006) Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. *Food Chemistry* **96**, 90-95.
- West LG, Meyer KA, Balch BA, Rossi FJ, Schultz MR & Haas GW (2004) Glucoraphanin and 4-Hydroxyglucobrassicin Contents in Seeds of 59 Cultivars of Broccoli, Raab, Kohlrabi, Radish, Cauliflower, Brussels Sprouts, Kale, and Cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 916-926.
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J & Qian M (2002) Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1619-1624.
- Zelko IN, Mariani TJ & Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 337-349.
- Zhao B & Hall Iii CA (2008) Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chemistry* **108**, 511-518.
- Zhao X, Carey EE, Young JE, Wang W & Iwamoto T (2007) Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage on phenolic compounds in lettuce. *HortScience* **42**, 71-76.
- Zhu QY, Huang Y & Chen ZY (2000) Interaction between flavonoids and alpha-tocopherol in human low density lipoprotein. *Journal of Nutritional Biochemistry* **11**, 14-21.

PUBLICATIONS et COMMUNICATION

Ce travail de recherche a fait l'objet des publications suivantes :

Communication orale :

Hyardin A, Méjean L, « Les antioxydants dans une carte industrielle » Congrès Fonctionnalité des aliments AGRIA , Nancy, Juillet 2007

Publications

Hyardin A, Ghoul M, Méjean L (2008) Comparative study of the power antioxidant of complex dishes and behaviour of complex formulation. (Soumis dans *Journal of Food Science*)

Renard C, Hyardin A, Verdelle P (2008). Source, consommation et facteurs de variabilité des phytonutriments bioactifs. *Les phytonutriments bioactifs. (À paraître sous forme de chapitre d'un ouvrage)*

Demande de Brevet

Hyardin A, Mejean L, Quignon M-D & Verdelle P (2008) Détermination des propriétés antioxydantes de préparations culinaires. France. Numéro de dépôt : 08/00433

ANNEXE

Liste des Recettes : Tartes, Plats individuels vendus au rayon frais, Plats surgelés

Tarte Trattatoria tomates mozzarella	Frais	Pâte feuilletée 32% : farine de blé, margarine végétale (huiles de palme et colza en l'état et hydrogénées, eau, sel, émulsifiant : E 471, correcteur d'acidité : acide citrique et E 331), eau, fibre de chicorée, sel, agent de traitement de la farine : L cystéine. Garniture : 68% : eau, tomates 19%, mozzarella 10,5%, champignons, jambon 8% (jambon de porc, couenne, eau, sel, gélatine, stabilisants : carraghénanes – E 450, lactose, sirop de glucose, dextrose, arôme naturel, conservateurs : E 316 – E 250), œufs frais, crème fraîche, blanc d'œuf, amidon transformé, échalotes, lait écrémé en poudre, huile d'olive 1%, basilic, sel, origan, extrait naturel de poivre.
Tarte Chèvre épinard	Frais	Pâte feuilletée 39% : farine de blé, margarine végétale (huiles de palme et colza en l'état et hydrogénées, émulsifiant : E 471, correcteur d'acidité : acide citrique, colorant : bêta carotène, arôme), eau, sel, agent de traitement de la farine : L cystéine. Garniture 61 % : épinards 25%, fromage blanc, crème fraîche légère, fromage de chèvre 11.5%, œufs frais, lait écrémé en poudre, épaississant : E 1422, pulpe d'ail, sel, huile de tournesol, arômes, cumin, curry. <i>(pourcentages exprimés sur la garniture)</i>
Tarte tomates provençales	Frais	Pâte feuilletée 39% : farine de blé, margarine végétale (huiles de palme et colza en l'état et hydrogénées, eau, sel, émulsifiant : E 471, correcteur d'acidité : acide citrique et E 331), eau, fibre de chicorée, sel, agent de traitement de la farine : L cystéine. Garniture 61 % : tomates 21%, eau, fromage blanc, courgettes, oignons, œufs frais, 4,5%, blanc d'œuf, crème fraîche, emmental, chapelure, lait écrémé en poudre, ail, amidon transformé, concentré de tomates, huile d'olive, basilic 0,9%, persil, fibre de chicorée, échalotes, vinaigre de Xérès, sel, extraits naturels de poivre et de muscade. <i>(pourcentages exprimés sur la garniture)</i>
Tarte Poireaux	Frais	Pâte feuilletée 39% : farine de blé, margarine végétale (huiles de palme et colza en l'état et hydrogénées, eau, sel, émulsifiant : E 471, correcteur d'acidité : acide citrique et E 331), eau, fibre de chicorée, sel, agent de traitement de la farine : L cystéine. Garniture 61 % : eau, poireaux 29%, épinards, œufs frais, blanc d'œuf, crème fraîche, emmental 4%, échalotes, amidon transformé, jaune d'œuf en poudre, fibre de chicorée, sel, huile de tournesol, extraits naturels de poivre et de muscade <i>(pourcentages exprimés sur la garniture)</i>
Tarte saumon oseille	Frais	Pâte feuilletée 39% : farine de blé, margarine végétale (huiles de palme et colza en l'état et hydrogénées, eau, sel, émulsifiant : E 471, correcteur d'acidité : acide citrique et E 331), eau, fibre de chicorée, sel, agent de traitement de la farine : L cystéine. Garniture 61% : eau, saumon sauvage du Pacifique 31,5%, œufs frais, crème fraîche 7%, vin blanc, oseille 3%, épinards, amidon transformé, lait écrémé en poudre, crème – protéines de lait, ciboulette, arôme naturel, sel, échalotes, jus de citron, extraits naturels de poivre et de muscade. <i>(pourcentages exprimés sur la garniture)</i>
Tarte Noix de St Jacques	Frais	Pâte feuilletée 39% : farine de blé, margarine végétale (huiles de palme et de colza en l'état et hydrogénées, eau, sel, émulsifiants : E 471, correcteur d'acidité : acide citrique et E 331), eau, fibre de chicorée, sel, agent de traitement de la farine : L cystéine. Garniture 61 % : eau, noix de Saint Jacques (<i>Zygochlamys patagonica</i> d'Argentine) 18%, carottes, crème fraîche, tomates, céleri, blanc d'œuf, œufs frais, emmental, lait écrémé en poudre, vermouth (Noilly Prat) 2,5%, amidon transformé, échalotes, persil, huile de tournesol, sel, extraits naturels de poivre et de muscade, arôme naturel (crustacés) <i>(pourcentages exprimés sur la garniture)</i>

