



HAL
open science

Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques

Sabiha Achat

► **To cite this version:**

Sabiha Achat. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Autre. Université d'Avignon; Université Abderrahmane Mira - Bejaïa (Bejaïa, Algérie), 2013. Français. NNT : 2013AVIG0248 . tel-00978529

HAL Id: tel-00978529

<https://theses.hal.science/tel-00978529>

Submitted on 14 Apr 2014

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.

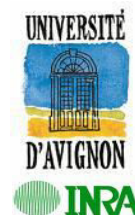
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE A. MIRA-BEJAIA
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département des Sciences Alimentaires

UNIVERSITE d'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE
Ecole Doctorale 536 – Avignon



THÈSE EN CO-TUTELLE

Laboratoires d'accueil :

- 1- Laboratoire de Biomathématique, Biochimie, Biophysique et de Scientométrie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Sciences Alimentaires
- 2- UMR 408 UAPV-INRA, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Avignon

Présentée à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie par :

ACHAT SABIHA

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES

Filière : **Biologie**
Option : **Sciences Alimentaires**

Polyphénols de l'alimentation: Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques

Soutenue le : **24/11/2013**

Devant la commission d'examen :

Président : **MAKHLOUFI Laid** : Professeur à l'université A. Mira de Béjaïa

Directeurs : **CHIBANE Mohamed** : Professeur à l'université de Bouira

DANGLES Olivier : Professeur à l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Examineurs : **CHEYNIER Véronique** : Directrice de recherche à l'INRA de Montpellier

TROUILLAS Patrick : Professeur à l'université de Limoge

MADANI Khodir : Professeur à l'université A. Mira de Béjaïa

Invité : **CHEMAT Farid** : Professeur à l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Dédicaces

« Toute certitude est par essence contradictoire avec la philosophie de la recherche »

« Le chercheur doit être libre de tenter des expériences audacieuses, de soutenir des théories révolutionnaires, voire paradoxales. Il doit disposer du droit à l'erreur »

Pierre Joliot, *La Recherche Passionnément*

A mes
très chers parents,
Nouna ma sœur, mes
frères : Karim, Nabil
et leurs familles,
Billal et Mayas.

Pour votre soutien permanent pendant mes longues années d'études

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu, le tout puissant de m'avoir accordé santé, courage et foi.

L'aboutissement de ce travail de thèse est évidemment lié à des moments durant lesquels diverses contributions m'ont été bénéfiques. Avant d'entrer en matière, je ne saurai donc oublier les autres acteurs et auxiliaires de la présente œuvre.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, notamment : Pr MAKHLOUFI Laid (Président), Pr TROUILLAS Patrick (Examineur), Dr CHEYNIER Véronique (Examinatrice) et Pr MADANI Khodir (Examineur). Je vous remercie d'avoir enrichi cette étude par vos expertises et vos expériences respectives.

Je remercie également Pr DANGLES Olivier, Pr CHIBANE Mohamed d'avoir dirigé ma thèse au cours de toutes ces années avec beaucoup de patience. Votre rigueur scientifique, vos conseils et vos encouragements m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance au Pr CHEMAT Farid, pour l'accueil et la disponibilité dont vous avez fait preuve lors de mes différents stages dans votre équipe «Green» et pour le suivi de la partie extraction de ma thèse.

Au Pr MADANI Khodir et au Dr RAKOTOMANOMANA Njara, je vous exprime mes plus sincères remerciements pour votre présence, votre aide, votre gentillesse au quotidien, tous vos encouragements et votre soutien dans les moments difficiles, merci pour votre amitié.

A tous les membres de l'équipe « Chimie des Antioxydants » et Green de l'université d'Avignon à savoir : TOMAO Valérie, ELMAATAOUI Mohamed, LOONIS Michèle, BITAR Shiraz, MORA-SOUMILLE Nathalie, PETITCOLAS Emmanuel, VIAN Maryline et RUIZ Karine. Je vous remercie pour tous les bons moments passés au laboratoire, pour l'entraide et l'écoute constante au sein de l'équipe, sans oublier DEJOYE Céline, PINGRET Daniella. ALLAF Tamara et la microbiologiste ABBES Amina pour votre sympathie.

Un grand merci pour toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, essentiellement SMAIL Lila et ABID Massinissa : merci infiniment. Je ne saurais oublier de te remercier SONIA, chère et unique sœur, pour ton soutien, ton aide, ta présence ainsi que ton affection.

Un très grand merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études et la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée. Merci à toute ma famille et mes amis pour leur présence à mes côtés, sans oublier toute l'équipe du laboratoire 3BS de l'université de Bejaia (Algérie).

Communications et publication

Une partie de ce travail a été présentée sous forme de communications dans différents congrès et a fait l'objet d'une publication internationale.

Publication

Sabiha Achat., Valérie Tomao., Khodir Madani., Mohamed Chibane., Mohamed Elmaataoui., Olivier Dangles., Farid Chemat. (2012). Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*. **19**: 777-786.

Communications

- 1- **Sabiha Achat.**, Valérie Tomao, Khodir Madani, Mohamed Chibane, Olivier Dangles, Farid Chemat « Ultrasound assisted maceration: an original procedure for direct enrichment of olive oil » ; Communication affichée : Symposium international "Fruit & Vegetable Processing". 18-21 Avril 2011. Avignon. France ;
- 2- **Sabiha Achat.** Participation à la Formation de l'école d'été dans de nouvelles technologies : 1st ES and AMPERE Summer School on Ultrasound and Microwave technologies. 06-10 Juin 2011. Avignon France ;
- 3- **Sabiha Achat.**, Valérie Tomao, Khodir Madani, Mohamed Chibane, Olivier Dangles, Farid Chemat « Enrichement of olive oil in natural antioxidant with olive leaves by Ultrasound assisted maceration » ; Communication orale: Séminaire d'échange international "aux interfaces du développement durable". 21-22 Juin 2011. Bejaia. Algérie ;
- 4- **Sabiha Achat.**, Njara Rakotomanomana, Valérie Tomao, Khodir Madani, Mohamed Chibane, Olivier Dangles, Farid Chemat. "Green enrichment of olive oil in natural antioxidant of olive leaves by ultrasound-assisted maceration and *in vitro* antioxidant activity". International Congress on Green Extraction of Natural Products - GENP Avignon, 16 – 17 Avril , 2013. France ;
- 5- **Sabiha Achat.**, Njara Rakotomanomana, Valérie Tomao, Khodir Madani, Mohamed Chibane, Olivier Dangles, Farid Chemat. Communication orale World Forum for Nutrition Research Conference. 20-21 Mai 2013. Espagne.

Liste des abréviations

Al	aluminium
ARP	<i>Antiradical Power</i>
AND	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AGPI	acide gras polyinsaturé
ANOVA	analyse de variance
BHA	buthylhydroxyanisol
BHT	buthylhydroxytoluène
β-CD	β-cyclodextrine
CLHP	chromatographie liquide haute performante
CLUP	chromatographie liquide ultra-haute performante
COX	cycloxygénase
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
Cu	cuivre
DPPH•	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EAU	extraction assistée aux ultrasons
EC	extraction conventionnelle
EDL	énergie de la dissociation de liaison
ERO	espèces réactives oxygénées
Fe	fer
FPT	fraction polaire totale
HOV	huile d'olive vierge
HOV-CV	huile d'olive vierge-méthode conventionnelle
HOC-US	huile d'olive vierge-assistée aux ultrasons
IFN-α	<i>Interferon alpha</i>
IL	<i>Interleukin</i>
iNOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
L	ligand
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LOX	lipoxygénase
LPS	lipopolysaccharide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
P	niveau de probabilité (statistiques)
RPE	résonance paramagnétique électronique
RMN	résonance magnétique nucléaire
SAB	sérum albumine bovine
SAH	sérum albumine humaine
SM	spectrométrie de masse
SOD	superoxyde dismutase
TB	bleu de toluidine
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TCA	acide trichloroacétique
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
UA	unité arbitraire
UV	ultraviolet
XO	xanthine oxydase

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Etude bibliographique : Polyphénols, structures et propriétés		
01	Structure du noyau phénol	05
02	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques	06
03	Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques	07
04	Squelette de base des flavonoïdes	07
05	Structure chimique des flavanones	08
06	Structures chimiques de flavonols	09
07	Structures chimiques de certains flavan-3-ols	09
08	Structure chimique de certains anthocyanidines courantes	10
09	Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b)	10
10	Structures de l'oleuropéine	10
11	Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidol) et (b) d'un tanin gallique (1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose)	11
12	Mécanisme de formation du fer hypervalent dans les protéines héminique	13
13	Les processus de formation des ERO	13
14	Mécanisme de production du superoxyde dans la mitochondrie	14
15	Oxydation enzymatique (LOX) et non enzymatique des AGPI	15
16	Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène	16
17	Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydants	17
18	Schéma général de biodisponibilité des polyphénols	19
19	Piégeage des ERO (X^{\bullet}) par un noyau catéchol	22
20	Oligomérisation oxydative des catéchols	24
21	Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes	25
22	Mécanisme de formation d'ERO par l'acide gallique (métabolite du propylgallate)	27
Partie1, Chapitre I: Ultrasons		
I.1	Domaines d'utilisation des Ultrasons en fonction de la fréquence	43
I.2	Propagation de l'onde sonore dans un milieu	44
I.3	Cycles de compression et de raréfaction induits par une onde sonore	44

I.4	Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide (a) et d'une cellule végétale (b)	47
I.5	Schéma de dispositifs à ultrasons : bac et sonde	48
I.6	Réacteurs de laboratoire d'extraction assistée par ultrasons: (A) batch (Reus-www.etsreus.com) et (B) continu	49
I.7	Equipements industriels d'extraction par ultrasons à l'échelle pilote (cuve de 50 L), (A) en batch (Reus - www.etsreus.com) et (B) en continu	50
I.8	Dispositifs d'extraction par ultrasons (2 X 500 L) à l'échelle industrielle pour les produits liquides et solides permettant l'extraction semi continue	50
I.9	Avantage de la filtration assistée par ultrasons	52
I.10	Mécanisme de dommage cellulaire par ultrasons	53
Partie 1, Chapitre II : Enrichissement de l'huile d'olive		
II.1	Arbre d'olivier (<i>Olea europaea L</i>) (A) et feuilles et fruits d'olivier (B)	64
II.2	Optimisation du rapport feuille d' <i>Olea europea L</i> / huile d'olive	65
II.3	Bac à ultrason de laboratoire de 3L (R.E.U.S)	66
II.4	Procédé d'extraction des composés phénoliques des huiles végétales	67
II.5	Représentation graphique de la distribution virtuelle des points expérimentaux intervenant dans le PCC	70
II.6	Etapas du test de DPPH	75
II.7	Image et représentation schématique d'une sonde <i>Testo</i>	76
II.8	Représentation 3D du système de couleur CIELAB	77
II.9	Photographies : (a) microscope électronique à balayage, (b) microtome à rétraction et (c) coupes transversales sériées	79
II.10	Effet de la charge sur le taux de polyphénols totaux	80
II.11	Diagramme de Pareto pour la concentration d'oleuropéine	83
II.12	Paramètres optimisés par la méthodologie de surfaces de réponses pour l'oleuropéine	85
II.13	Comparaison cinétique de l'enrichissement de l'HOV assisté par ultrasons (VOO-US) et la méthode conventionnelle (VOO-CV)	86
II.14	Chromatogrammes HPLC-DAD à 280 nm des extraits méthanoïques de l'HOV (A), de l'HOV-US (B) et de l'HOV-CV (C)	87
II.15	Photographies de microscopie électronique à balayage des structures des feuilles d'oliviers après différents traitements : (A) Contrôle, (B) Macération et (C) Sonication	89
II.16	Activité scavenger du DPPH de l'HOV avant et après enrichissement	90
II.17	Activité scavenger du DPPH en fonction de la concentration des huiles.	91
II.18	La fraction polaire totale au cours des sessions de friture (180°C), des huiles étudiées.	93
II.19	Equipement ultrasonique (30 L) à l'échelle pilote, utilisé pour l'enrichissement assisté par ultrasons de l'HOV	96

Partie 2, Chapitre I : Etat des connaissances		
I.1	Sérum albumine humaine	106
I.2	Représentations de la structure chimique des cyclodextrines naturelles	110
I.3	Représentations schématiques de complexes d'inclusion de toechiométries différentes	112
Partie 2, Chapitre II : Activité antioxydante des polyphénols		
II.1	Fréquence d'utilisation des méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante	118
II.2	Structure du radical stable DPPH•	119
II.3	Réduction du radical DPPH•	119
II.4	Solubilisation du radical DPPH• en tampon acétate (pH 5) en présence du détergent Brij 35 (20 mM)	124
II.5	Spectre d'absorption du DPPH• (1.5 mM) dans le tampon acétate (0.1 M, pH 5) en présence du Brij 35 (20 mM)	125
II.6	Tracé de l'absorbance du radical DPPH à 529 nm en fonction du temps après addition de rutine	128
II.7	Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes	129
II.8	Réduction du radical ABTS ^{•+} par la quercétine, la rutine et la catéchine	129
II.9	Mécanisme général d'oxydation de la quercétine	131
II.10	Mécanisme général d'oxydation de la catéchine	132
II.11	Proposition de structures pour les produits d'oxydation de la rutine (II–IV)	133
II.12	Positionnement du DPPH• dans une micelle de Brij 35	135
II.13	Positionnement de la rutine dans une micelle de Brij 35	136
Partie 2, Chapitre III : Interaction des polyphénols avec des ions métalliques		
III.1	Géométrie de coordination des ions métalliques dans les complexes (a), coordination octaédrique possible des complexes polyphénols-fer en général (b)	150
III.2	Coordination de Fe ²⁺ avec un polyphénol et transfert d'électron en présence d'oxygène générant le complexe Fe ³⁺ -polyphénols (A), Coordination de Fe ³⁺ avec un polyphénol, réduction de l'ion et formation de la semiquinone avec réduction de Fe ³⁺ (B). R= H, OH (B)	152
III.3	Structures des complexes fer-quercétine (A) et fer-rutine (B) dans MeOH	154
III.4	produits de la réaction d'oxydation des flavonols induite par les ions du fer et du cuivre.	156
III.5	La réduction des ions Fe ³⁺ et Cu ²⁺ par un phénol permet de produire les ions de basse valence nécessaires à la réaction de Fenton, conduisant ainsi à des lésions de l'ADN	157
III.6	Structure de la ferrozine	164

III.7	a) Structure chimique de la rutine. b) Sites de complexation métallique de la rutine	166
III.8	Complexation de la rutine par Al ^{III} dans tampon acétate (0.1 M, pH 5, 25°C). Concentration de rutine = 50 µM	168
III.9	Tracé des variations de A (382 nm) après ajout de Al ³⁺ (1, 1.5, 2, 3 et 5 équiv.). Concentration de rutine = 50 µM, tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C	169
III.10	Tracé des variations de ΔA (382 nm) en fonction de la concentration totale de métal. Concentration de rutine = 50 µM, tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C	170
III.11	Tracé de la constante cinétique apparente de formation du complexe k_{obs} en fonction de M_t	171
III.12	Complexation de la rutine (50µM) par 5 équiv. d'Al ^{III} dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C)	171
III.13	Variation de l'absorbance finale à 400 nm en fonction de la concentration totale de Fe ^{III} . Concentration de rutine = 50 µM (tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C)	172
III.14	Suivi cinétique de la complexation rutine - Fe ^{III} (tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C)	172
III.15	Suivi cinétique à plusieurs longueurs d'onde de la complexation de la rutine (50 µM) par 1 equiv. de Fe ³⁺ (tampon acétate pH=5, 25°C)	173
III.16	Distribution des espèces lors de la complexation de la rutine (50 µM) par 1 equiv. de Fe ³⁺ (tampon acétate, pH, 25°C).	174
III.17	Dosage Fe ²⁺ (100µm) en absence ou en présence de rutine (1eq), tampon acétate (pH=5 et T=25°C)	175
III.18	Spectres UV-vis de solutions Rutine (50 µM) + 1 equiv. Fe ³⁺ à différents pH (25°C)	176
III.19	Interaction de la rutine (50 µM) avec Fe ³⁺ (1 equiv.) en présence et en absence de la protéine SAB (3 équiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C)	177
III.20	Interaction de la rutine (50 µM) avec Fe ²⁺ (1 equiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C) après 3h	177
III.21	Suivi cinétique de l'interaction de la rutine (50 µM) avec Fe ²⁺ (1 equiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). pH (25°C).	178
III.22	Dosage de Fe ²⁺ (100 µM) en absence ou en présence de rutine (1 équiv.), tampon acétate (pH 5, 25°C)	179
III.23	Structure chimique de l'acide chlorogénique	180
III.24	Complexation de l'acide chlorogénique (50 µM) par 5 équiv. de Al ^{III} dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C)	180
III.25	Tracé des variations de A(350 nm) après ajout de Al ³⁺ (2, 3, 4, 5 et 10 équiv.). Concentration d'acide chlorogénique = 50 µM, tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C	181

III.26	Tracé des variations de $\Delta A(350 \text{ nm})$ en fonction de la concentration totale de métal. Concentration d'acide chlorogénique = $50 \mu\text{M}$, tampon acétate 0.1 M , pH 5, 25°C	182
III.27	Tracé de la constante cinétique apparente de formation du complexe k_{obs} en fonction de M_t	183
III.28	Complexation de l'acide chlorogénique ($50 \mu\text{M}$) par 1 équiv. de Fe^{III} dans le tampon acétate (0.1M , pH 5, 25°C)	184
III.29	Complexation de l'acide chlorogénique par Fe^{III} dans le tampon acétate (0.1 M , pH 5, 25°C). Concentration d'acide chlorogénique = $50 \mu\text{M}$	184
III.30	Suivi cinétique de la complexation acide chlorogénique- Fe^{III} (tampon acétate 0.1 M , pH 5, 25°C)	185
III.31	Suivi cinétique de la complexation de l'acide chlorogénique ($50 \mu\text{M}$) par 1 équiv. de Fe^{3+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C).	185
III.32	Dosage de Fe^{2+} dans une solution de Fe^{3+} ($100 \mu\text{M}$) en absence ou en présence d'acide chlorogénique (1 équiv.), tampon acétate (pH 5, 25°C)	186
III.33	Spectres UV-visible du mélange acide chlorogénique (AC, $50 \mu\text{M}$) + 1 équiv. Fe^{3+}	187
III.34	Interaction de l'acide chlorogénique (AC) avec Fe^{3+} (1 équiv.) en présence et en absence de la protéine SAB (3 équiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C).	188
III.35	Complexation de l'acide chlorogénique par 5 équiv. Fe^{II} dans le tampon acétate (0.1M , pH 5, 25°C). Concentration d'acide chlorogénique (AC) = $50 \mu\text{M}$.	188
III.36	Suivi cinétique sur 3h de la complexation de l'acide chlorogénique ($50 \mu\text{M}$) par 1 équiv. de Fe^{2+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C).	189
III.37	Dosage Fe^{2+} ($100\mu\text{M}$) en absence ou en présence de l'acide chlorogénique (1eq), tampon acétate (pH=5 et T= 25°C)	189
III.38	Structure chimique de la (+)-catéchine (a) et de son complexe métallique (b)	190
III.39	Interaction de la catéchine avec 1, 3 et 5 equiv. de Fe^{III} dans le tampon acétate (0.1M , pH 5, 25°C). Concentration de la catéchine (Cat) = $50 \mu\text{M}$.	191
III.40	Interaction de la catéchine avec 3 équiv. Fe^{II} dans le tampon acétate (0.1M , pH 5, 25°C). Concentration de la catéchine (Cat) = $50 \mu\text{M}$	191
III.41	Evolution du spectre UV-visible du complexe rutine- Al^{III} (5 équiv. Al^{III}) dans le tampon acétate (0.1M , pH 5, 25°C) en présence de la catéchine	192
III.42	Interaction de différents polyphénols ($50 \mu\text{M}$) avec Cu^+ et Cu^{2+} (5 équiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C)	193
III.43	Autoxydation du Fe^{2+} (concentration initiale = $100 \mu\text{M}$), dans le tampon acétate de pH 5-6, en présence d'ions phosphates, 25°C	194
III.44	Complexation de la rutine ($50 \mu\text{M}$) par Fe^{II} (2.5 équiv.) dans le tampon acétate (0.1 M , pH6, 5 mM phosphate, 25°C). 3 min après mélange	195