Feuilleté Crevettes	Frais	Pâte feuilletée 52% : farine de blé, margarine (huiles végétales en l'état et hydrogénées : palme et colza, émulsifiant : E 471, correcteur d'acidité : acide citrique, colorant : bêta carotène, arôme), eau, sel, agent de traitement de la farine : L cystéine. Garniture 47 % : eau, crevettes (sel, antioxygène : E 331)16.5%, crème fraîche légère, poisson 11.5%, carottes, vin blanc, céleri, œufs frais, noix de saint Jacques 4 % (Zygochlamys patagonica d'Argentine), poireaux, pulpe d'échalotes, ciboulette, épaississant : E 1422, huile de tournesol, arômes.
Poisson à la Grecque :	Frais	Aubergines 23,5%, pommes de terre 20%, poisson blanc19%, tomates 8%, eau, oignons, fêta de brebis 4%, artichauts, concentré de tomates, olives noires 1,5%, ail, raisins secs, coriandre, amidon transformé, huile d'olive, sel, sucre, poivron et tomates déshydratés, épices (curcuma et paprika) et aromates, chapelure de blé, lactose.
Aubergines cuisinées à la provençale	Frais	Tomates 27%, semoule de blé dur 14.5%, eau, aubergines pré frites (huile de tournesol) 7%, aubergines 7%, poivrons 6.5%, oignons, courgettes 4%, carottes 3%, raisins secs, concentré de tomates, huile d'olive, pulpe d'ail, sel, basilic, sucre, amidon transformé, épaississant : gomme Xanthane, arômes (lait, céleri) thym, poivre.
Courgettes à l'indienne :	Frais	Courgettes 34%, riz basmati cuit 19.5%, eau, crème fraîche, carottes, poivrons, concentré de tomates, petits pois, riz sauvage cuit 1.3%, zestes de citron 1%, curry (moutarde, blé, céleri), arômes (lait), ciboulette, huile d'olive, coriandre, sel, ail, cumin, amidon transformé, épaississant : gomme Xanthane
Aiguillettes de poulet sauce moutarde	Frais	Riz blanc cuit 30%, aiguillettes de poulet cuites 25,5% (poulet, sirop de glucose, dextrose, amidon de riz, sel), eau, carottes 8%, crème fraîche, échalotes, moutarde de Dijon 3%, (eau, graines de moutarde, vinaigre, sel, conservateur : E 224, acidifiant : acide citrique), petits pois 3%, huile de tournesol, vin blanc, riz sauvage cuit 1%, vinaigre, sel, moutarde à l'ancienne 0,3% (vinaigre, graines de moutarde, eau, sel, vin blanc, épices, acidifiant : acide citrique), arômes naturels (œuf, blé céleri), amidon transformé, colorant : caramel, poivre, extrait naturel de Cayenne, curcuma.
Caviar de tomates confites au basilic	Frais	Riz basmati cuit 27%, tomates 25%, brocolis 7.5%, carottes 6.5%, tomates confites 6.5% (tomates, huile de colza, aromates), eau, pois chiches 4.5%, oignons, poivrons 3%, concentré de tomates, olives noires, sucre, grana padano, huile d'olive, ail, basilic, sel, estragon, arômes (lait, blé, céleri), amidon transformé, dextrose, épaississant : gomme Xanthane colorants : E 102 – E 124, poivre.
Poisson à l'andalouse	Frais	Riz blanc cuit 34%, courgettes 23,5%, poisson blanc 19%, poivrons 8,5%, petits pois, oignons pré frites (huile de tournesol) huile d'olive, concentré de tomates, arôme naturel (crustacés, lait, céleri), ail, sel, maltodextrine, épices (curcuma, safran), aromates, amidon transformé, poivrons et tomates déshydratés, blé, poivre.
Hachis parmentier	Frais	Purée 65% (eau, crème fraîche légère, flocons de pomme de terre, œufs frais, lait écrémé en poudre, sel, arômes, épaississant : gomme Xanthane), eau, viande de bœuf crue 8,5%, viande de bœuf cuisinée 8,5% (bœuf, fécule de pomme de terre, arôme, sel), oignons 2,5%, carottes, fond de volaille aromatisé (arômes naturels, colorant : caramel E 150b, dextrose, sel, eau, extrait de poulet, huile de tournesol, blé, orge), amidon transformé, ciboulette, ail, sel, épaississant : gomme Xanthane, extrait naturel de poivre.
Poisson à l'italienne	Frais	Pâtes précuites (fettuccini) 48% (semoule de blé dur, eau, œufs , huile d'olive, sel), poisson blanc 19%, tomates 12%, eau, courgettes, échalotes, tomates confites 1,5% (tomates, huile de colza, sel, aromates), carottes, huile d'olive, parmesan 1%, ail, concentré de tomates, olives noires, amidon transformé, sel, basilic 0,3%, poivron déshydraté, maltodextrine, épices et aromates, extrait de poisson, huile de palme, extrait de vin blanc, sucre, épaississants : gomme Xanthane, poivre.