III.45	Complexation de la rutine (50 μM) par Fe^{II} dans le tampon acétate (0.1 M, pH 6, 5 mM phosphate, 25°C), en présence et en absence de SAB (3 équiv.), 3 min après mélange	196
III.46	Liaison de Fe^{II} -rutine (tampon acétate + 5 mM phosphate, pH 6, 25°C). Rutine (50 μM), 3 équiv. SAB et 2.5 équiv. Fe^{II}	197
III.47	Les principaux sites de l'albumine impliqués dans son activité antioxydante : la séquence de quatre acides aminés Asp-Ala-His-Lys de l'extrémité N-terminale et le résidu cystéine libre (Cys 34)	197
III.48	Autoxydation de Fe^{2+} (concentration initiale = 100 μM) en absence ou en présence de rutine (1 équiv.) et de SAB (1 équiv.) dans le tampon acétate (pH 6, 5 mM phosphate, 25°C)	198
III.49	Rutine (50 μM) + 2.5 équiv. Fe^{2+} dans le tampon acétate (pH 6, 5 mM phosphate, 25°C)	198

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Caractéristiques et effets des ultrasons selon le type de cavitation induit	47
II	Applications des ultrasons dans les technologies de transformation	51
III	Extraction assistée par ultrasons de saveurs et arômes	54
IV	Extraction assistée par ultrasons d'antioxydants	55
V	Description de l'appareil de sonication (bac à ultrason 3L)	66
VI	Mode opératoire pour l'utilisation du kit du dosage des polyphénols	68
VII	Description des 20 expériences (exprimées en variables codées) intervenant dans le PCC	71
VIII	Variables naturelles et codées appliquées aux facteurs investigués	73
IX	Gradient de solvants pour le dosage des phénols par CLHP	74
X	Expériences réalisées dans le plan expérimental et réponses obtenues	81
XI	Résumé de l'analyse de la variance (ANOVA) pour l'oleuropéine	82
XII	Présentation des paramètres optimisés	84
XIII	Concentration des de l'oleuropéine, hydroxytyrosol et le tyrosol dans l'HOV avant et après enrichissement	88
XIV	Résultats du test d'inhibition du radical libre et les huiles étudiées	91
XV	Concentration d' α -tocophérol dans les huiles étudiées	92
XVI	Résultats du test de friture pour les huiles analysées	93
XVII	Résultats du test de Lab des huiles d'olive vierges	94
XVIII	Résultats du test d'analyse sensorielle des huiles d'olive vierges	94
XIX	Les caractéristiques des huiles étudiées: HOV, HOV-CV et HOV-US	97
XX	Composition en acides aminés de l'albumine de sérum de mammifères	107
XXI	Quelques ligands de l'albumine	108
XXII	Liaison de divers polyphénols à la SAB	109
XXIII	Caractéristiques des cyclodextrines naturelles	111
XXIV	Interaction de divers polyphénols avec la β -cyclodextrine	113
XXV	Liste de réactifs et solvants utilisés	122
XXVI	cinétiques de transfert d'atomes H des polyphénols testés vers le radical DPPH• (tampon acétate 0.1 M, Brij 35 20 mM, pH 5, 25°C, N = 3)	127
XXVII	Réactivité des polyphénols avec le radical DPPH dans différents milieux à 25°C	134
XXVIII	Liste de réactifs et solvants utilisés	163
XXIX	Gradient d'élution pour l'analyse CLHP-SM	165
XXX	pKa et potentiel redox de la rutine et la quercétine	167
XXXI	Complexation de la rutine par Al ^{III} (tampon acétate, pH 5, 25°C). Suivi cinétique à 382 nm durant 2 min. Concentration de rutine = 50 μ M	169
XXXII	Complexation de la rutine par Fe ^{III} (tampon acétate, pH 5, 25°C). Suivi cinétique à 400 nm durant 1 min. Concentration de rutine = 50 μ M	173

XXXIII	Complexation de l'acide chlorogénique par Al ^{III} (tampon acétate, pH 5, 25°C). Suivi cinétique à 382 nm durant 1 min. Concentration d'acide chlorogénique = 50 µM	181
XXXIV	Complexation de l'acide chlorogénique (50 µM) par Fe ^{III} dans un tampon acétate à 25°C et pH 5. Suivi cinétique à 400 nm durant 1 min	186
XXXV	Complexation de la rutine (50 µM) par Fe ^{II} dans un tampon acétate contenant 5 mM de phosphate, 25°C, pH 6. Suivi cinétique à 400 nm durant 3 min	196
XXXVI	Récapitulatif des résultats sur la complexation métallique des polyphénols sélectionnés (tampon acétate, pH 5, 25°C)	200
XXXVII	Valeurs de pK _a de l'acide chlorogénique, de la rutine et de la catéchine	200

Sommaire général

Introduction-Présentation du sujet

Etude bibliographique: Polyphénols, Structures et Propriétés

Partie 1: Extraction

Chapitre I:

Ultrasons (Etat des connaissances)

Chapitre II:

Exemple d'application des ultrasons: Enrichissement de l'huile d'olive

Partie 2: Propriétés physico-chimiques dans le tractus digestif

Chapitre I:

Etat des connaissances

Chapitre II:

Activité antioxydante des polyphénols

Chapitre III:

Interaction des polyphénols avec des ions métalliques

III.1. Etat des connaissances

III.2. Interaction des ions métalliques avec les polyphénols

Conclusion générale et perspectives

Introduction- présentation du sujet



« Pour votre santé, manger 5 fruits et légumes par jour »

Programme National Nutrition Santé PNNS 2001, 2006 – 2010.

Introduction-Présentation du sujet

Le régime méditerranéen, caractérisé par une consommation élevée et variée de produits végétaux (légumes, fruits, huile d'olive, thé...etc), est associé à un allongement de l'espérance de vie. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que la protection qu'une alimentation riche en produits végétaux semble apporter contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers, serait due aux microconstituants de cette diète dont les polyphénols sont les principaux représentants [1, 2].

Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, antioxydante etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentant ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires. Ainsi, ils pourraient constituer une alternative à l'utilisation des additifs alimentaires synthétiques, buthylhydroxyanisole (BHA) et buthylhydroxytoluène (BHT), qui ont montré des effets nuisibles (effet carcinogène) [3].

Une meilleure connaissance du devenir des polyphénols d'importance alimentaire après ingestion et des effets nutritionnels qui en découlent est essentielle d'un point de vue de nutrition préventive. Un des objectifs de la recherche en nutrition préventive est de parvenir à démontrer *in vivo* les effets de la consommation de polyphénols sur la santé et à identifier, parmi les centaines de polyphénols, ceux qui pourraient jouer un rôle protecteur plus important dans une optique de nutrition préventive.

Aujourd'hui encore, ces molécules n'ont pas livré tous leurs secrets. Notre travail s'inscrit dans un programme de recherche visant à mieux comprendre le pouvoir antioxydant des polyphénols abondants dans l'alimentation et les facteurs physico-chimiques modulant leur activité possible dans le tractus digestif.

Afin de mieux situer sur le contexte dans lequel s'inscrit cette présente étude, une revue de bibliographie est présentée sur les polyphénols : structures et propriétés, capacité antioxydante, biodisponibilité et effet santé.

L'huile d'olive représente la principale source de lipide dans la diète méditerranéenne [4-6]. Les effets nutritionnels et thérapeutiques de l'huile d'olive ont été principalement attribués à son profil adéquat en acides gras (98% du poids total d'huile) et à ses composants mineurs, polyphénols, (2% du poids total d'huile) [7]. Il y a un grand intérêt pour la supplémentation des huiles végétales en antioxydants naturels, afin d'inhiber l'oxydation tout en préservant les qualités nutritionnelles et sensorielles [8]. De ce fait, de nombreuses études ont été réalisées sur l'enrichissement de l'huile d'olive à base de matrices végétales: thym, origan, sauge, romarin, épinards, choux...etc. [9]. L'inconvénient de ces suppléments pratiqués en général par macération est qu'elles sont longues et nécessitent des périodes de stockage importantes. Dans ce présent travail, un enrichissement assistée par ultrasons a été testé, afin de réduire ce temps et de faciliter sa mise en place pour les professionnels de l'huile d'olive. Après avoir exposé les phénomènes physiques régissant la technologie des ultrasons, la façon dont les ultrasons sont produits ainsi que leur cheminement jusqu'à la zone de traitement de l'échantillon, nous avons développé par la suite un exemple d'application des ultrasons: Une étude de l'enrichissement de l'huile d'olive en polyphénols par transfert direct de ces derniers des feuilles d'olivier à l'huile, sous irradiation ultrasonore en comparaison avec une macération conventionnelle du laboratoire à l'échelle pilote industriel.

Le dernier volet est voué à une étude des propriétés physico-chimiques de composés phénoliques abondants dans l'alimentation, en relation avec leur activité possible dans le tractus digestif : L'interaction des polyphénols avec les ions de métaux de transition tels que le fer et le cuivre, est un phénomène de grand intérêt biologique. Il pourrait jouer un rôle important dans le pouvoir antioxydant des polyphénols. En effet, les ions du fer et du cuivre sont susceptibles d'entrer dans des cycles redox, qui dans des conditions aérobies, produisent des espèces réactives oxygénées ou ERO (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle, espèces Fe^{IV} etc...). Les polyphénols sont susceptibles d'inhiber ce stress oxydant, non seulement en piégeant les ERO par réduction, mais aussi en formant avec les ions du fer et du cuivre des complexes inertes. Ainsi, les polyphénols sont capables de protéger les lipides polyinsaturés contre les phénomènes d'oxydation générateurs de radicaux et aldéhydes lipidiques responsables du développement des maladies évoquées plus haut. Cependant, la complexation métallique des polyphénols peut limiter l'absorption intestinale du fer (effet

antinutritionnel) et ainsi favoriser les désordres liés à une carence en fer. Ce phénomène est assez significatif dans les populations des pays en voie développement dont l'alimentation est pauvre en fer [10]. Vraisemblablement, les complexes fer-polyphénol formés au cours de la digestion ne sont pas capables de traverser la barrière des cellules intestinales [11]. C'est dans ce contexte que notre travail expérimental a pris naissance et s'articule autour des points suivants :

- Etude des conséquences des interactions des polyphénols avec les ions du fer (libre) et du cuivre sur la stabilité et le pouvoir antioxydant des polyphénols. Des études cinétiques ont été réalisées sur les polyphénols les plus abondants dans l'alimentation et représentatifs des principales classes: phénols de l'olive (oleuropéine, tyrosol et hydroxytyrosol), acide chlorogénique, les flavonoïdes quercétine, rutine et catéchine. Tous présentent un noyau catéchol (1,2-dihydroxybenzène), principal déterminant structural de l'activité antioxydante et complexante;
- La mise au point d'un protocole de réduction du radical DPPH• en milieu micellaire aqueux a permis d'étudier l'influence de la protéine sérum albumine bovine (SAB) et d'un modèle d'amidon (β -cyclodextrine) sur l'activité antiradicalaire des composés phénoliques;
- Des tests colorimétriques ont permis d'évaluer la sensibilité de Fe^{II} à l'oxydation en Fe^{III} et l'influence des phénols et autres agents complexants (phosphate, SAB) sur ce phénomène.

Ces travaux, conduits en milieu faiblement acide (pH 5-6), ont pour but d'évaluer simplement la capacité antioxydante des polyphénols dans l'estomac et l'influence de composants du bol alimentaire sur cette activité, ce qui nous permet de présenter l'hypothèse supportant l'ensemble de ces travaux de thèse:

Les polyphénols pourraient exercer une protection antioxydante dans le tractus digestif, et ce dès le compartiment gastrique, où ils sont présents en fortes concentrations et sous leurs formes natives. Ils pourraient ainsi lutter activement contre l'oxydation, pouvant se produire dès l'estomac.

A la lumière des résultats obtenus, nous essaierons de proposer quelques perspectives de recherche.

Références bibliographiques

- [1] Huang C.L., Sumpio B.E. (2008). Mediterranean diet and cardiovascular health. *American College of Surgeons*. **207** (03): 408–416.
- [2] Lalas S., Athanasiadis V., Gortzi O., Bounitsi M., Giovanoudis I., Tsaknis J., Bogiatzis F. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*. **127**: 1521–1525.
- [3] Japon-Lujan R., Janeiro P., Luque de Castro M.D. (2008). Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasound-assisted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 7231–7235.
- [4] Keys A., Keys M. (1975). How to Eat Well and Stay Well, the Mediterranean Way. *Garden City: Doubleday and Co.* p: 325.
- [5] Keys A., Aravanis C., Van Buchem H., et al. (1981). The diet and all causes death rate in the seven countries study. *Lancet*. **2**: 58-61.
- [6] Gerber M. (1994). Olive oil and cancer. In: Hill MJ, Giacosa A, Caygill CPG, eds. *Epidemiology of Diet and Cancer*. Chichester, Ellis Horwood. 263-275.
- [7] Lesage-Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J.-C., Lorquin J., Delattre M., Simon J.-L., Asther M., Labat M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*. **75**: 501–507.
- [8] Bouaziz H., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidant from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*. **108**: 253–262.
- [9] Salta F.N., Mylona A., Chiou A., Boskou G et Andrikopoulos N.K. (2007). Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and Technology International*. **13**: 413-421.
- [10] Dangles O. (2006). Propriétés chimiques des polyphénols dans les polyphénols en agroalimentaire. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*. Lavoisier. 29-50.
- [11] Kapsokefalou M., Zhu L., Miller D.D. (2006). Adding iron to green tea may decrease its antioxidant capacity in rats after an oral dose of the mixture. *Nutrition Research*. **26**(9): 480-485.

Etude bibliographique:

*Polyphénols, structures
et propriétés*



« Savoir où l'on veut aller, c'est très bien, mais il faut encore montrer qu'on y va »

Zola.E, l'argent

Table des matières, Etude bibliographique: Polyphénols, Structures et Propriétés

I. Présentation générale sur les polyphénols.....	05
I.1. Classification des polyphénols.....	06
I.1.1. Polyphénols simples.....	06
I.1.1.1. Acides phénoliques.....	06
I.1.1.2. Flavonoïdes.....	07
I.1.1.3. Alcools phénoliques.....	10
I.1.2. Polyphénols complexes (tanins)	11
II. Espèces réactives oxygénées – Stress oxydant.....	11
II.1. Formation des ERO.....	12
II.2. Origine des ERO.....	14
III. Polyphénols en tant qu'antioxydants.....	17
III.1. Activité antioxydante des polyphénols dans les aliments.....	17
III.2. Pouvoir antioxydant des polyphénols chez les Humains.....	18
III.2.1. Absorption au sein de l'estomac.....	19
III.2.2. Absorption à partir de l'intestin grêle	20
III.2.3. Absorption à partir du côlon	20
III.3. Modes d'action des polyphénols.....	22
III.3.1. Piégeage des radicaux libres.....	22
III.3.2. Chélation des ions métalliques.....	24
III.3.3. Inhibition des enzymes.....	25
III.3.4. Les polyphénols: une action pro-oxydante ?	26
III.4. Polyphénols et santé.....	27
III.4.1. Polyphénols et maladies cardiovasculaires.....	28
III.4.2. Polyphénols et cancer.....	28
III.4.3. Polyphénols et diabète.....	29
III.4.4. Polyphénols et inflammation.....	29
III.4.5. Polyphénols et autres pathologies.....	30
Références bibliographiques.....	31

I. Présentation générale sur les polyphénols

Depuis une quinzaine d'années, chercheurs et industriels de l'agro-alimentaire s'intéressent de plus en plus à une catégorie d'antioxydants, les polyphénols. La reconnaissance des propriétés antioxydantes de ces composés, leur abondance dans l'alimentation et leur rôle probable dans la prévention des maladies associées à un stress oxydant sont les principales raisons de cet engouement.

Quelles molécules ?

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire [1- 3]. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement [4], contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés [5, 6]. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones (**Fig. 1**), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside [7, 8].

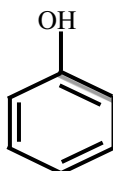


Figure 1: Structure du noyau phénol [9].

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'élaboration de cycles aromatiques, la voie shikimate (également responsable de la synthèse des acides aminés Phe et Tyr) et la voie polyacétate, qui consiste en la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière [10, 11].

I.1. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes [12, 13].

I.1.1. Polyphénols simples

I.1.1.1. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique [11].

- **Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C₆-C₁)**

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides [11, 14]. Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais [15]. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque les plus répandus sont illustrés dans la figure suivante :

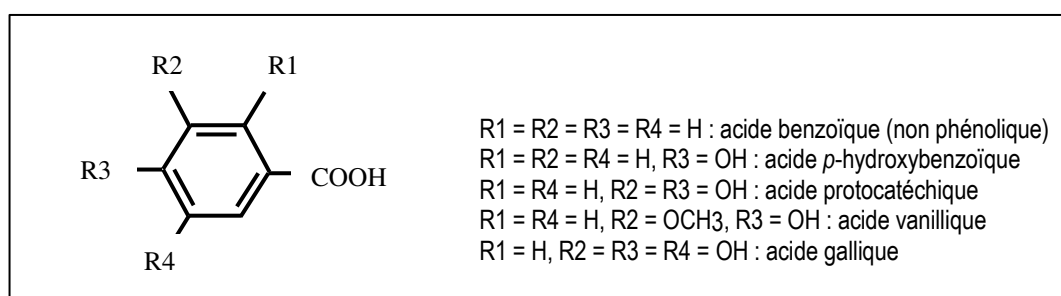


Figure 2 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques [11].

- **Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C₆-C₃)**

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés [14] et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (**Fig. 3**) [11].

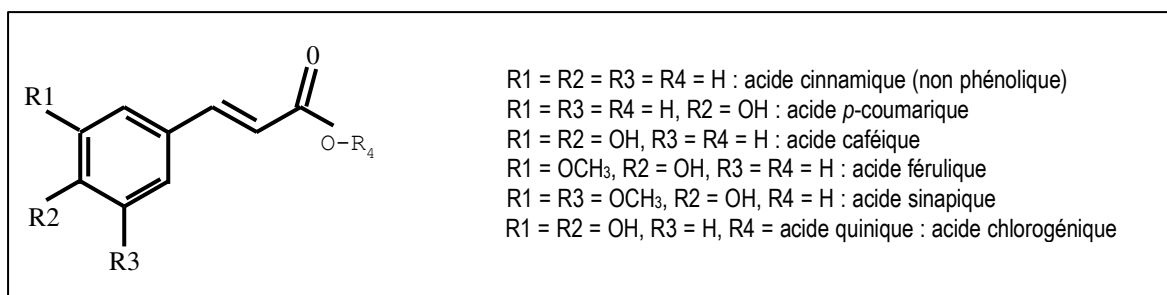


Figure 3: Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques [16, 17].

L'acide caféique est le principal représentant de cette catégorie. Il est présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme), en particulier dans les fruits. Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits, principalement sous forme d'ester de l'acide quinique (acide chlorogénique) [15]. L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans la pomme (430 mg/kg) [18] et dans le café, une seule tasse peut en contenir de 70 à 350 mg [15].

I.1.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C₆-C₃-C₆ (**Fig. 4**) [19]. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [20]. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

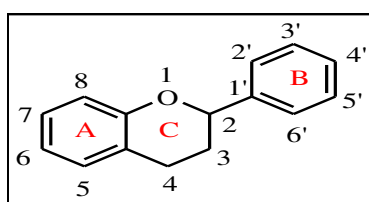


Figure 4: Squelette de base des flavonoïdes [20].

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements

hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides [17].

• Flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2 [11, 17]. Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones. Les principaux aglycones sont l'ériodictyol dans le citron, la naringénine dans le pamplemousse et l'hésperitine dans l'orange (**Fig. 5**) : un jus d'orange contient entre 200 et 600 mg d'hésperitine/L [15].

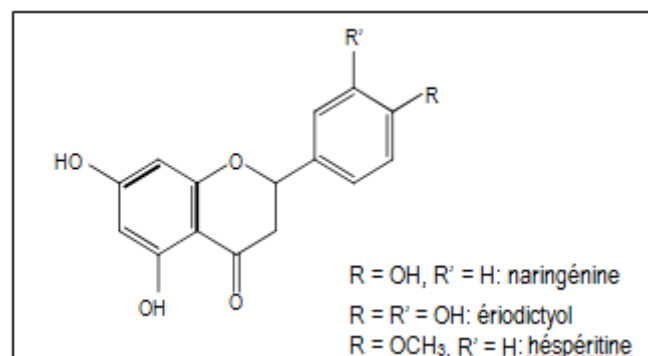


Figure 5: Structure chimique des flavanones [20].

• Flavonols

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison en C2-C3 (**Fig. 6**). Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses: D-glucose et L-rhamnose [20]. Leurs principaux représentants sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière fraîche) [21, 22], le poireau, le chou et les baies telles que le cassis (115 mg/kg de matière fraîche) [23]. Le thé contient aussi des flavonols à hauteur de 45 mg/L [24].

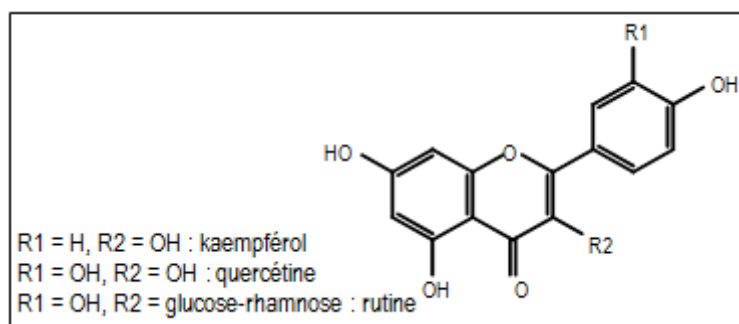


Figure 6: Structures chimiques de flavonols [20].

• Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères, (+)-catéchine et son isomère (-)-épicatechine, jusqu'aux oligomères et polymères, les proanthocyanidines. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines (épicatechine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate) (**Fig. 7**) [17]. Les catéchines sont présentes dans le chocolat (jusqu'à 132,4 mg/kg de matière fraîche de chocolat noir), le thé (jusqu'à 120 mg du thé noir de Chine) et dans les fruits comme l'abricot [25, 26].

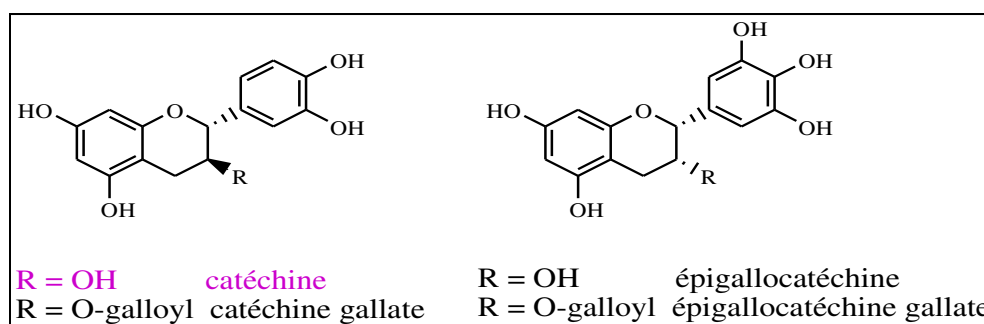


Figure 7: Structures chimiques de certains flavan-3-ols [17].

• Anthocyanidines

Ce sont des pigments, principalement sous formes de glycosides stables et hydrosolubles, rouges en milieu acide, virant au bleu-violet en milieu neutre ou faiblement alcalin [27]. Les composés les plus courants sont la pélagonidine, la cyanidine et la malvidine (**Fig. 8**) [28, 30]. Ils sont présents dans le vin rouge (340-420 mg de malvidine 3-O-glucoside/L) [31]. De nombreux glucosides de cyanidine et deux dérivés de pélagonidine ont aussi été caractérisés dans l'oignon rouge [32].

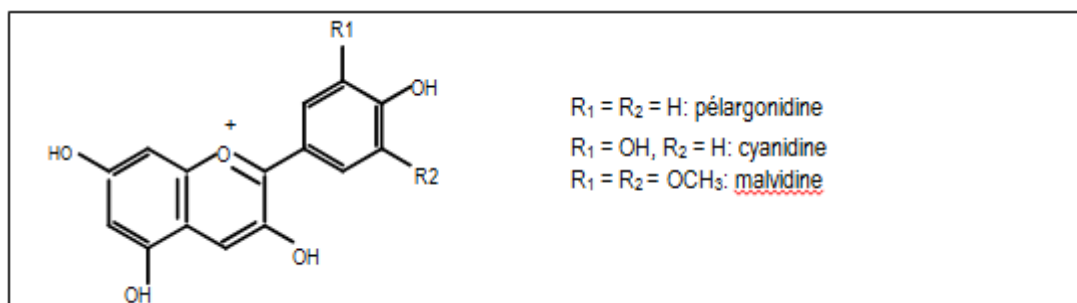


Figure 8 : Structure chimique de quelques anthocyanidines courantes [16, 17].

I.1.1.3. Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) (**Fig. 9**) sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique [33, 37].

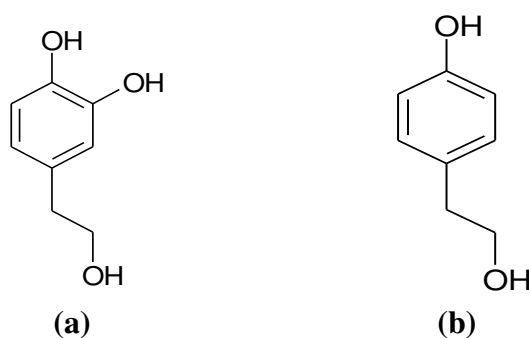


Figure 9 : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b) [36].

Le principal alcool phénolique de l'olive (responsable de l'amertume du fruit) est l'oleuropéine (**Fig. 10**) (60 à 90 mg/g matière sèche) [38].

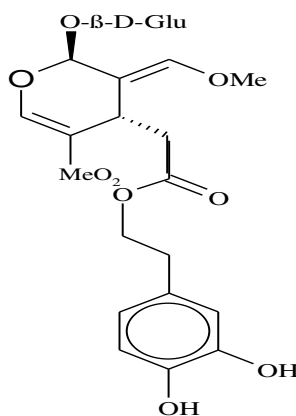


Figure 10: Structures de l'oleuropéine [38].

I.1.2. Polyphénols complexes (tanins)

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles [39]. Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines [40], d'où leur capacité à tanner le cuir. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés [41]:

- **Tanins hydrolysables** : ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (Fig. 11) [42, 43]. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) [44].

- **Tannins condensés** : les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (Fig. 11) [45, 43].

En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, etc...) et de certaines boissons (vin, cidre, thé, etc...) et de l'amertume du chocolat.

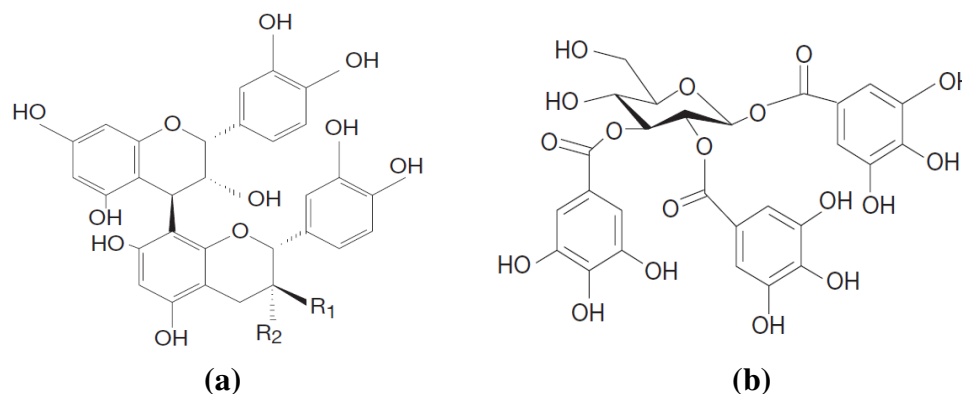


Figure 11: Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose) [46].

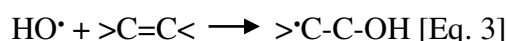
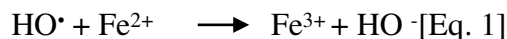
II. Espèces réactives oxygénées - Stress oxydant

Le dioxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une faible partie de O_2 en métabolites potentiellement toxiques: les espèces réactives de l'oxygène (ERO) [47]. Il existe plusieurs types d'ERO, radicalaires ou

non-radicalaires. Les ERO sont susceptibles de participer à la dégradation des biomolécules (lipides, protéines, ADN, glucose, ...) [48]. Les principales ERO sont des formes réduites de O₂: l'anion superoxyde (O₂^{•-}, réduction à 1 électron), le radical hydroxyl (OH[•], réduction à 3 électrons), mais aussi les radicaux oxyl (RO[•]), peroxy (ROO[•]) et le monoxyde d'azote (NO[•]). Les ERO incluent aussi des espèces non radicalaires, notamment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, réduction à 2 électrons), le dioxygène singulet (¹O₂), l'acide hypochloreux (HOCl), l'ozone (O₃) et le peroxydinitrite (ONOO⁻) [49, 50].

II.1. Formation des ERO

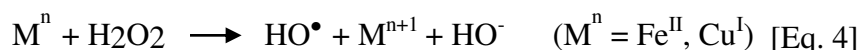
La cellule génère divers types d'ERO qui réagissent selon trois modes d'action, soit en arrachant un électron ou un atome d'hydrogène, soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons carbone-carbone (Eqs 1-3) [51].



Les ERO présentent différentes réactivités :

- O₂^{•-} et H₂O₂ représentent une classe peu active. O₂^{•-} peut se dismuter en H₂O₂ et O₂ (réaction spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase), réagir avec NO[•] pour former ONOO⁻, un oxydant puissant, ou réduire les ions de métaux de transition. O₂^{•-} est produit notamment par réduction monovalente d'O₂ dans les mitochondries, par la NADPH oxydase (une enzyme des macrophages qui participe à la destruction des virus et bactéries) ou par la xanthine oxydase (une enzyme du métabolisme des purines) [52, 53].

- Le radical OH[•] est l'une des espèces chimiques les plus oxydantes et peut attaquer très rapidement la plupart des molécules biologiques. C'est le produit de la réduction monoélectronique de H₂O₂, en présence des ions métalliques de basse valence (réaction de Fenton, Eq. 4).



Les espèces métalliques hypervalentes de type fer-oxo peuvent être assimilées à des ERO. Elles sont produites par activation de protéines hémiques (ex.: myéloperoxydase, metmyoglobine) par les hydroperoxydes [54].

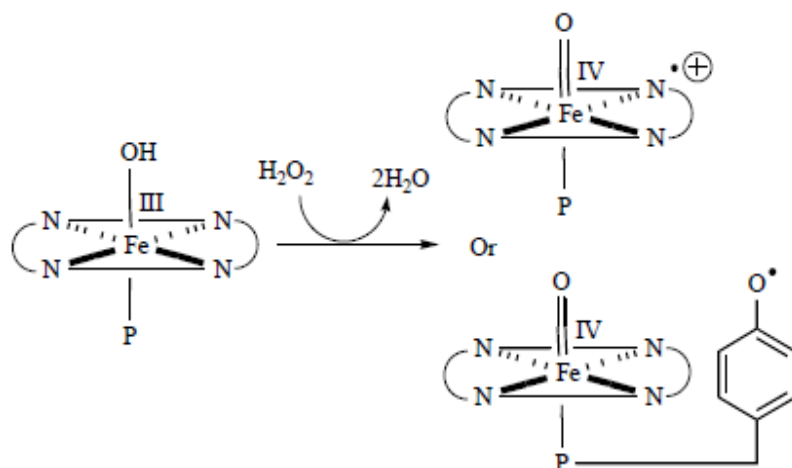


Figure 12: Mécanisme de formation du fer hypervalent dans les protéines hémiques (P = résidu coordinant de la chaîne protéique) [54].

$^1\text{O}_2$ peut être généré par excitation de $^3\text{O}_2$ en présence de photosensibilisateurs mais aussi par des processus chimiques (ex. : réaction de H_2O_2 avec ClO^-). $^1\text{O}_2$ est très réactif et peut par exemple s'additionner rapidement sur des doubles liaisons carbone-carbone [52, 53]. Les différents processus de formation des ERO sont schématisés dans la figure ci-après :

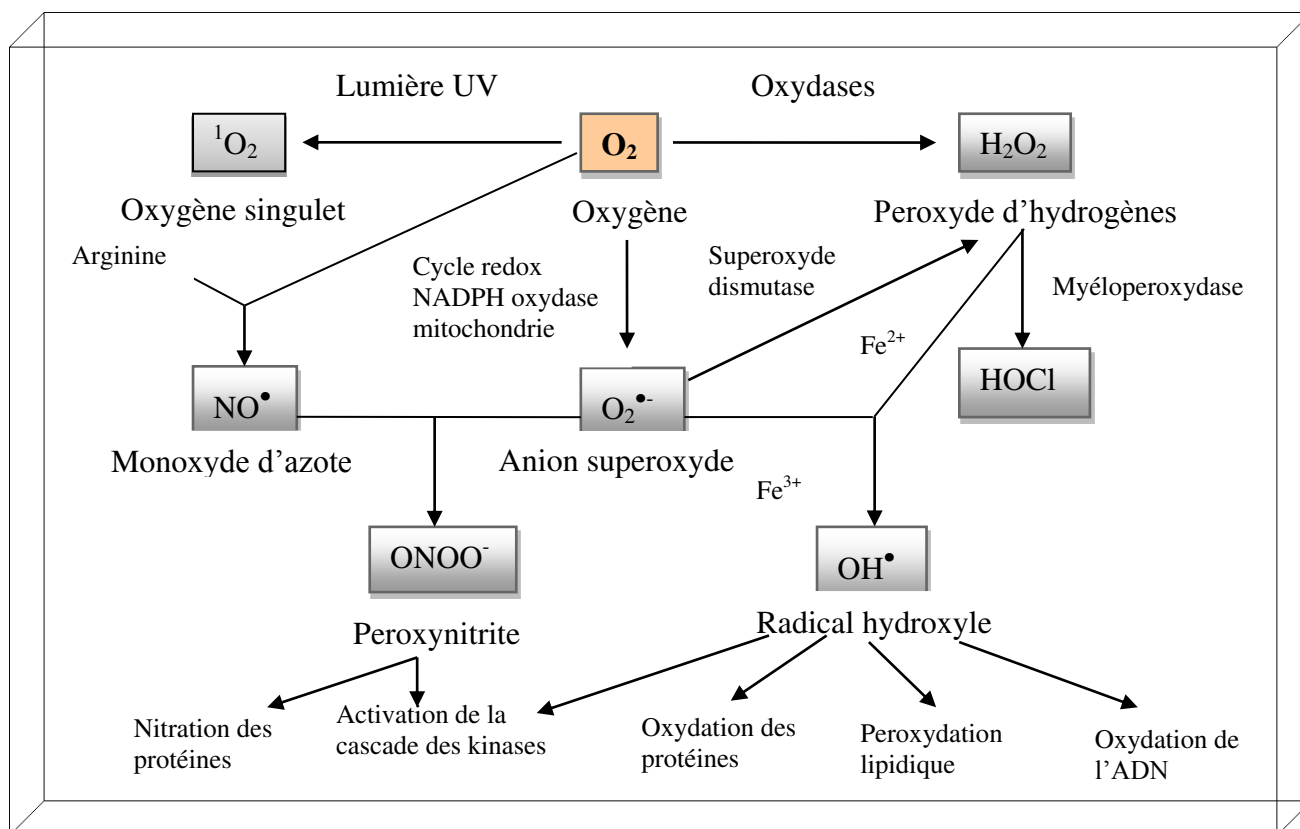


Figure 13: Les processus de formation des ERO [48].

II.2. Origine des ERO

La production des ERO est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin de O_2 pour produire de l'énergie, via une réduction tétravalente séquentielle de O_2 en eau au cours du processus dit de respiration mitochondriale [55]. Toutefois, une partie de O_2 échappe à sa réduction en eau (1-5%), qui peut alors être à l'origine de la production de superoxyde au niveau du transporteur d'électron ubiquinone (coenzyme Q) (Fig. 14) [48, 56, 57]. Les dérivés semiquinones (coenzyme Q) ou les cofacteurs flavine (forme semi-réduite, ex.: xanthine oxydase) jouent un rôle important dans la production de $O_2^{\bullet-}$.

Par ailleurs, les cycles catalytiques des enzymes lipoxygénase (LOX) et cyclooxygénase (COX) impliquent des intermédiaires de type radical peroxy lipidique, qui interviennent dans l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI, voie enzymatique et non enzymatique) (Fig. 15) [56, 57].

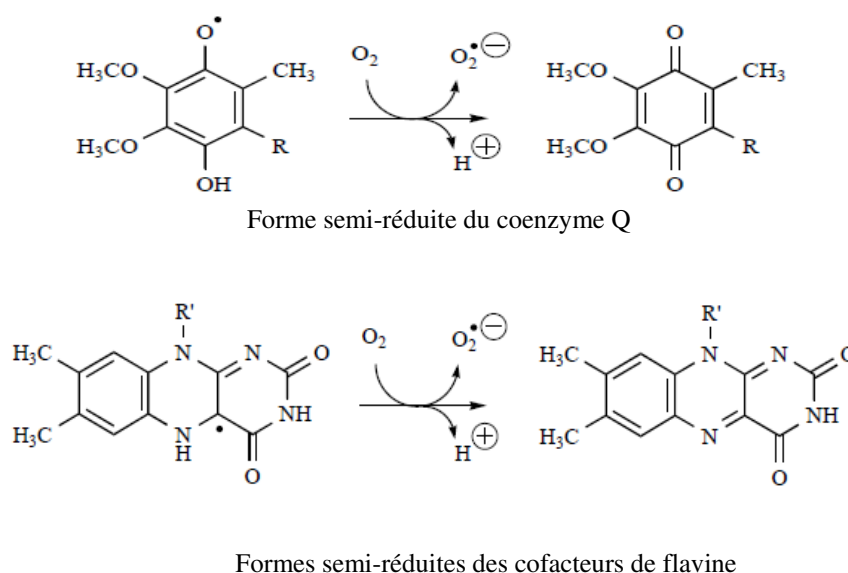


Figure 14: Mécanisme de production du superoxyde dans la mitochondrie (R = chaîne polyisoprénoïde) et dans le cas de la xanthine oxydase (R' = D-ribitol phosphate ou D-ribitol-ADP) [54].