Lasagnes bolognaise	Frais	Eau, lasagnes précuites 20% (semoule de blé dur, eau), viande de bœuf cuisinée 11% (viande de bœuf, fécule de pomme de terre, arôme, sel), concentré de tomates, oignons 3.5%, carottes, crème fraîche légère, amidon transformé, huile de tournesol, basilic 0,8%, farine de blé, céleri, arômes, sucre, lactose et protéines de lait – crème, sel, ail, jaune d’œuf en poudre, extraits naturels : muscade –poivre – girofle – thym, épaississant : gomme Xanthane.
Gratin Dauphinois	Frais	Pommes de terre 44%, eau, crème fraîche, jambon 7,5% (jambon de porc, couenne, eau, sel, gélatine, stabilisants : carraghénanes – E 450, lactose, sirop de glucose, dextrose, arômes, conservateurs : E 301 - E 250), emmental 3%, amidon transformé, lait écrémé en poudre, gélatine de porc, sel, jaune d’œuf en poudre, épaississant : gomme Xanthane, extraits naturels de poivre et de muscade.
Quenelles de brochet	Frais	quenelles de brochet 26.5% (œufs frais, eau, matières grasses végétales, brochet 13%, farine de blé , sel), riz blanc cuit 21%, eau, tomates 12.5%, purée de carottes 7%, courgettes 4.5%, carottes 4.5%, échalotes, huile de tournesol, concentré de tomates, huile d’olive, arômes (lait, céleri), amidon transformé, vinaigre de Xérès 0.3%, gélatine de porc, ail, sucre, fond de volaille aromatisé (amidon de tapioca, arômes, sel, viande et graisse de poule, oignons, huile de palme), poivre.
Cabillaud sauce citron	Frais	Cabillaud 31%, riz basmati cuit 29,5%, carottes 12%, eau, crème fraîche, huile de tournesol, brocolis 2%, échalotes, jus et zeste de citron 1,3%, sel, amidon transformé, sucre, arômes naturels (crustacés, céleri), épaississants : farine de graines de caroube et gomme Xanthane, glucose, curcuma.
Poêlée savoyarde :	Surg	Pommes de terre pré frites 44% (pommes de terre, huile végétale), eau, oignons, fromage à raclette 8% (colorant : caramel E 160b, conservateur : E 235), fromage blanc, lardons fumés 5% (poitrine de porc, sel, dextrose, acidifiant : acide citrique, conservateurs : E 316- E 252 - E 250), mozzarella, crème fraîche légère, amidon transformé, arômes, sel, épaississant : gomme Xanthane, extrait naturel de poivre.
Paella :	Surg	Riz jaune précuit 46,5% (riz, curcuma), eau, viande de poulet cuite 9,5% (filet de poulet, eau, dextrose, sel, stabilisants : E 450 et E 451, arôme, poivre), crevettes entières (6%), poisson blanc (6%), tomates, petits pois, oignons, poivrons, chorizo 1,5% (viande et gras de porc, sel, huile végétale, épices, colorant : extrait de paprika, sirop de glucose, sucre, antioxygènes : acide ascorbique - acide citrique), concentré de tomates, arômes, sel, paprika, extrait de crevettes, curcuma, colorant : curcumine.
Gratin de thon pomme de terre	Surg	Pommes de terre pré frites 38% (pommes de terre, huile de palme et de tournesol), tomates 17%, thon 10% (huile de tournesol), poivrons 7,5%, édám, concentré de tomates 6%, eau, oignons, huile d’olive, basilic, amidon transformé, ail, sucre, gélifiant : pectine, sel, dextrose, extraits naturels de poivre et de thym
Gratin à la savoyarde	Surg	Pommes de terre pré frites 39,5% (pommes de terre, huiles de palme et de tournesol), eau, crème fraîche 8%, oignons frits 8%, jambon 5,5% (jambon de porc et couenne, eau, sel, gélatine, stabilisants : carraghénanes – E 450, lactose, sirop de glucose, dextrose, arômes naturels, conservateurs : E 316 – E 250), emmental 4%, reblochon 2,5%, beurre, amidon transformé, arômes naturels, lactose et protéines de lait – crème, extrait de vin blanc, jaune d’œuf en poudre, gélifiant : pectine, sel, épaississant : gomme Xanthane, poivre, muscade.
Poulet Basquaise	Surg	Riz blanc précuit 42,5%, viande de poulet cuite 13% (cuisse de poulet, sel, dextrose), eau, tomates 9%, poivrons 8,5%, oignons, concentré de tomates, vinaigre de Xérès, huile de tournesol, ail, amidon transformé, sel, basilic, épaississant : gomme Xanthane, extrait naturel de Cayenne.
Gratin de pâtes au bœuf	Surg	Pâtes précuites (mezze penne) 28% (semoule de blé dur, eau, œufs), courgettes 20,5%, eau, viande de bœuf cuite 10%, concentré de tomates 7,5%, édám, oignons, tomates 2%, huile d’olive, amidon transformé, jus concentré de tomates, sirop de sucre, huile de tournesol, basilic, ail, gélifiant : pectine, sel, sucre, épaississant : gomme Xanthane, extrait naturel de poivre.

Fusillini e scaloppine alla milanese	Surg	Pâtes précuites (fusilli) 42,5% (semoule de blé dur, eau), escalope de dinde panée 15,5% [farce 71% (viande de dinde 82%, eau, fécule, fibre de blé, sel, arômes), enrobage 26% (chapelure, eau, farine et amidon de blé, levure, sel, épices), huile végétale 3%], eau, concentré de tomates 11%, tomates 7%, oignons frits (huile de tournesol), échalotes, sel, basilic, jus de citron, amidon transformé, ail, paprika, sucre, origan
Colin Sauce Normande	Surg	Colin d'Alaska (56%), eau, crème fraîche légère, champignons (8%), beurre, vin blanc, vermouth (Noilly Prat), pulpe d'échalote (blé), jus de citron, épaississants : E 1422 et gomme Xanthane, farine de blé, protéines de lait – crème, arômes (poisson, crustacés, lait, blé), lait écrémé en poudre, persil, ciboulette (0.2%), sel, colorant : caramel E 150c.
Conchiglie al tonno e basilico	Surg	Pâtes précuites (conchiglie) 46% (semoule de blé dur, eau), concentré de tomates, thon 11,5%, (huile de tournesol), oignons, tomates, huile d'olive, ail, sucre, basilic, sel, vinaigre de Xérès, olives noires 0,5%, amidon transformé, origan, extrait naturel de poivre, caramel aromatique.
Farfallini crema al gorgonzola	Surg	Pâte précuites 50% (semoule de blé dur, eau, œufs), eau, crème fraîche légère 13%, champignons, jambon 9% (jambon de porc, eau, lactose, sirop de glucose, dextrose, sucre, sel, gélatine, stabilisants : carraghénanes – E 450, conservateurs : E 301 – E 250 – E 252, arôme naturels), gorgonzola 1,5%, amidon transformé, basilic, sel, extrait de levure, huile de colza - protéines de lait – crème, extraits naturels de poivre et de muscade.
Rigatoni a la bolognese della trattoria	Surg	Pâtes précuites (rigatoni) 48% (semoule de blé dur, eau), viande de bœuf cuite 14%, concentré de tomates 11,5%, tomates 10%, eau, fromage à pâte dure 2, 5%, oignons, huile d'olive, amidon transformé, basilic, sel, échalotes, sucre, ail, poivre.