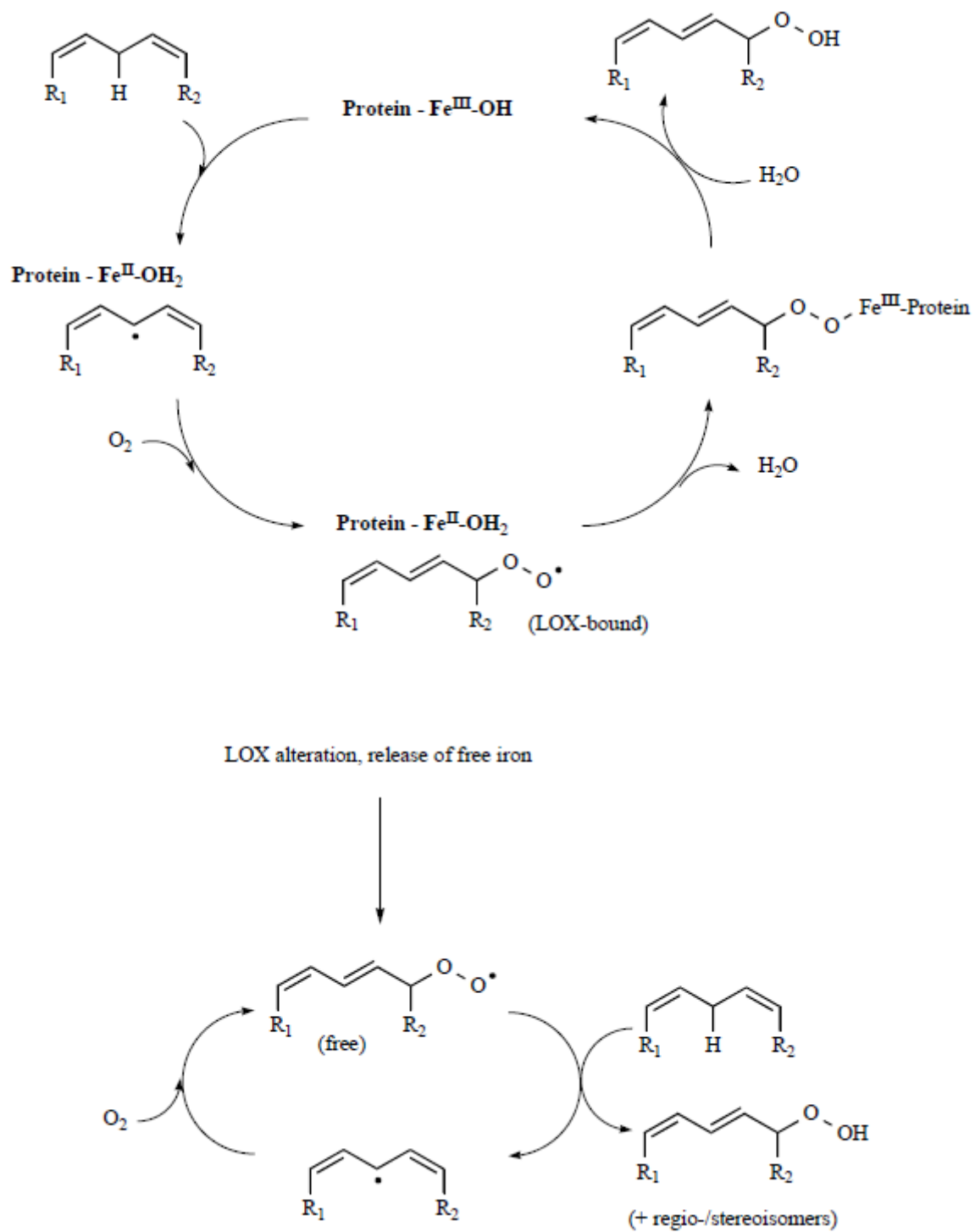


Figure 15: Oxydation enzymatique (LOX) et non enzymatique des AGPI [54].

- Les autres sources des ERO sont résumées dans la figure 16.

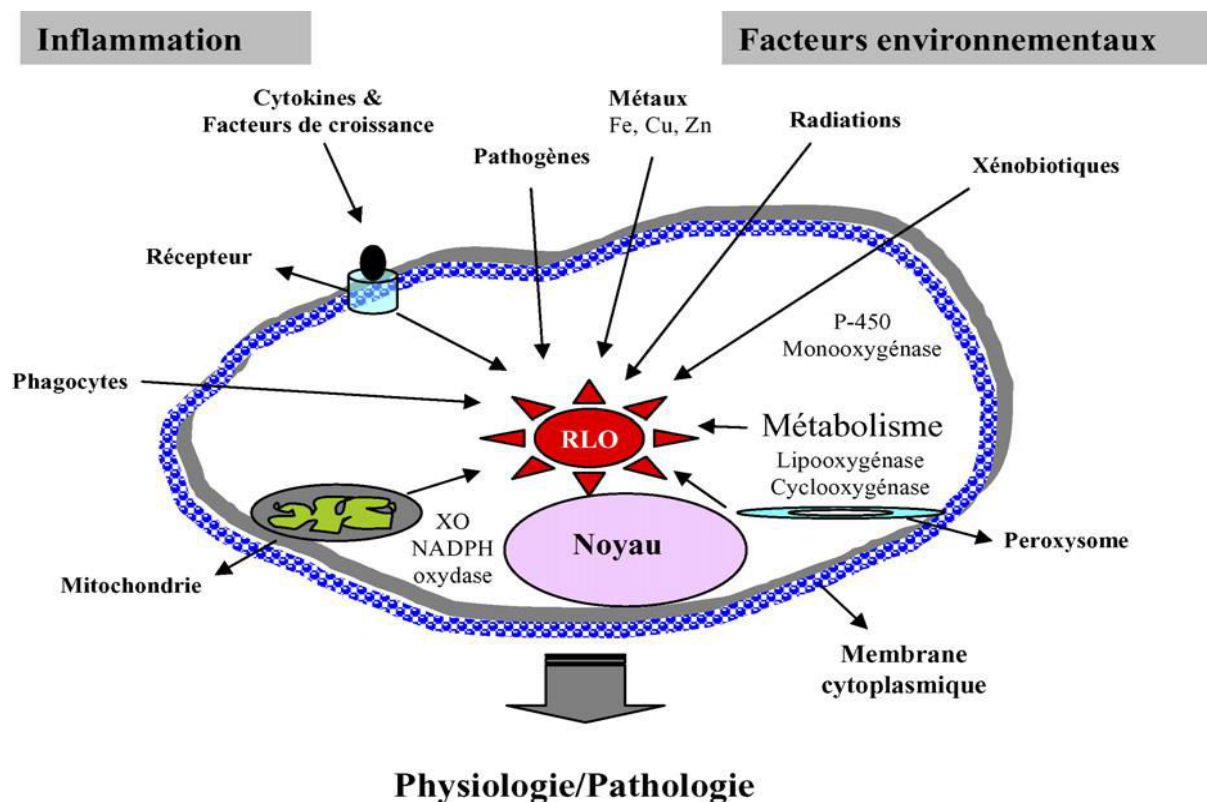


Figure 16: Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres oxygénés (RLO) (XO: xanthine oxydase; P-450 : cytochrome P-450) [58].

Les ERO sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux. En effet, les rayonnements (UV, X), la consommation excessive d'alcool, le tabagisme, certains polluants industriels et l'exercice physique intense sont d'autant de situations qui provoquent une surproduction d'ERO dans notre organisme, susceptible de surpasser nos défenses antioxydantes naturelles (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et autres enzymes antioxydantes), provoquant ainsi des dégâts cellulaires. C'est le stress oxydant. En outre, une alimentation riche en produits végétaux (fruits, légumes et produits dérivés), nous apportent une grande variété d'antioxydants (polyphénols, caroténoïdes, vitamines C et E...) qui peuvent agir en complément de nos défenses naturelles. Le stress oxydant peut être d'origine environnementale (réactions inflammatoires consécutives à des infections, exposition à des radiations ou à des xénobiotiques pro-oxydants), ou génétique (déficit dans l'expression d'enzymes de défense antioxydante) [47, 48, 51, 58]. De manière générale, le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre l'exposition à des pro-oxydants et la capacité de détoxification des systèmes de défense antioxydante (enzymatique et non-enzymatique), le premier prenant le dessus sur le second. En conséquence, des dégâts souvent irréversibles

interviennent dans la cellule: modifications oxydantes au niveau des lipides (AGPI), de l'ADN et des protéines (**Fig. 17**). A des degrés variables, le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies cardiovasculaires, des cancers, du diabète ou encore des maladies neurodégénératives [58- 59].

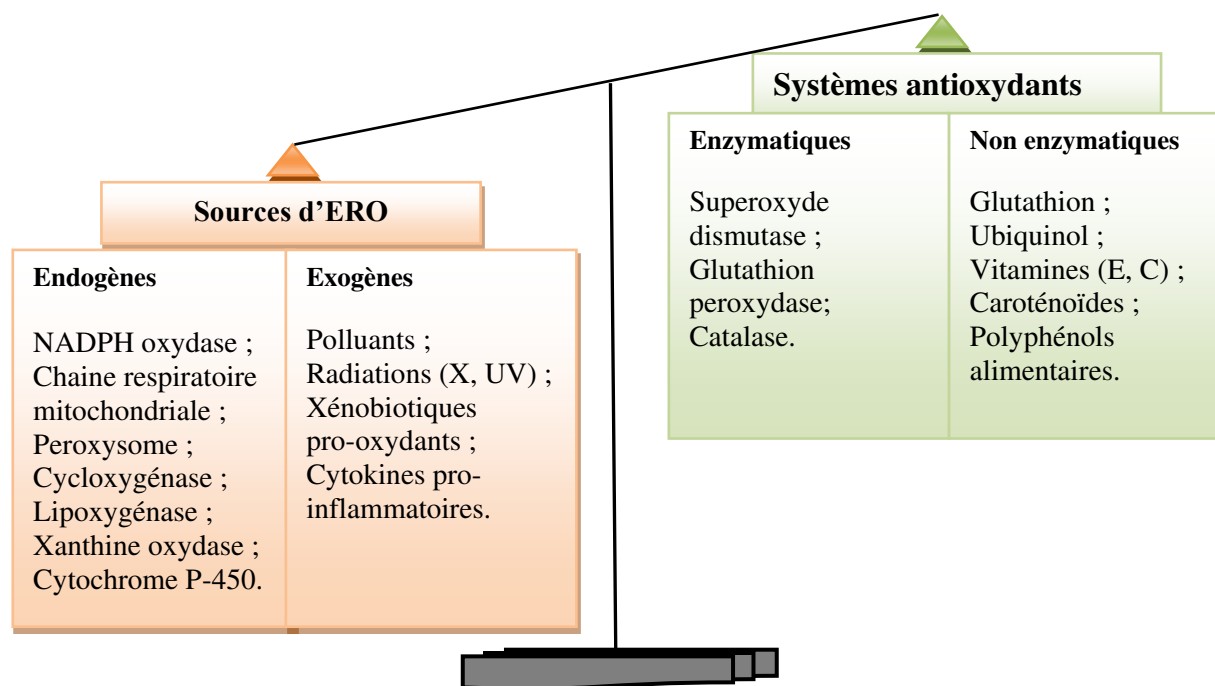


Figure 17 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants.

III. Polyphénols en tant qu'antioxydants

Les antioxydants d'origine alimentaire contribuent vraisemblablement à la défense de l'organisme contre le stress oxydant et ses conséquences. A ce titre, les polyphénols, particulièrement abondants dans une alimentation riche en produits végétaux, pourraient jouer un rôle protecteur important.

III.1. Activité antioxydante des polyphénols dans les aliments

L'auto-oxydation (oxydation non enzymatique par O_2) est un des principaux phénomènes de dégradation des lipides polyinsaturés présents dans divers produits alimentaires tels que les huiles végétales et leurs dérivés (margarines) [60]. Ce phénomène intervient typiquement au cours des traitements industriels et domestiques : procédés thermiques, conditionnement, stockage et cuisson [61, 62]. Globalement, ce processus conduit à la formation des produits

lipidiques oxydés (aldéhydes, époxydes, hydroperoxydes), à leur tour, réagissent avec d'autres ingrédients alimentaires (vitamines, protéines et autres lipides) en diminuant :

- Les propriétés organoleptiques des aliments : apparition de saveurs et odeurs désagréables rendant les aliments difficilement acceptables par le consommateur ;
- La valeur nutritionnelle des aliments : les AGPI sont essentiels à la composition des membranes cellulaires et pourraient exercer une action protectrice contre le développement des maladies cardiovasculaires. Par contre, certains de leurs produits d'oxydation sont oxydants et/ou électrophiles donc potentiellement toxiques.

Il faut noter que l'oxydation des AGPI des aliments peut intervenir dès le tractus digestif, c'est-à-dire immédiatement après ingestion des aliments. Le compartiment gastrique, en raison de son acidité, de sa teneur en dioxygène et de la présence éventuelle de fer héminique d'origine alimentaire (ex. : viande rouge) est un site où l'oxydation des AGPI peut être rapide.

Une voie pour inhiber les évolutions oxydatives des lipides consiste à ajouter aux préparations alimentaires des antioxydants capables de piéger rapidement les radicaux peroxydes lipidiques propagateurs des chaînes radicalaires et/ou les espèces initiatrices de l'oxydation [63-67]. De ce point de vue, les antioxydants naturellement présents dans les plantes d'intérêt alimentaire, voire certains de leurs dérivés amphiphiles, présentent un grand intérêt, notamment depuis la mise en évidence de problèmes d'allergie alimentaire induits par certains additifs d'origine synthétique. Par exemple, le propylgallate, l'octylgallate [68] et le dodecylgallate [69] sont des antioxydants fréquemment ajoutés aux margarines. Ces antioxydants permettent de prolonger la durée de conservation des AGPI, de les préserver lors de traitements thermiques et éventuellement après ingestion.

III.2. Pouvoir antioxydant des polyphénols chez les Humains

Les effets des polyphénols sur la santé sont indissociables de la notion de biodisponibilité, qui intègre un grand nombre de paramètres comme : l'absorption intestinale, l'excrétion des métabolites dans la lumière intestinale, le métabolisme par la microflore, le métabolisme intestinal et hépatique, les propriétés des métabolites circulants (structures, cinétiques d'apparition et d'élimination, liaison à la sérum albumine et autres protéines du plasma), la captation cellulaire, le métabolisme dans les tissus cibles, la sécrétion biliaire et l'excrétion urinaire (Fig. 18).

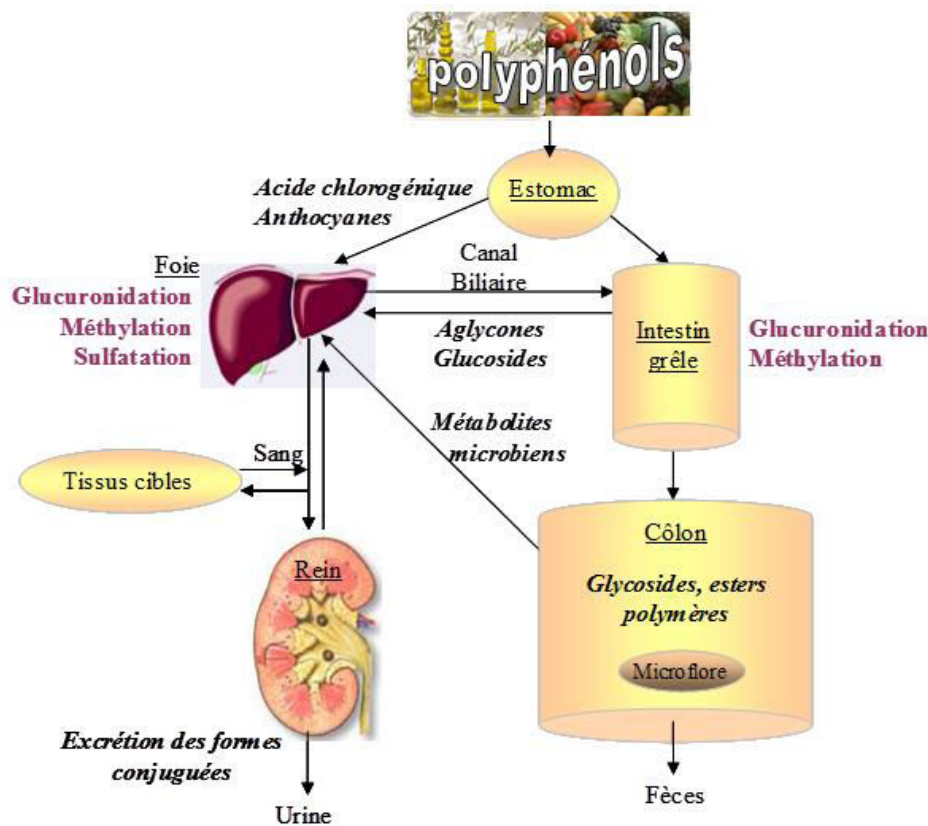


Figure 18: Schéma général de biodisponibilité des polyphénols [70, 71]

Les principales données de la biodisponibilité des polyphénols de l'alimentation sont résumées comme suit [72] :

III.2.1. Absorption au sein de l'estomac

Seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamiques sous forme liée tels que l'acide chlorogénique peuvent être absorbés directement à partir de l'estomac [72].

III.2.2. Absorption à partir de l'intestin grêle

Les aglycones de polyphénols (ex.: les flavanols) et les O- β -D-glucosides peuvent être notablement absorbés dans le petit intestin, les premiers par diffusion passive, les seconds selon deux mécanismes [73] : Une absorption directe des glucosides *via* le transporteur de glucose sodium-dépendant. Elle est suivie par l'hydrolyse des glucosides dans le cytosol par une β -glucosidase cytosolique. Un autre mécanisme impliquant la lactase phloridzine hydrolase, une glucosidase de la bordure en brosse de l'intestin qui catalyse l'hydrolyse extracellulaire des glucosides, a aussi été démontré. Il est suivi par l'absorption de l'aglycone ainsi libéré par diffusion passive.

III.2.3. Absorption à partir du côlon

Les polyphénols non absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle atteignent le côlon, puis sont catabolisés par la microflore colique, ayant des activités enzymatiques diverses, avant d'être absorbés. En particulier, la rutine, un flavonol commun de l'alimentation (quercétine (3-O- β -D-(L-rhamnosyl- α -1,6-D-glucoside)), doit être hydrolysée par les enzymes bactériennes avant d'être absorbée au niveau du côlon et atteint la circulation sanguine (sous forme de conjugués de quercétine) avec un retard notable par rapport aux cas des glucosides de quercétine (abondants dans l'oignon), absorbés dès le petit intestin. D'une manière générale, le catabolisme de la microflore colique peut produire des métabolites biodisponibles, en concentration de l'ordre de 1 mM, comme l'acide benzoïque, l'acide phénylacétique et l'acide phénylpropionique [74]. En particulier, les proanthocyanidines ne sont pas biodisponibles sous leurs formes natives et l'absorption est limitée aux catabolites microbiens libérés à partir des oligomères les plus courts [75, 76]. De même, chez les humains, il a été montré que l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, produit par la microflore colique, représente plus de 70% des métabolites de la cyanidine 3-O- β -D-glucoside (principale anthocyane du jus d'orange sanguine) avec une concentration circulante maximale de 500 nM contre seulement 2 nM pour la forme native [77].

La fraction de polyphénols absorbés subit une conjugaison dans les entérocytes et dans les hépatocytes. Ainsi les formes circulantes sont typiquement les glucuronides, sulfates et sulfoglucuronides. De plus, les groupements catéchol, important pour l'activité antioxydante, sont partiellement méthylés par la catéchol O-méthyltransférase dans le foie.

En conséquence de l'absorption intestinale limitée et de l'importance du catabolisme, la concentration plasmatique maximale de polyphénols et de leurs formes conjuguées (après une consommation moyenne de 50 mg en équivalent d'aglycone) dépasse rarement 1 μM et peut être beaucoup plus faible ($< 50 \text{ nM}$ pour les anthocyanes) [72]. Ces concentrations sont de plusieurs ordres de grandeur plus faibles que celles des antioxydants hydrophiles du plasma (L-ascorbate, urate, glutathion et sérum albumine). La faible biodisponibilité des polyphénols d'intérêt alimentaire est également soulignée dans l'excrétion urinaire faible, typiquement inférieure à 10%, à l'exception des isoflavones, de certains acides hydroxycinnamiques et des flavanols [72].

Dans l'ensemble, en tenant compte de la faible concentration circulante de polyphénols alimentaires et de la faible activité antioxydante intrinsèque de leurs métabolites (en raison des modifications chimiques des groupements phénoliques par conjugaison, voire désoxygénation par des enzymes microbiennes), nous pouvons conclure que les effets santé attribués à la fraction absorbée à partir du tractus digestif ne sont pas dominés par l'activité antioxydante au sens strict, c'est-à-dire la réduction directe des ERO (impliquées dans le stress oxydant). Cette conclusion est en contradiction apparente avec l'augmentation importante de la capacité antioxydante dans le plasma (protocole expérimental basé sur la réduction de Fe^{III} en Fe^{II}), généralement observée après la consommation d'aliments riches en polyphénols. Cependant, il est maintenant clair que ce phénomène n'est pas dû aux métabolites de polyphénols mais surtout à l'élévation du taux d'urate provenant du métabolisme de divers produits végétaux tels que le fructose, le saccharose, le sorbitol, le lactate et la caféine [78].

Compte tenu de la biodisponibilité limitée et du métabolisme des polyphénols chez les êtres humains, aucun lien systématique ne peut être établi entre la capacité des polyphénols (composés purs ou extraits) à donner des électrons (généralement évaluée dans les tests populaires ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TEAC (Trolox-equivalent antioxidant capacity) et leur éventuelle activité antioxydante *in vivo* après ingestion [79].

En résumé, les données sur la biodisponibilité imposent des restrictions sévères sur la possibilité que les polyphénols agissent réellement, *in vivo*, comme antioxydants. Les sites possibles pour l'action antioxydante de ces composés sont les suivants :

- Le tractus gastro-intestinal dans lequel les polyphénols natifs peuvent s'accumuler en forte concentration et protéger les AGPI alimentaires de l'auto-oxydation initiée par les espèces pro-oxydantes alimentaires telles que le fer héminique ;

- Certains sites d'inflammation (cellules endothéliales, macrophages) impliqués dans le développement de l'athérosclérose à condition que des concentrations relativement importantes de métabolites de polyphénols, avec une forte capacité résiduelle donatrice d'électrons, puissent s'accumuler sur ces sites [80]. Des phénomènes de déconjugaison (catalysés par des β -glucuronidases cellulaires) qui permettent de restaurer le pouvoir réducteur ont également été observés.

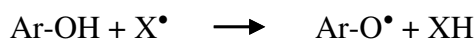
III.3. Modes d'action des polyphénols

Les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes:

- Le piégeage direct des ERO ;
- L'inhibition des enzymes génératrices d'EOR ;
- La chélation des ions de métaux de transitions, responsables de la production des ERO ;
- L'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes [81].

III.3.1. Piégeage des radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox [82], les polyphénols (Ar-OH), sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxydes (ROO^\bullet), les alkoxydes (RO^\bullet) et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où

X^\bullet : Représente l'une des ERO mentionnées ci-dessus ;

Ar-O^\bullet : radical aryloxyde qui, s'il s'agit d'un noyau catéchol, peut réagir avec un autre radical pour former une *o*-quinone plus stable (Fig. 19).

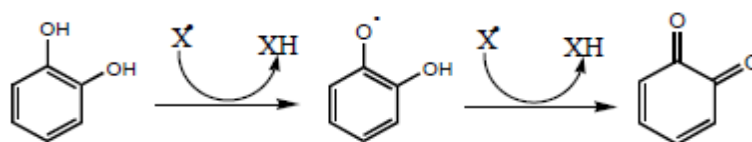


Figure 19: Piégeage des ERO (X^\bullet) par un noyau catéchol.

En outre, le radical aryloxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Ainsi, la capacité antioxydante des polyphénols dépend non seulement du potentiel redox du couple $\text{Ar-O}^\bullet/\text{Ar-OH}$ mais aussi de la réactivité du radical Ar-O^\bullet .

L'efficacité de la conversion d'un phénol (ArOH) en le radical aryloxy (ArO^\bullet) correspondant reflète la stabilité de ce dernier et peut être quantifiée par des paramètres expérimentaux et théoriques tels que l'énergie de la dissociation de liaison (EDL) du groupement OH, le potentiel redox du couple $\text{ArOH}/\text{ArO}^\bullet$, les constantes de vitesse de la réduction des ERO généralement déduites à partir d'expériences de radiolyse pulsée [83, 84] et les constantes de vitesse pour la réduction de radicaux colorés stables tels que le DPPH [85]. De nombreuses études ont établi des relations entre la structure des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres [85, 86]. De ces données, il ressort que la présence d'un groupement catéchol (*ortho*-diphénol ou 1,2-dihydroxybenzène) est le déterminant majeur de l'activité redox des polyphénols. En effet, le radical correspondant, de type *ortho*-semiquinone, est relativement stable grâce à une délocalisation des électrons et une stabilisation par liaison hydrogène intramoléculaire (Fig. 20) [87]. Par exemple, les valeurs de l'EDL d'un phénol de type catéchol et du résorcinol (1,3-dihydroxybenzène) sont 88, 81 et ca. 90 kcal mol⁻¹, respectivement [88]. De même, les potentiels redox à pH 7 du catéchol et du résorcinol sont 0,53 et 0,81 V, respectivement [89]. Par conséquent, à l'exception du groupement OH en C3 des flavonols (type énon), qui apporte également une contribution très importante à la capacité donatrice d'hydrogène, les unités structurales les plus importantes pour une forte activité réductrice des flavonoïdes sont le cycle B de type catéchol ou pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzène) et les unités galloyles des catéchines et des tanins. Par exemple, les constantes de vitesse de piégeage du radical HO[•] à pH ca. 9 sont 1,0 (épicatéchine, EC), 3,1 (propylgallate), 4,7 (épigallocatechine, EGC), 5,8 (gallate d'épicatéchine, ECG), 7,1 (gallate d'épigallocatechine EGCG) x 10⁹ M⁻¹ s⁻¹ pour les polyphénols du thé vert [90]. Le caractère réducteur des polyphénols dépend aussi du pH. Ainsi, le potentiel d'oxydoréduction de la rutine et de la catéchine diminue de ca. 1,0 V à pH 3 à 0,6 V à pH 7 (contre ca. 0,3 V pour la quercétine) à la suite de la déprotonation des OH les plus acides [89, 91].

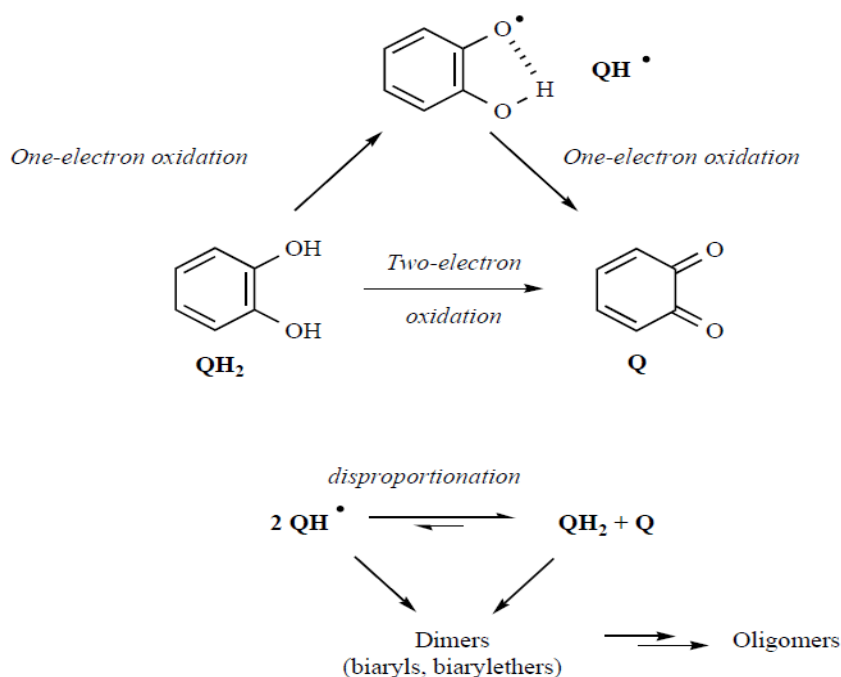
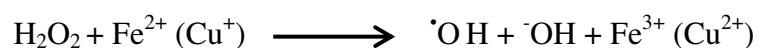


Figure 20: Oligomérisation oxydative des catéchols [54]

III.3.2. Chélation des ions métalliques

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe^{2+} pour la catalase et Cu^+ pour la superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production du radical OH^\bullet par la réduction de H_2O_2 lors de la réaction de Fenton [86, 91].



En outre, l'autoxydation des ions Fe^{2+} et Cu^+ est une source de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 . Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante. Les polyphénols abondants dans l'alimentation, notamment les flavonoïdes, séquestrent ces ions métalliques au niveau de différents sites (**Fig. 21**).

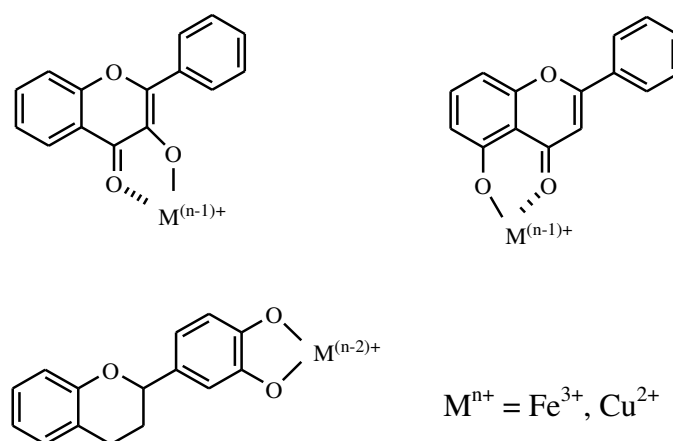


Figure 21: Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes [92]

III.3.3. Inhibition des enzymes

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines [93, 94], via des interactions de van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques). Par exemple, les aglycones des flavonoïdes, essentiellement les flavones et les flavonols (noyaux tricycliques plans et polarisables), ont une capacité de se lier avec beaucoup de protéines globulaires, notamment des enzymes, des récepteurs et transporteurs [54].

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols. Plusieurs travaux ont rapporté que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet [95, 96], par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO [97, 98]. Cette double action est bien mise en évidence dans le cas de la xanthine oxydase, enzyme du foie impliquée dans la maladie de la goutte, et qui catalyse une réaction du catabolisme des purines, en transformant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique [98]. Cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Les flavones et flavonols se lient à la XO en compétition avec le substrat xanthine, ce qui inhibe la formation de l'acide urique (IC_{50} de 0,5 à 10 μM , à l'exception de la 3-hydroxyflavone qui n'interagit pas avec XO). D'autre part, le flavanol (cycle C non plan) catéchine ne se lie pas à l'enzyme mais réduit efficacement le superoxyde ($IC_{50} = 0,48 \mu M$). Enfin, les flavones et flavonols ayant un cycle B de type catéchol comme la quercétine combinent les deux mécanismes, à savoir formation d'un complexe inhibiteur-enzyme ($IC_{50} =$

2,38 μM) et réduction du superoxyde résiduel, qui s'est échappé de la cavité enzymatique ($\text{IC}_{50} = 0,33 \mu\text{M}$) [99].

De nombreux flavonoïdes sont aussi de puissants inhibiteurs des métalloenzymes lipoxigénase, myéloperoxydase et NADPH oxydase [54, 98].

III.3.4. Les polyphénols: une action pro-oxydante ?

Tandis que les propriétés antioxydantes des polyphénols corroborent l'hypothèse d'un rôle positif dans la nutrition humaine et la prévention de maladies, certains auteurs invoquent l'activité prooxydante de ces composés *in vitro* [100]. Seuls les polyphénols les plus réducteurs peuvent manifester cet effet en entrant dans des cycles redox qui génèrent des ERO. Les produits d'oxydation à un ou deux électrons des composés phénoliques (radicaux aryloxyles, *o*-quinones, *p*-méthylènequinones) (**Fig. 20**) sont produits en présence de dioxygène et de certains ions de métaux de transition. Par exemple, l'acide gallique est capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} , ou Cu^{2+} en Cu^{+} , et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle (**Fig. 22**). Le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la réaction est produit par autoxydation des ions de basse valence. Par leurs effets pro-oxydants, certains polyphénols peuvent endommager l'ADN, les lipides et d'autres biomolécules. La signification biologique de ces effets pro-oxydants est dépendante de la présence d'ions du fer libres, c'est-à-dire non liés aux protéines [101, 102].

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux définir la frontière entre effets pro-oxydants et effets antioxydants. Quoi qu'il en soit, les nombreux effets positifs sur la santé attribués aux composés phénoliques ne mettent pas uniquement en jeu les propriétés antioxydantes mais aussi des propriétés plus spécifiques impliquant leur interaction avec diverses protéines au sein de la cellule.

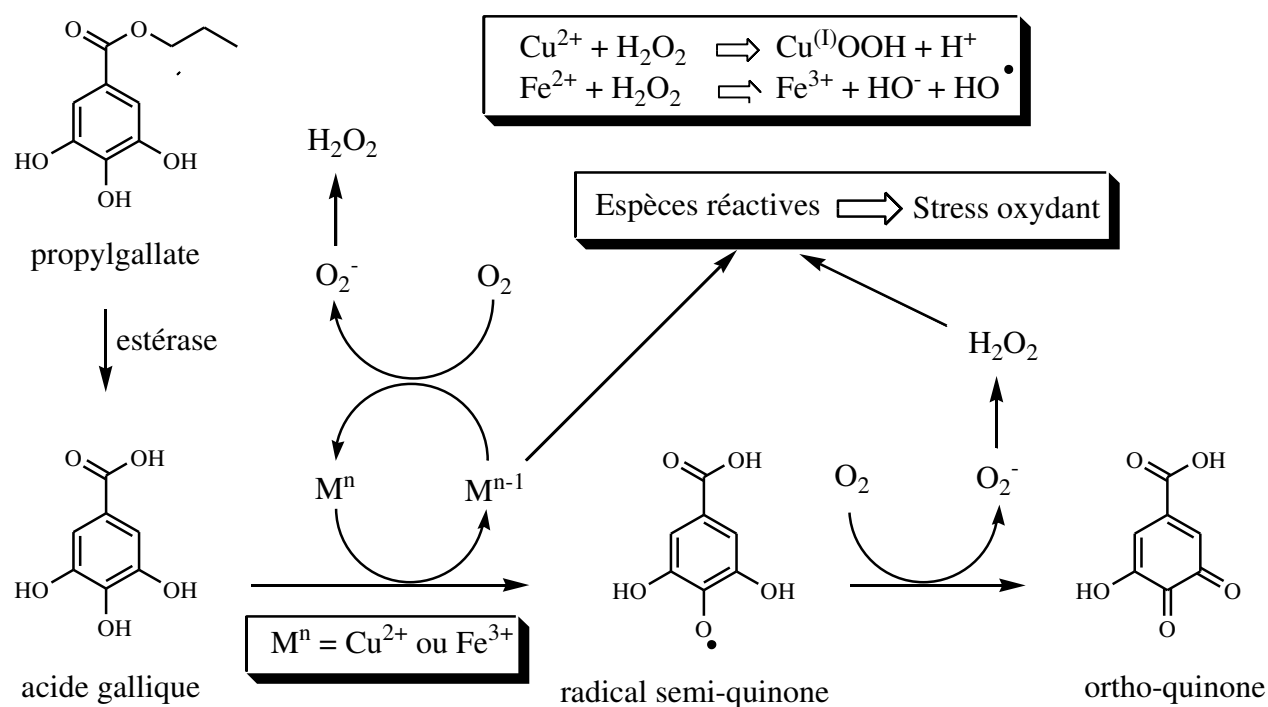


Figure 22: Mécanisme de formation d'ERO par l'acide gallique (métabolite du propylgallate) [103].

III.4. Polyphénols et santé

Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (maladies cardiovasculaires, cancers, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental. De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols dans la prévention de ces pathologies, qui met en cause les propriétés réductrices des polyphénols et/ou leur affinité pour une grande variété de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription).

Les activités biologiques des polyphénols ont souvent été évaluées *in vitro*, avec des protéines purifiées, des extraits cellulaires et des cellules entières en culture. Les propriétés biologiques des métabolites conjugués majoritairement présents dans le sang et les tissus ont, en revanche, été très peu étudiées, faute de disposer des standards commerciaux.

La signification de ces effets biologiques dans le domaine de la nutrition humaine est encore loin d'être établie d'autant qu'ils mettent presque toujours en jeu les formes natives ou aglycones de polyphénols et non pas les formes conjuguées circulantes. Pour progresser dans la démonstration *in vivo* des effets santé des polyphénols, une meilleure connaissance de la

biodisponibilité des polyphénols (leur devenir après absorption éventuelle au travers de la paroi intestinale) et une combinaison d'études cliniques pertinentes sont indispensables. Le développement récent de nouveaux outils et méthodes pourrait permettre des avancées importantes dans les années à venir. C'est notamment le cas de la nutriginomique qui vise à mettre en évidence les gènes dont l'expression est régulée (à la hausse ou à la baisse) par les composants de l'alimentation. La difficulté réside ensuite dans l'analyse et l'interprétation de ces données biologiques complexes.

III.4.1. Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Diverses études épidémiologiques ont montré l'existence d'une corrélation inverse entre la consommation de polyphénols ou d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement de maladies cardiovasculaires. Ainsi une méta-analyse basée sur 7 études cas-témoins et 10 études en cohortes suggère une réduction du risque d'infarctus du myocarde de 11% lors de la consommation de trois tasses de thé par jour [104]. Plusieurs études de cohortes ont montré que la prise de flavonols et de flavones était inversement corrélée aux taux de mortalité par maladies coronariennes [105]. Il s'avère notamment que de fortes prises de quercétine et de kaempférol réduisent le taux de mortalité due à des accidents cardiaques de type ischémie, dans lesquels peuvent être mises en cause les plaques d'athérome [106].

Les mécanismes d'action des polyphénols, impliqués dans la prévention de ce type de pathologies, incluent l'inhibition de l'oxydation des LDL, l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et l'inhibition de la formation de cellules spumeuses dans les aortes [107].

III.4.2. Polyphénols et cancer

Les propriétés anticancéreuses des polyphénols ont été mises en évidence dans de nombreuses études *in vitro*, utilisant des cultures cellulaires cancéreuses ou des animaux prétraités par des réactifs chimiques carcinogènes. Cependant, les données disponibles sur les effets des polyphénols vis-à-vis des cancers chez l'homme sont plus disparates.

L'effet des polyphénols sur les lignées de cellules cancéreuses humaines est fréquemment protecteur et induit une réduction du nombre de tumeurs et de leur croissance [107]. Plusieurs mécanismes d'action ont été identifiés: activité oestrogénique ou antioestrogénique, effets antiprolifératifs, induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose, prévention du stress oxydant, activité anti-inflammatoire, modification de la signalisation cellulaire [108].

Il a été montré qu'une administration orale d'acide ellagique réduisait l'expression du facteur de transcription NF- κ B et des enzymes COX-2 et iNOS lors d'une carcinogénèse colique chimiquement induite chez le rat [109]. En outre, la génistéine limite la croissance des tumeurs sensibles aux hormones par ses propriétés oestrogéniques expliquant ainsi en partie les effets protecteurs des isoflavones observés dans les modèles de cancers mammaires et prostatiques [110].