RESUME

RESUME

Consommateurs, chercheurs et industriels cherchent de plus en plus à associer à la valeur nutritionnelle des aliments, un effet bénéfique pour la santé. Les aliments caractérisés par des pouvoirs antioxydants élevés semblent correspondre à cette demande. En effet, plusieurs travaux mentionnent les bénéfices santé de ces aliments. Pour répondre à cette demande les industriels mettent en avant ce critère. La fonctionnalité alimentaire, aux bénéfices prometteurs pour la santé publique, reste un concept néanmoins complexe dans la pratique. Ce travail met l'accent sur le fait que les propriétés fonctionnelles d'un aliment ne sont pas directement liées à la composition en ingrédients. L'évaluation du pouvoir antioxydant d'un aliment est dans la plupart des cas réalisée à partir des valeurs des différents ingrédients avant formulation et mise en œuvre des procédés. Pourtant, plusieurs phénomènes sont susceptibles de modifier le pouvoir antioxydant lors de la durée de vie d'un produit alimentaire. D'un point de vue industriel, il est nécessaire de développer une méthode de prédiction de cette activité. Les objectifs de ce travail étaient d'adapter une méthode reproductible et facile à réaliser de quantification du pouvoir antioxydant sur des aliments complexes et de comparer cet index d'un ensemble de produits contenant une large gamme de matières premières. Enfin, a été discuté l'intérêt que représente, dans le domaine des propriétés anti oxydantes, la quantification de l'index créé. Au moment où les industriels vont être amenés à proposer des allégations liées à l'effet bénéfique de l'aliment choisi parmi un échantillon de plus en plus ample.

Mots clés : Fonctionnalité alimentaire / Antioxydants / Polyphénols/ Carte industrielle/
Aliment complexe

ABSTRACT

Consumers, researchers and industrialists try more and more to associate with the nutritional value of food, a beneficial effect for the health. Food characterized by high antioxidant powers seems to correspond to this demand. From an industrial point of view, it is necessary to develop methods of predicting this antioxidant capacity. The objectives of this work were to adapt a method reproducible and easy to realize of quantification of the antioxidant power on complex food and to compare this index of a set of products containing a wide range of raw materials. Until now, it has been considered that the use of raw materials characterized by a high antioxidant capacity also leads to a preparation with a high antioxidant activity. We evaluated many of the factors affecting the antioxidant activity of convenience foods (phenol content, effects of formulation, culinary reheating, and preservation) and to provide data on convenience foods consumed by the French population. The total antioxidant capacity of the ethanolic extracts was evaluated by the method of the equivalent Trolox (TEAC) using the radical cation ABTS^{•+}. The concentration of the total phenolic compounds of the same extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method. The results show that the food matrix is an important factor for the modulation of activities of antioxidants. A standardised testing protocol for evaluating antioxidative effects is necessary. Then, we discussed the interest of an index, as the industrialists are going to be brought to claim to the beneficial effect of the food chosen among a more and more ample sample.

Keywords: Food functionality, antioxidant activity, complex food, total phenolic content, ABTS^{•+}, Antioxidant-rich foods, preservation, formulation.