III.4.3. Polyphénols et diabète

L'administration aiguë ou chronique de polyphénols chez des modèles animaux a montré des effets sur la glycémie : les polyphénols agissent par différents mécanismes dont l'inhibition de l'absorption du glucose au niveau intestinal [111], ou encore son assimilation dans les tissus périphériques (inhibition de la gluconéogenèse, de la stimulation adrénergique de l'absorption du glucose ou stimulation de la libération de l'insuline par les cellules β du pancréas) [107].

Les données portant sur les effets des polyphénols dans la prévention du diabète chez l'homme sont moins nombreuses que chez l'animal. Il a été montré que la consommation de 400ml de café décaféiné n'avait pas d'effet sur la glycémie lorsqu'il était ingéré avec du glucose ; cependant, il diminue la sécrétion du polypeptide insulino-tropique glucose-dépendant (GIP) et augmente la sécrétion du glucagon de manière à ce que l'absorption du glucose soit retardée [112]. Chez des patients atteints de diabète de type II, la consommation de 50 mg/j d'un complément alimentaire contenant des anthocyanes, des flavones et des acides phénoliques d'orange sanguine pendant 2 mois n'a pas d'effet sur la glycémie [113]. Cependant, certaines données épidémiologiques laissent penser que les polyphénols pourraient avoir tout de même un effet protecteur puisqu'il a été observé que la consommation de café (riche en acide chlorogénique) était associée à une diminution du risque de diabète de type II [114].

III.4.4. Polyphénols et inflammation

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma [115], que la consommation

d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines (IL-8, IL-13 et IFN- α) circulantes [116] ou encore que l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma dû à une consommation de jus de fruits concentré était associée à une diminution des cassures de brins d'ADN [117].

L'inflammation est la réponse immunitaire de l'organisme à une agression par des agents pro-inflammatoires d'origine virale, bactérienne ou autre (par exemple, les lipoprotéines oxydées, marqueurs du stress oxydant). L'inflammation est précisément régulée afin de limiter les altérations des biomolécules de l'hôte. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique [118] et la plupart des pathologies chroniques, citées précédemment, possèdent une composante inflammatoire [119]. Les différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols dans ces contextes pathologiques ont montré que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation [120] et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation [121].

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les polyphénols pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA): phospholipase A2, cyclooxygénase et lipoxygénase. Ils agissent également sur la production de NO en modulant l'activité des NOS. Des travaux menés *in vitro* ont également montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibaient la production de cytokines telles que IL-4, IL-5 et IL-13, que la quercétine inhibait la production de TNF- α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS), que le kaempférol inhibait l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IL-6 dans les mastocytes [120]. De plus, il est maintenant connu que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant *in vitro* et *in vivo* sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B [121].

III.4.5. Polyphénols et autres pathologies

Les polyphénols ont montré des effets protecteurs dans d'autres pathologies, telle que la sclérose en plaque [120], l'ostéoporose [107] et les pathologies liées au vieillissement cérébral (maladie d'Alzheimer, autres types de démences, maladie de Parkinson...) [122]. Les composés phénoliques peuvent aussi atténuer les infections d'origine virale ou bactérienne [19].

Références bibliographiques

- [1] Mompon B., Lemaire B., Mengal P. et Surbel D. (1996). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. IN « Polyphénols 96 ». Ed INRA. 31-35.
- [2] Bianco A., Chiacchio M.A., Grassi G., Iannazzo D., Piperno A et Romeo R. (2006). Phenolics compounds of *Olea europaea* : Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*. **95**: 562-565.
- [3] He Z., Xia W. et Chen J. (2008). Isolation and structure elucidation of phenolics compounds in Chinese olive (*Cnarium album L.*) fruit. *European Food Research and Technology*. **226**: 1191-1196.
- [4] Richter G. (1993). Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Ed Presse polytechnique et universitaire romande. pp: 317-339.
- [5] Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de Cardiologie et d'Angiologie*. **51**: 304-315.
- [6] Druzyńska B., Stepnińska A. et Wolosiak R. (2007). The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. **6**: 27-36.
- [7] Bruneton J. (1999). Phytochimie. Plantes médicinales. Pharmacognosie. 3^{ème} édition, Paris, France. pp : 125-165.
- [8] Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. **99** : 191–203.
- [9] Sarni-Manchado P. et Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. pp : 02-11.
- [10] Guignard J.L. (2000). Les composés aromatiques In : Biochimie végétal. Ed : Dunod. pp : 161-217.
- [11] Bruneton J. (2008). Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp 198-260.
- [12] Clifford M.N. (1999). Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea *Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida*. **41** (5): 393-397.
- [13] D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. et Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità*. **43**(4) : 348-361.

- [14] Skerget M., Kotnik P., Hadolin B., Hras A.-R., Simonic M. et Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. **89**: 191-198.
- [15] Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. **79**: 727-747.
- [16] Han X.H., Hong S.S., Hwang J.S., Lee M.K., Hwang B.Y., Ro J.S. (2007). Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives Pharmacol Research*. **30**: 07-13.
- [17] Chira K., Such J., Saucier C., Teissèdre L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Ed :Springer*. **6** :75-82.
- [18] Podsedek A., Wilska-Jeszka J., Anders B., Markowski J. (2000). Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*. **210**: 268-272.
- [19] Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. **04**: 162-169.
- [20] Crozier A. (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants" Diet and Health"*. *Ed. Goldberg*. pp: 27- 48.
- [21] Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **40**: 2379-2383.
- [22] Manach C. (1998). Biodisponibilité des flavonoïdes. Thèse: Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal.
- [23] Hakkinen S.H., Karenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkanen H.M., Torronen A.R.. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**:2274-2279.
- [24] Hertog M.G.L., Hollman P.C.H, Van de Putte B. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**: 1242-1246.
- [25] Arts I.C.W., Van de Putte B., Hollman P.C.H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 1746-1751.
- [26] Arts I.C.W, Van de Putte B., Hollman P.C.H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit juices and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 1752-1757.

- [27] Košir I-J., Lapornik B., Andrenšek S., Wondra A., Vrhovšek U et Kidric J. (2004). Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Analytica Chimica Acta* . **513**: 277-282.
- [28] Ribeiro M T., Waffo-Teguo P., Teissèdre PL. (1999). Determination of stilbenes (trans-astringin, cis and trans piceid, and cis and trans resvératrol) in portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**: 266-267.
- [29] Landrault N., Larrond F., Delaunay J.C. (2002). Levels of stilbenes oligomers and Asilbini French variety al wines and in grapes during noble rot developpement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 2406-2452.
- [30] Vitrac X., Bornet A., Vanderlinede R. (2005). Determination of stilbenes (Delta-vinif erin, trans-as tringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol.epsilon on niferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53** (14): 5664-5669.
- [31] Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard B., Ewert B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**: 4009-40017.
- [32] Fossen T., Andersen O.M., Ovstedal D.O., Pedersen A.T., Raknes A. (1996). Characteristic anthocyanin pattern from onions and other Allium spp. *Journal of Food Science* **61**: 703-706.
- [33] Micol V., Caturia N., Perez-Fons L., Mas V., Perez L. et Estepa A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia Rhadovirus (VHSV). *Antiviral Research*. **66**: 129-136.
- [34] Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M. et Sayadi S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food chemistry*. **108**: 253-262.
- [35] Erbay Z. et Icier F. (2009). Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. **91**: 533-541.
- [36] Long H.S., Tilney P.M. et Van Wyk B.-E. (2010). The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae). *South African Journal of Botany*. **76** (02): 167-420.
- [37] Silva S., Gomes L., Leitao F., Bronse M., Caelho A.V. et Boas V. (2010). Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grassasy Aceittes*. **61** (02): 157-164.
- [38] Briante R., Patumib M., Febbrion F. et Nuccia R. (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed hyperthermophilie B-glucosidase. *Journal of Biothechnology*. **111**(01): 67-77.

- [39] Aguilera-Carbo A., Augur C., Prado-Barragan L. A., Favela-Torres E., Aguilar C N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **78**: 189-199.
- [40] Paris M., Hurabeillen M. (1981). Abrégé de Matière médicale, pharmacognosie. *Ed: Masson*. 210-215.
- [41] Linden et Lorient D. (1994). Pigments et arômes .In : Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. *Ed : Masson*. 338-340.
- [42] Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**: 564-582.
- [43] O'Connell J.E., Fox P.F. (2001). Signification and applications of phénolic compounds in the production and quality of milk dairy products: a review. *International Dairy Journal*. **11**(3): 103-120.
- [44] Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod. Paris*. pp : 173-201.
- [45] Bruyne T., Pieters L., Deelstra H. et Vlietink A. (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*. **27**: 445-459.
- [46] Derbel S., Ghedira K. (2005). Phytothérapie et nutrition : Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*. **1**: 28-34.
- [47] Tessier F., Marconnet P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science et Sports*. **10**: 01-13.
- [48] Favier A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. **17**: 501-512.
- [49] Baudin B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio*. **2** (1): 43-52.
- [50] Aron P. M. et Kennedy J. A. (2008). Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*. **52**: 79-104.
- [51] Gilbert D.L., Colton C.A. (1999). Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach..., editors. New-York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 740 p.
- [52] Yoshikawa T., Shimoda H., Uemura T., Morikawa T., Kawahara Y., Matsuda H. (2000). Medicinal plant. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **8**: 2071-2077.

- [53] Halliwell B., Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*. **57**: 715S-725S.
- [54] Dangles O. (2012). Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*. **16** : 692-714.
- [55] Curtay J.-P. et Robin J.-M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*. 4p.
- [56] Spitteller G. (2006). Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology and Medicine*. **41**: 362-387.
- [57] Jahn U., Galano J.-M., Durand T. (2008). Beyond prostaglandins - chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathways from polyunsaturated fatty acids. *Angewandte Chemie International Edition*. **47**: 5894-5955.
- [58] Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*. **74** : 636–643.
- [59] Pincemail J., Degruene J., Voussure S., Malherbe C., Paquot N., Defraigne J.O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolique*. **21**: 66-75.
- [60] Irache M., J-M., Ezpeleta I. et Vega F. A. (1997). Phenolic antioxidants in margarines: Behaviour during storage. *Sciences des Aliments*. **17**: 95-105.
- [61] Sanchez-Alonso I., Jimenez-Escrig A., Saura-Calixto F, Borderias A. J. (2007). Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. *Food Chemistry*. **101**: 372-378.
- [62] Berset C., Cuvelier. M-E. (1997). Evaluer et prévenir l'oxydation des lipides. *Adria*. 4-13.
- [63] Yilmaz Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science and Technology*. **17**: 64-71.
- [64] Tappy L., Berger M.M., Schwarz J. M., Schneiter P., Kim S., Revelly J-P., Chioléro R. (2006). Metabolic effects of parenteral nutrition enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids in critically ill patients. *Clinical Nutrition*. **25** (4): 588–595.
- [65] Kishk Y.F.M., Al-Sayed H.M.A. (2007). Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT*. **40**: 270-277.

- [66] Linseisen J., Hoffmann J., Lienhard S., Jauch K-W., Wolfram G. (2000). Antioxidant status of surgical patients receiving TPN with an Ω -3-fatty acid-containing lipid emulsion supplemented with α -tocopherol. *Clinical Nutrition*. **19**(3): 177-184.
- [67] Schepens M.A., Roelofs H.M., Peters W-H., Wanten G.J. (2006). No evidence for oxidative stress in patients on home parenteral nutrition. *Clinical Nutrition*. **25**(6): 939 -948.
- [68] Ha T.J., Nihei K., Kubo I. (2004). Lipoxygenase inhibitory activity of octyl gallate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **52**: 3177–3181.
- [69] Kubo I., Masuoka N., Xiao P., Haraguchi H. (2002). Antioxidant activity of dodecyl gallate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **50**: 3533-3539.
- [70] Manach C., Scalbert A., Remesy C., Morand C. (2006). Consommation et disponibilité des polyphénols. In: Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado and V. Cheynier (Ed). Paris, Lavoisier. 361–380.
- [71] Spencer J.P.E., Abd El Mohsen M.M., Rice-Evans C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **423**: 148-161.
- [72] Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. **81**: 230S-242S.
- [73] Day A.J., Gee J.M., Dupont M.S., Johnson I.T., Williamson G. (2003). Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology*. **65**: 1199-1206.
- [74] Williamson G., Clifford M-N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*. **104**: S48-S66.
- [75] Gonthier M.P., Donovan J.L., Texier O., Felgines C., Remesy C., Scalbert A. (2003). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology and Medicine*. **35**: 837-844.
- [76] Stoupi S., Williamson G., Viton F., Barron D., King L.J., Brown J-E., Clifford M.N. (2010). *In vivo* bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [14C] procyanidin B2 in male rats. *Drug Metabolism and Disposition*. **38**(2): 287-291.
- [77] Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A., Galvano F., Gallo A., Scalfi L., Fogliano V. (2007). Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *Journal of Nutrition*. **137**: 2043-2048.

- [78] Lotito S-B., Frei B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*. **41**: 1727–1746.
- [79] Sies H. (2007). Total antioxidant capacity: Appraisal of a concept. *Journal of Nutrition*. **137**: 1493-1495.
- [80] Kawai Y., Nishikawa T., Shiba Y., Saito S., Murota K., Shibata N., Kobayashi M., Kanayama M., Uchida K., Terao J. (2008). Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries. Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *Journal of Biological Chemistry*. **283**: 9424-9434.
- [81] Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. **52**: 253-265.
- [82] Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemistry Society*. **116**: 4846-4851.
- [83] Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. **125**: 288-306.
- [84] Fiorucci S., Golebiowski J., Cabrol-Bass D., Antonczak S. (2007). DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **55**: 903-911.
- [85] Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. (2003). A quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **51**(3): 615-622.
- [86] Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Production*. **63**: 1035-1042.
- [87] Lucarini M., Mugnaini V., Pedulli G.F. (2002). Bond dissociation enthalpies of polyphenols: the importance of cooperative effects. *Journal of Organic Chemistry*. **67**: 928-931.
- [88] Luo Y-R. (2003). Handbook of bond dissociation energies in organic compounds. CRC Press: Boca Raton (USA).
- [89] Jovanovic S-V., Steenken S., Hara Y., Simic M-G. (1996). Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for the antioxidant activity? *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. **2**: 2497-2504.
- [90] Bors W., Michel C. (1999). Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radical Biology and Medicine*. **27**: 1413-1426.

- [91] Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**: 572-584.
- [92] Dangles O. (2006). Propriétés chimiques des polyphénols dans les polyphénols en agroalimentaire. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*. Lavoisier. 29-50.
- [93] Dangles O., Dufour C. (2008). Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. In Recent Advances in Polyphenol Research. *Blackwell Publishing: Oxford*. **01**: 67-87.
- [94] Havsteen B-H. (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. **96**: 67-202.
- [95] Nagao A., Seki M., Kobayashi H. (1999). Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63(10), 1787-1790.
- [96] Lin C., Chen C., Liang Y., Lin J. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **294**: 167-172.
- [97] Dangles O., Dufour C. (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Eds Andersen O. and Markham K. *CRC Press, Boca Raton*. **Chapter 9**: p 443-469.
- [98] Dangles O., Dufour C. (2008). Recent advances in Polyphenol Research. **Chapter 3**: 67-87.
- [99] Day A-J., Bao Y., Morgan M-R-A., Williamson G. (2000). Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine*. **29**: 1234-1243.
- [100] Fukumoto L-R., Mazza G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **48**: 3597-3604.
- [101] Aruoma O.I., Murcia A., Butler J., Halliwell B. (1993). Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **41**: 1880-1885.
- [102] Yen G.C., Duh P.D., Tsai H.L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Journal of Food Chemistry*. **79**(3): 307-313.
- [103] Kobayashi H. Oikawa S., Hirakawa K., Kawanishi S. (2004). Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutation Research*. **558**: 111-120.
- [104] Peters U., Poole C., Arab L. (2001). Does tea affect cardiovascular disease? A metaanalysis. *American Journal of Epidemiology*. **154**: 495-503.

- [105] Hollman P.C., Katan M.B. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. **37**: 937-942.
- [106] Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A *et al.* (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*. **76**: 560-568.
- [107] Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **45**: 287-306.
- [108] Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A *et al.* (2009). Flavonoids as antiinflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*. **58**: 537-552.
- [109] Umesalma S., Sudhandiran G. (2010). Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*. **107**: 650-655.
- [110] Lamartiniere C.A., Cotroneo M.S., Fritz W.A Wang J., Mentor-Marcel R., Elgavish A. (2002). Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *Journal of Nutrition*. **132** (3): 552S-558S.
- [111] Dembinska-Kiec A., Mykkänen O., Kiec-Wilk B., Mykkänen H. (2008). Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*. **99**: ES109-ES117.
- [112] Johnston K.L., Clifford M.N., Morgan L.M. (2003). Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal and Clinical Nutrition*. **78**: 728-733.
- [113] Bonina F.P., Leotta C., Scalia G., Puglia C. (2002). Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diabetes Nutrition and Metabolism*. **15**: 14-19.
- [114] Van Dam R.M., Feskens E.J. (2002). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. **360**: 1477-1478.
- [115] Salas-Salvado J., Fernandez-Ballart J., Ros E *et al.* (2008). Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Archives of Internal Medicine*. **168** (22): 2449-2458.
- [116] Karlsen A., Retterstol L., Laake P *et al.* (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of proinflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*. **137**: 1951-1954.

- [117] Nantz M.P., Rowe C.A., Nieves C.J *et al.* (2006). "Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate. *Journal of Nutrition*. **136**: 2606-2610.
- [118] Bengmark S. (2004). Acute and "chronic" phase reaction-a mother of disease. *Clinical Nutrition*. **23**: 1256-1266.
- [119] Hotamisligil G-S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. **444**: 860-867.
- [120] Gonzalez-Gallego J., Garcia-Mediavilla M.V., Sanchez-Campos S., Tunon M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*. **104**: S15-S27.
- [121] Santangelo C., Vari R., Scazzocchio B *et al.* (2007). Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. **43**(4): 394-405.
- [122] Spencer J.P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of the Nutrition Society*. **69**: 244-260.

PARTIE 1:

Extraction



*Enrichissement de l'huile d'olive
avec les polyphénols (Oleuropéine)
des feuilles d'olivier par application
des ultrasons*



Table des matières, Partie 1 : Extraction

Chapitre I: Ultrasons

I. Etat des connaissances.....	41
I.1. Ultrasons.....	42
I.1.1 Principe et mécanisme de la cavitation ultrasonore.....	42
I.1.2. Facteurs influençant la cavitation.....	45
I.2. Equipements de laboratoires et industriels.....	48
I.3. Applications des ultrasons.....	51
I.3.1. Ultrasons en technologie de transformation.....	51
I.3.2. Ultrasons en technologie de préservation.....	52
I.3.3. Ultrasons en technologies d'extraction.....	53
I.3.3.1. Extraction des huiles essentielles et des arômes.....	53
I.3.3.2. Extraction des antioxydants.....	55
I.4. Coût, investissement et impact environnemental.....	57
Références bibliographiques.....	58

Chapitre II: Enrichissement de l'huile d'olive

II. Introduction.....	61
II.1. Matériels et méthodes.....	64
II.1.1. Matériel végétal.....	64
II.1.2. Huile végétale.....	65
II.1.3. Procédures de l'extraction.....	65
II.1.4. Etude préliminaire.....	65
II.1.5. Macération assistée par ultrasons.....	66
II.1.6. Macération conventionnelle.....	67
II.1.7. Extraction des composés phénoliques des huiles.....	67
II.1.8. Quantification des polyphénols totaux.....	67
II.1.9. Plan d'expérience méthodologie et application.....	68
II.1.9.1. Méthodologie des plans d'expérience.....	68
II.1.9.1.1. Analyses statistiques.....	71
II.1.9.2. Application du plan d'expérience.....	72
II.1.10. Analyse en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).....	73

II.1.11. Etude cinétique.....	74
II.1.12. Dosage de α -tocophérols.....	74
II.1.13. Test de l'activité antiradicalaire.....	75
II.1.14. Détermination du taux de la fraction polaire totale.....	76
II.1.15. Evaluation de la couleur.....	77
II.1.16. Analyse sensorielle.....	78
II.1.17. Cytohistologie.....	78
II.2. Résultats et discussions.....	80
II.2.1. Etude préliminaire.....	80
II.2.2. Conditions optimales.....	80
II.2.2.1. Analyse de la variance.....	82
II.2.2.2. Analyse des surfaces de réponse.....	83
II.2.3. Comparaison des méthodes d'extractions: EAU et EC.....	85
II.2.4. Histochimie.....	88
II.2.5. Activité antioxydante.....	90
II.2.6. Dosage des α -tocophérol.....	92
II.2.7. Enrichissement de l'huile et test de friture.....	92
II.2.8. Evaluation de la couleur.....	93
II.2.9. Analyse sensorielle.....	94
II.2.10. Etude de l'extraction à l'échelle pilote et essais industriels.....	95
Conclusion.....	97
Références bibliographiques.....	99

Chapitre I: Ultrasons



I. Etat des connaissances

Les techniques conventionnelles d'extraction ou d'isolation de composés chimiques de matrices végétales présentent souvent des contraintes telles que celles des faibles rendements, des temps d'extraction très longs et d'utilisation de grandes quantités de solvants. Ces dernières années de nombreuses techniques alternatives ayant pour but de pallier à ces problèmes se sont développées. Parmi elles émergent les micro-ondes, les fluides supercritiques et les ultrasons. Les contraintes écologiques et l'émergence de la sécurité alimentaire et industrielle, incitent les professionnels à découvrir de nouvelles applications aux technologies innovantes. Toutes visent une performance accrue et un meilleur respect de l'environnement.

Les ultrasons de puissance sont maintenant bien connus pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps des procédés industriels. En effet la cavitation induite par les ultrasons de faibles fréquences dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations du rendement, notamment dans le cas de l'extraction solide-liquide [1].

L'olivier (*Olea europaea L.*) est l'un des arbres les plus importants dans les pays Méditerranéens, sa culture couvre environ 8 millions d'ha et représente environ 98% de la récolte mondiale. La production de l'huile d'olive est devenue une des activités essentielles dans l'agriculture de cette région. Ceci démontre sa grande importance économique et sociale, ainsi que les avantages possibles de l'utilisation de ses co-produits (huile, fruits et feuilles) [2].

L'huile d'olive est le produit Méditerranéen par excellence. On la retrouve à travers l'histoire, depuis la civilisation grecque jusqu'à nos jours, et représente la principale source de matières grasses. Ce type de régime a souvent été associé à une meilleure résistance à certaines maladies: cardio-vasculaires et dégénératives [3-6]. Si l'huile d'olive est un produit intéressant d'un point de vue nutritionnel, c'est tout d'abord pour sa composition en acides gras, sensibles au phénomène d'oxydation, et ses composés minoritaires tels que les polyphénols [7]. Ces antioxydants sont présents en faible quantité, puisque $\approx 98\%$ de ses composés phénoliques sont perdus lors du procédé de fabrication. Ces pertes sont dues d'une part à leur faible affinité pour la fraction lipidique [8], mais aussi aux procédés de blanchiment appliqués aux olives avant le broyage et le pressurage. L'oxydation des lipides d'huile d'olive est considérée comme l'une des réactions majeures correspondantes à la

dégradation de sa qualité organoleptique et nutritionnelle [9]. Ainsi la lutte contre l'oxydation de cette huile au cours de la transformation technologique, du stockage et de la distribution s'impose. Parmi les diverses solutions possibles, l'addition d'agents antioxydants aux huiles et aux aliments riches en lipides [10], est pratiquée depuis fort longtemps. Toutefois, les antioxydants synthétiques (BHT et BHA) présentent une sérieuse menace pour la santé [11, 12]. L'ampleur de ce problème a fait que des antioxydants naturels deviennent de plus en plus recommandés. Dans cette démarche, la stabilisation des huiles végétales (huile d'olive, tournesol, soja...etc.) [10], a fait l'objet de nombreuses recherches, ayant opté pour l'enrichissement de ces huiles à base de matrices végétales (organ, feuilles d'olivier...etc.) [13-15]. L'inconvénient de ces suppléments pratiqués en général par macération est qu'elles sont longues et nécessitent des zones de stockage importantes. Dans cette présente étude un enrichissement assistée par ultrasons a été testé, afin de réduire ce temps et de faciliter sa mise en place pour les professionnels de l'huile d'olive.

Les ultrasons ont de nombreuses applications potentielles dans le domaine de l'agroalimentaire comme dans le domaine de la nutraceutique. Si de nombreuses études ont déjà été menées sur leurs effets, il reste beaucoup de secteurs à développer car les champs d'application des ultrasons ne sont pas encore pleinement explorés.

I.1. Ultrasons

I.1.1 Principe et mécanisme de la cavitation ultrasonore

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui sont capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz) (**Fig. I.1**). Les ultrasons peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leurs fréquences [16]:

- **Ultrasons de diagnostic:** Ces ultrasons sont aussi appelés ultrasons de basse intensité ou de haute fréquence (2 à 10 MHz). Les ultrasons constituent une méthode non destructive d'évaluation de propriétés physico-chimiques ou mécaniques, de mesures de concentrations, de mesures de niveaux, etc. Les applications sont nombreuses dans le domaine médical comme outil de diagnostic et de contrôle car leur utilisation est simple, efficace et autorise une visualisation en temps réels des organes comme le cœur sans effet ionisant ni destructif [16].

- **Ultrasons de puissance:** Aussi appelés ultrasons de haute intensité ou de basse fréquence (20 kHz à 100 kHz). Ils sont appliqués à des domaines industriels variés comme le nettoyage des surfaces, la production d'émulsion, l'accélération de réactions chimiques en milieu hétérogène ou l'extraction d'arômes. Contrairement aux ultrasons de diagnostic, ces ultrasons sont capables de générer des bulles de cavitation [16].

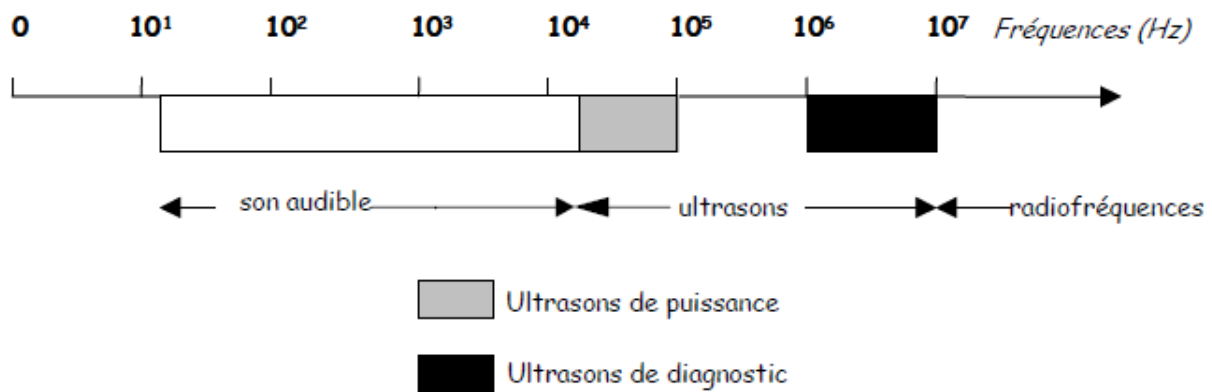


Figure I.1 : Domaines d'utilisation des Ultrasons en fonction de la fréquence

Plusieurs effets peuvent être attribués à l'utilisation des ultrasons de puissance tels que le déplacement des molécules de liquide autour de leur point d'équilibre ou les déplacements convectifs appelés vents ultrasonores. Lorsque des ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation de zones de compression et de dépression (**Fig. I.2**). Les séries de compressions et de raréfactions générées lorsque l'onde sonore traverse le milieu créent une pression acoustique (P_a) dans le milieu définie comme suit [1]:

$$P_a = P_A \sin 2\pi f t \quad \text{Eq. 1}$$

Où

P_A : Amplitude maximale de la pression de l'onde sonore;

f : Fréquence des ultrasons; t : temps

L'amplitude de la pression de l'onde est directement liée à l'intensité de celle-ci (I). Cette intensité est définie comme l'énergie transmise par seconde et par mètre carré de liquide et est définie comme suit :

$$I = P_A^2 / 2\rho c \quad \text{Eq. 2}$$

Avec : ρ : Densité du milieu et c : Vitesse du son dans le milieu d'étude

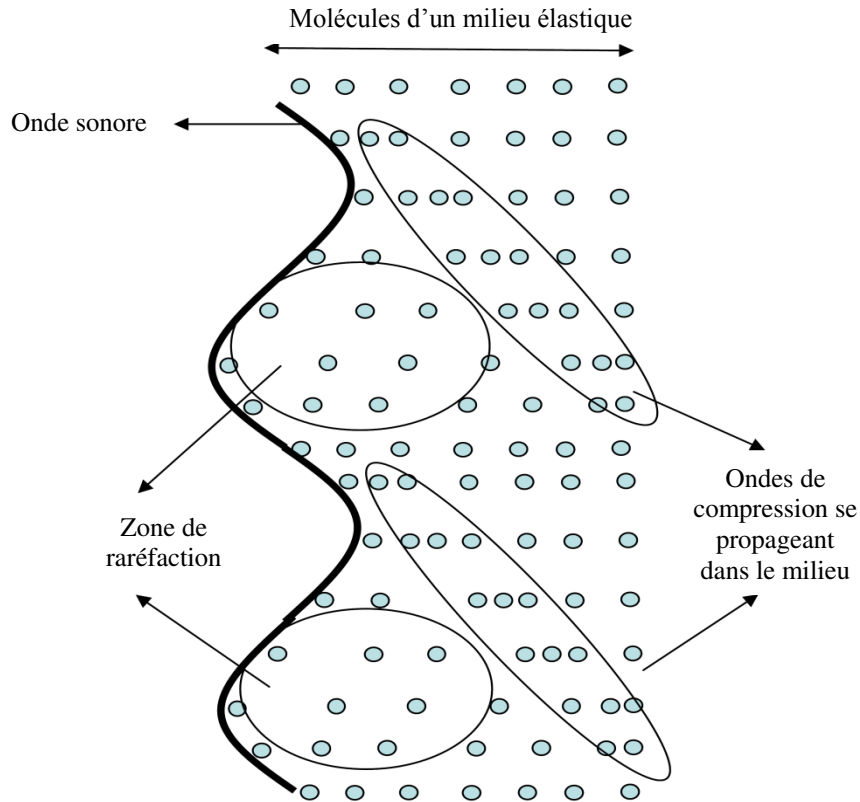


Figure I.2 : Propagation de l'onde sonore dans un milieu [1]

La pression acoustique est positive pendant les cycles de compression et négative pendant les cycles de raréfaction. Ces variations de pression entre phases de compression et de raréfaction impliquent des mouvements moléculaires induisant des distensions et des rapprochements entre des groupes de molécules. Lors de cycles de raréfaction la distance d augmente (**Fig. I.3**) [1].

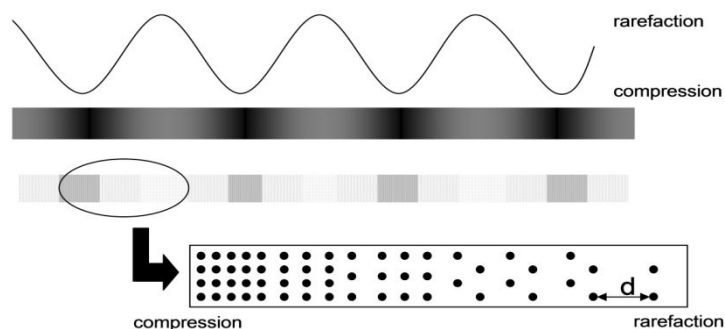


Figure I.3 : Cycles de compression et de raréfaction induits par une onde sonore

Chaque milieu liquide a une distance moléculaire critique (distance critique d sur la figure I.3) : au-dessous de cette distance le liquide reste intact, mais au-dessus de ce seuil caractéristique, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de

cavitation contenant de la vapeur du liquide et des gaz dissous apparaissent. Ce phénomène, appelé cavitation, a été étudié de manière théorique et expérimentale. **Neppiras** et **Noltingk** [17], ont initié la théorie du point chaud selon laquelle l'implosion d'une bulle de cavitation génère des valeurs locales de température et de pression très élevées (milliers de degrés Kelvin et milliers de kPa). Cette théorie a ensuite été reprise par **Suslick** et **Price** [18]. Le comportement des bulles dépend de leur taille et de la nature du champ ultrasonore local qui détermine leur stabilité ou leur implosion.

I.1.2. Facteurs influençant la cavitation

- **Présence de gaz dissous** : Les bulles de cavitation peuvent être constituées de vapeur du liquide dans lequel elles sont générées. La cavitation prend naissance à partir des noyaux qui sont constitués par les occlusions gazeuses au sein du liquide. La présence de gaz dissous favorisera donc le phénomène de cavitation [1].

- **Pression du milieu** : Les bulles de cavitation peuvent être générées lorsque la pression appliquée au milieu (P_L) descend au-dessous de la tension de vapeur de ce liquide (P_v). La pression appliquée au milieu quand celui-ci est soumis aux ultrasons peut être calculée comme étant la somme de la pression hydrostatique (P_h) et de la pression acoustique (Eq. 3). Par conséquent la cavitation sera possible dans le liquide si la tension de vapeur du liquide est supérieure à la somme de la pression hydrostatique et la pression acoustique (Eq. 4). Cela signifie que plus la pression appliquée au milieu sera élevée, plus il sera difficile de provoquer de la cavitation. En effet, pour la provoquer, il faudra augmenter la pression acoustique et donc augmenter l'intensité des ultrasons [1].

$$P_L = P_h + P_a \quad [\text{Eq. 3}]$$

$$P_v > P_h + P_a \text{ ou } P_a > P_h - P_v \quad [\text{Eq. 4}]$$

- **Intensité des ultrasons** : Comme décrit dans l'équation 2, il y a une relation directe entre l'intensité des ultrasons et l'amplitude de la pression de l'onde sonore qui est-elle corrélée à la pression acoustique (Eq. 1). La pression acoustique étant un paramètre clé dans la génération des ultrasons, plus l'intensité des ultrasons sera élevée plus facilement la cavitation pourra se faire [1].

- **Fréquence des ultrasons** : Les fréquences les plus couramment utilisées sont entre 20 et 40 kHz. De plus haute fréquences rendent plus difficile la cavitation. En effet, les bulles de cavitation ont besoin d'un petit laps de temps pour être générées pendant la phase de raréfaction. Plus la fréquence est élevée, plus les phases de raréfaction sont courtes donc moins la bulle a de chance d'être créée. C'est la raison pour laquelle les ultrasons de haute fréquence sont dits non destructeurs ; la fréquence est trop élevée pour pouvoir permettre la cavitation [1].

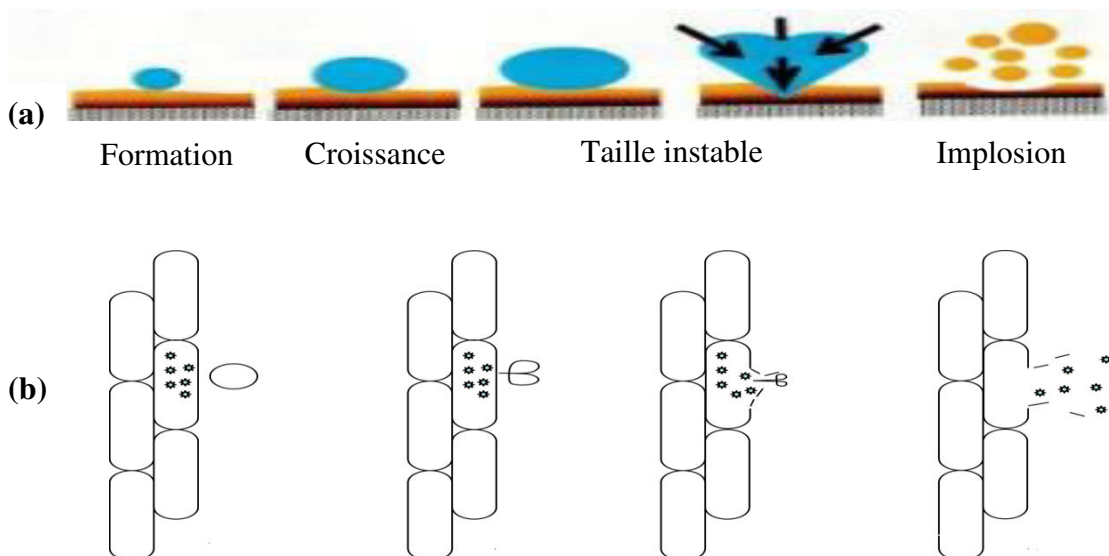
- **Température** : L'importance de ce paramètre est difficile à évaluer, car elle modifie la viscosité du milieu et la pression de vapeur saturante ce qui peut influencer la capacité de cavitation du milieu d'étude. Plus l'on se rapproche du point d'ébullition du liquide, plus les bulles de cavitation vont être générées facilement, mais elles perdent leur capacité d'implosion, c'est pourquoi la majorité des réactions sonochimiques sont favorisées par de faibles températures [1].

- **Impuretés** : Chaque impureté présente dans le liquide ou à la surface de la verrerie utilisée peut agir comme un nouveau site de cavitation. En effet, des gaz peuvent être emprisonnés dans les interstices des impuretés et les dépressions générées par les cycles de raréfaction vont déloger ces gaz de l'impureté et constituer un nouveau noyau de cavitation [1].

Les différentes conditions expérimentales vont produire différents types de bulles de cavitation. Certaines sont dites stables, les autres sont dites transitoires. Les bulles transitoires n'existent que pendant quelques cycles acoustiques avant d'imploser violemment. Sachant que la durée de vie de telles bulles est trop faible pour observer un transfert de matière par diffusion de gaz vers l'intérieur ou l'extérieur de la bulle, leur implosion ne se trouve pas amortie et procède d'une grande violence. Selon Mason et Lorimer [19], on peut ainsi atteindre des températures voisines de 5000 K et des pressions de l'ordre de 1000 atmosphères (**Tab. I**). Les bulles de cavitation stables sont des bulles de gaz et de vapeur qui oscillent de manière non linéaire autour d'une taille de pseudo-équilibre pendant plusieurs nombre de cycles. A chaque cycle, leur volume augmente car le bilan des échanges entre les phases de désorption et de condensation (entrée dans la bulle) et celles d'absorption et de vaporisation (sortie de la bulle) est positif. La bulle implose alors lorsqu'elle atteint une taille critique. Cette implosion est moins violente car elle est amortie par les gaz présents et les températures atteintes alors se situent aux alentours de 1800 K [20].

Tableau I : Caractéristiques et effets des ultrasons selon le type de cavitation induit [20]

Type de cavitation	Stable	Transitoire
Intensité	1 à 3 W/cm ²	> 10 W/cm ²
Type d'oscillations	faibles et autour de l'équilibre	Fortes
Cycle	plusieurs cycles	1 à 2 cycles
Durée de vie des bulles	Longue	Courte
Phénomène local	simple diffusion gaz/liquide mais risque de résonance	températures et pression très élevées
Nature de la bulle	gaz résiduel ou vapeur du liquide environnant	vapeur du liquide seulement
Effet	à court terme : dégazage à long terme : mélange	violents : érosion, émulsification, sonochimie, sonoluminescence

**Figure I.4** : Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide (a) et d'une cellule végétale (b) [1]

Les ultrasons ont des actions mécaniques et physiques, notamment lors de l'explosion des bulles de cavitation. La présence d'un obstacle adjacent provoque la perte de symétrie du système par rapport à une implosion au sein de la solution (**Fig. I.4**). Le principal effet physique et mécanique des ultrasons est alors la production de micro-jets dirigés vers une surface solide lors de l'implosion des bulles de cavitation. Ces micro-jets peuvent atteindre

des vitesses considérables (plus de 120 m/s) et ils pourraient avoir une influence prépondérante dans les effets induits par la cavitation et dans l'augmentation de l'agitation à l'interface obstacle/milieu réactionnel. En plus de leurs effets mécaniques et physiques, les ultrasons produisent des effets chimiques qui résultent également du phénomène de cavitation. Lorsqu'une solution aqueuse est soumise aux ultrasons, des radicaux libres peuvent être générés et initier des réactions en chaînes. Ces entités peuvent ensuite réagir avec des espèces en solution ou se recombiner pour former de l'hydrogène, de l'eau oxygénée ou d'autres radicaux. Si la nature des espèces chimiques est fortement dépendante des gaz dissous, la fréquence influence considérablement la cinétique de réactions [1].

I.2. Equipements de laboratoires et industriels

Deux types d'équipements sont couramment utilisés dans les laboratoires. Le premier est le bac à ultrasons qui est peu onéreux et trouve de nombreuses applications pour la préparation d'échantillons, l'homogénéisation, la dispersion, le dégazage et le nettoyage (**Fig. I.5**). Il génère des fréquences comprises entre 25 et 50 kHz et des puissances acoustiques de 1 à 5 W.cm⁻². Ce type d'instrumentation possède l'avantage d'être simple à utiliser mais nécessite l'emploi d'un contenant pour le mélange à traiter qui va agir comme amortisseur de l'effet des ultrasons qui ne pourront agir que de manière indirecte [21].

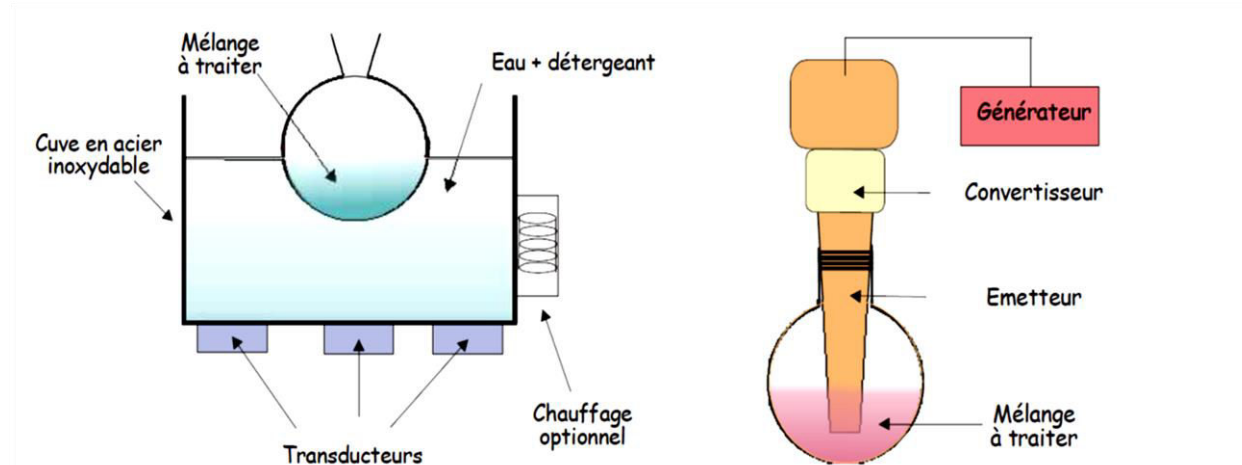


Figure I.5 : Schéma des dispositifs à ultrasons: bac et sonde

Le second appareillage est la sonde à ultrasons. A la différence du bac, elle permet une irradiation directe du milieu tout en générant des puissances acoustiques nettement supérieures (100 fois plus élevées). Cependant, son utilisation reste seulement adaptée au traitement de petits volumes de liquide et une attention particulière doit être portée à ce type

de manipulation car l'échantillon peut subir une augmentation rapide de température. Le couplage de ces deux types d'appareillage à des systèmes de pompes permet un travail en mode continu car cela favorise la circulation ininterrompue de solvant «frais» à travers l'échantillon soumis aux ultrasons [21].

Les systèmes industriels sont communément utilisés en combinaison avec des cuves tampon de grande capacité et des pompes (traitement en ligne) ou mode en batch avec des cuves équipées. Ces dernières sont utilisées depuis quelques années pour l'extraction de composés aromatiques de végétaux afin d'accélérer la macération.

Une gamme de nouveaux appareillages a été développée par la société REUS (France) (**Fig. I.6**). Celle-ci va de l'équipement de laboratoire (0,5 à 3 L) à des modèles industriels (1000 L) en passant par des modèles pilotes (30 et 50 L) (**Fig. I.7, I.8**). L'appareillage de laboratoire génère une puissance ultrasonore d'environ 1 W/cm², la fréquence d'utilisation est de 25 kHz. Les autres spécificités de ce réacteur sont de posséder un système de double enveloppe permettant de thermostatier le système et la possibilité de travailler directement dans le réacteur induisant l'application directe des ultrasons sur le mélange réactionnel [21].



(A)



(B)

Figure I.6 : Réacteurs de laboratoire d'extraction assistée par ultrasons: (A) batch (Reus-www.etsreus.com) et (B) continu (Hielscher – www.hielscher.com)



(A)



(B)

Figure I.7 : Equipements industriels d'extraction par ultrasons à l'échelle pilote (cuve de 50 L), (A) enbatch (Reus - www.etsreus.com) et (B) en continu (Hielscher- www.hielscher.com)



Figure I.8 : Dispositifs d'extraction par ultrasons (2 X 500 L), l'échelle industrielle pour produits liquides et solides permettant l'extraction semi continue (Reus-www.etsreus.com)

I.3. Applications des ultrasons

La diversité des appareillages et des actions des ultrasons permet une large gamme d'applications. Dans le domaine de l'agroalimentaire celles-ci peuvent être de l'ordre de la transformation, de l'extraction ou encore de la préservation des produits alimentaires [22].

I.3.1. Ultrasons en technologie de transformation

Les ultrasons de puissance génèrent d'intenses forces de pression et de cisaillement ainsi que des forts gradients de température dans le milieu traité. Cette action physique intense des ultrasons permet de déstructurer la matière et/ou induire des réactions chimiques ou biochimiques. L'énergie ultrasonore résultante peut ainsi améliorer les transferts de chaleur, de matière ou bien de quantité de mouvement. Dans de nombreuses applications, la technologie des ultrasons possède des avantages considérables par rapport aux autres technologies conventionnelles. Les ultrasons améliorent le rendement réactionnel, les qualités organoleptiques ainsi que les propriétés visuelles du produit agroalimentaire final destiné à la consommation humaine [21]. Plusieurs exemples de transformation des aliments assistés par ultrasons sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Applications des ultrasons dans les technologies de transformation [21]

Procédé	Méthode Conventionnelle	Principe des Ultrasons	Apport des ultrasons	Produits
Découpage	Lames et couteaux	Phénomène de la Cavitation	Gain de temps, pas de perte de matière, découpe précise, répétitive	Produits fragiles, hétérogènes
Marinage	Bain de saumure	Les vibrations ultrasoniques facilitent le transfert en saumure uniformément repartidans le produit	Gain de temps, gain de matière, amélioration du transfert dematière	Légumes, viande et Poisson
Séchage/déshydratation	Atomisation, Air chaud, Congélation	Les vibrations permettent un transfert de chaleur uniforme au sein du produit	Gain de temps, amélioration des qualités organoleptiques	Aliments déshydratés (fruits, Végétaux)
Emulsification	Agitation mécanique	Le phénomène de cavitation réduit le diamètre des gouttes	Stabilité des émulsions, gain de temps	Tout type d'émulsion (mayonnaise)
Filtration	Filtres à membrane semi-perméable	Vibration ultrasoniques au contact des fibres	Gain de temps, amélioration de la filtration	Tout type de liquide (jus de fruit...)

Un exemple d'application est la filtration ; elle est utilisée dans l'agroalimentaire pour enlever les particules solides contenues dans un liquide comme c'est le cas dans les jus de fruits. Deux produits en découlent : le rétentat (constituant la partie retenue par la membrane) et le filtrat (partie filtrée). Cependant, les filtres sont souvent obstrués au bout d'une certaine durée d'utilisation et nécessitent d'être changés régulièrement. Les ultrasons améliorent considérablement la filtration et permettent d'augmenter la durée d'utilisation des filtres. Le phénomène de la filtration assistée par les ultrasons est basé sur la libération rapide des pores du filtre en évitant l'agglomération des fines particules. Les vibrations ultrasonores permettent au rétentat d'être partiellement en suspension au-dessus du filtre, ainsi les pores ne sont pas obstrués (**Fig. I.9**). Les rendements de la filtration assistée par ultrasons sont élevés par rapport à la filtration conventionnelle [23].

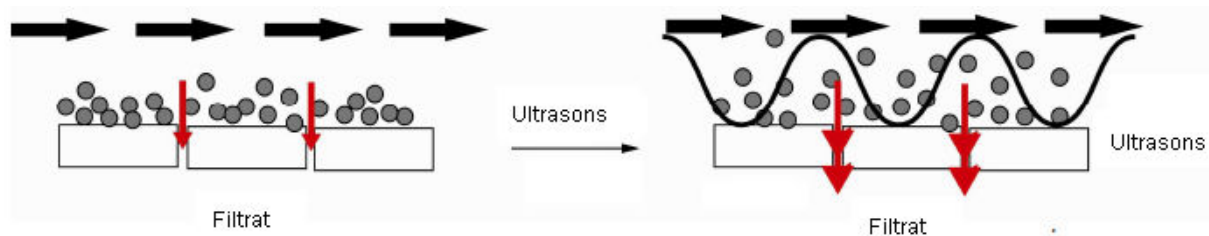


Figure I.9 : Avantage de la filtration assistée par ultrasons

1.3.2. Ultrasons en technologie de préservation

Il existe plusieurs exemples de microorganismes inactivés par ultrasons et étudiés dans des milieux de cultures de laboratoire et au sein de modèles alimentaires. Les cellules bactériennes ont chacune des sensibilités différentes aux traitements ultrasoniques. De manière générale, les plus grandes cellules sont plus sensibles aux ultrasons. Cela est peut-être dû au fait que les grandes cellules ont une plus grande surface les rendant plus vulnérables aux fortes pressions produites pendant la cavitation acoustique. Les cellules Gram positifs paraissent être plus résistantes que les Gram négatifs ; cela est peut être dû à la structure de la paroi cellulaire. Les cellules Gram positifs ont des parois plus épaisses qui procurent à la cellule une certaine protection contre le traitement ultrasonique [23]. La cavitation produit de fortes températures et pressions localisées qui désintègrent toutes les cellules biologiques et/ou dénaturent toute enzyme présente. L'implosion des bulles produit des forces de cisaillement et des jets de liquides dans le milieu qui pourraient avoir suffisamment d'énergie pour endommager physiquement les parois cellulaires. L'inactivation par ultrasons a aussi été attribuée à la génération de cavitation intracellulaire pouvant perturber la structure cellulaire et les composants fonctionnels jusqu'à atteindre la lyse cellulaire [24] (**Fig. I.10**).

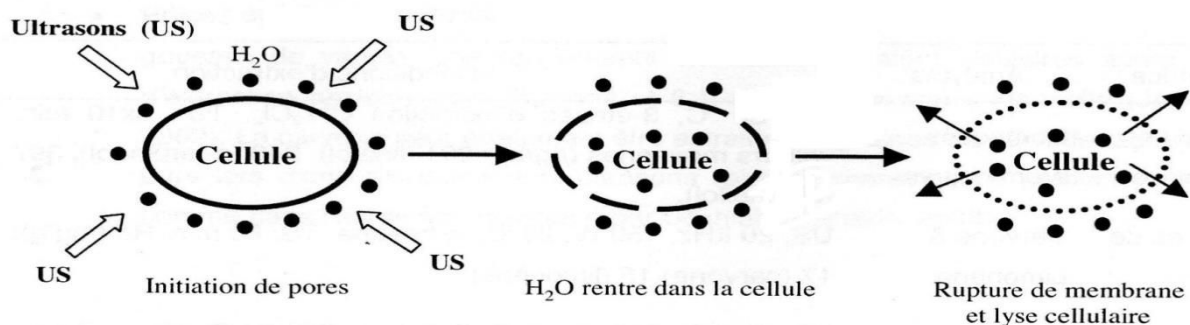


Figure I.10 : Mécanisme de dommage cellulaire par ultrasons

I.3.3. Ultrasons en technologies d'extraction

L'utilisation des ultrasons pour l'extraction sur les matrices végétales ou alimentaires est un nouvel outil permettant d'augmenter les rendements ou/et d'accélérer les cinétiques d'extraction. Ces améliorations peuvent être attribuées à l'amélioration de la diffusion des substances dissoutes de l'intérieur de la cellule vers le milieu d'extraction. Les premières applications ont été liées à la détermination des métaux dans les aliments. Les applications couvrent aujourd'hui l'extraction de nombreux autres composés comme les arômes, les antioxydants, les huiles et les colorants [25].

I.3.3.1. Extraction des huiles essentielles et des arômes

Les arômes et senteurs sont des mélanges complexes de composés volatiles qui sont généralement présents en faible concentration dans les plantes aromatiques. Ces concentrations sont variables en fonction de la plante considérée et de la partie de la plante (fleur, feuille, tige, racine...). Les techniques conventionnelles d'extraction de molécules aromatiques sont souvent longues et posent un réel problème pour l'extraction de molécules thermosensibles puisque le plus souvent ces extractions se font par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur. En plus d'être longues et destructives pour les molécules sensibles, ces techniques sont également coûteuses car il faut porter puis maintenir à ébullition de grands volumes d'eau pendant de longues périodes. La technologie ultrasonore permet de pallier à certains de ces problèmes et est par conséquent de plus en plus utilisée [24] (Tab. III).

Tableau III : Extraction assistée par ultrasons de saveurs et arômes [24]

Matrice	Analytes	Conditions d'extraction
Brandy et vin rouge	Composés aromatiques	US, 20 °C, 3-étapes d'extraction CH ₂ Cl ₂ . TS : 3x10 min. Valeurs moyennes (µg/L) : 291 (linalol), 248 (α-terpinéol), 397 (citronellol).
Graines de carvi	Carvone & Limonène	US, 20 kHz, 150 W, 20 °C, <i>n</i> -hexane. TS: 60 min. Rd (mg/g): 17 (carvone) 16 (limonène).
Vanille	Vanilline	US, 20 kHz, 750 W, 25 °C, EtOH or EtOH/H ₂ O. TS: 1 - 2 min
Safran	Safranal	US, 35 kHz, 25 °C, H ₂ O: Et ₂ O. TS: 5x10 min. Rd : Safranal entre 40.7 and 647.7 mg/100g safran
Miel	Composés aromatiques	US, 25 °C, H ₂ O, <i>n</i> -pentane : Et ₂ O, TS : 2x10 min.
Moût de vin	Composés Aromatiques	US, 48 kHz, 20 °C, 3-étapes d'extraction avec CH ₂ Cl ₂ . TS : 3x10 min

Vin et spiritueux: L'extraction assistée par ultrasons des composés aromatiques du vin a été comparée à l'extraction en phase solide et en immersion en phase solide. L'extraction par ultrasons a permis de meilleurs rendements en un temps réduit et 37 composés aromatiques ont pu être quantifiés dans le vin grâce à cette technique [26, 27].

Huile essentielle: l'extraction assistée par ultrasons a été utilisée sur de nombreuses variétés de plantes aromatiques telles que les feuilles de menthe, l'artémise ou la lavande. Les rendements en huile essentielle ont pu être légèrement augmentés pour l'artémise et la menthe (12 % pour ce dernier), quant à la lavande, des quantités deux à trois fois supérieures ont été obtenues par utilisation des ultrasons. Le second avantage des ultrasons pour l'extraction de l'huile essentielle est le fait de travailler à froid, ce qui réduit la dégradation des composés volatils. Cet aspect est très intéressant pour les secteurs de la nutraceutique et de l'agroalimentaire car dans les deux cas des huiles très pures sont nécessaires [28-30].

Epices: concernant les épices on peut citer l'extraction de vanilline à partir de gousses de vanille. Les rendements en vanilline étaient similaires après 1 h d'extraction assistée par ultrasons et 8 h d'extraction conventionnelle [31]. La carvone peut également être extraite des graines de carvi de façon plus pure lors d'une extraction aux ultrasons (pas de présence de matières grasses comme dans l'extraction classique par Soxhlet) [32].

1.3.3.2. Extraction des antioxydants

Les fruits et légumes sont riches en antioxydants et sont par conséquent intéressants dans un but nutritionnel mais ils peuvent aussi bien l'être dans un but de préservation des aliments. Dans l'industrie agroalimentaire, de plus en plus d'attention est portée au recyclage des coproduits, eux-mêmes source intéressante d'antioxydants. Comme pour les arômes, l'extraction assistée par ultrasons des antioxydants peut être un outil avantageux dans le but d'optimiser le rendement et la pureté des extraits (**Tab. IV**)

Tableau IV: Extraction assistée par ultrasons d'antioxydants [24]

Matrice	Analytes	Conditions d'extraction
Peaux de citron	Composés phénoliques	Bain US, 60kHz, 15 et 40°C dans méthanol. Plus gran des quantités avec US, les basses températures permettent un meilleur rendement.
Noix de coco	Composés phénoliques	Bain US, 25 kHz, 150 W, 30°C. 22.44 mg de composés phénoliques extraits par gramme de noix de coco
Raisin et pépins de raisin	Acides tartarique et malique	Sonde US, 24 kHz, 200 W, 70°C. 194.3 ppm d'acide tartarique et 37.4 ppm d'acide malique. US plus efficaces sur pépins que sur le fruit
Feuille d'olivier	Oleuropéine	Sonde US, 20 kHz, 450 W, 40°C. Même quantité d'oleuropéine après 25 min d'extraction par US que 24h par method conventionnelle
Fraise	Composés Phénoliques	Sonde US, 20 kHz, 100 W. Même efficacité en 2 min que 20 h par technique conventionnelle ou 3h au CO ₂ supercritique
Framboise	Anthocyanes	Sonde US, 22 kHz, 650 W, 40°C. Même rendement après 200 sec avec US que 53 min par méthode conventionnelle
Romarin	Acide carnosique	Sonde et bain US, 20 kHz, 50°C. 15mg d'acide carnosique par gramme de feuille. Réduction de la dépendance au solvant d'extraction
Tomate	Lycopène	Bain US, 40 kHz, 300 W. 90% du lycopène total extrait en 29 min, amélioration avec couplage micro-ondes
Son de blé	Composés Phénoliques	Bain US, 40 kHz, 250 W, 60°C. 3.12 mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

Fruits et légumes : grâce à la richesse en antioxydants de ces matrices, de nombreux essais ont été menés sur différentes plantes et différentes parties de chaque plante. L'extraction assistée par ultrasons permet notamment de réduire considérablement le temps d'extraction des antioxydants. C'est le cas pour l'extraction du lycopène de la tomate, des anthocyanes de la framboise (3 min comparé à 53min) ou encore pour les composés phénoliques de la fraise (2 min comparé à 20 h) [33-35]. L'action des ultrasons peut différer en fonction de la partie de la plante étudiée, ainsi ils sont plus intéressants pour extraire des composés des pépins de raisin que sur le fruit entier [36]. Les ultrasons permettent une meilleure diffusion du solvant dans les pépins ce qui augmente l'extraction de l'acide malique et de l'acide tartrique.

Feuilles : les antioxydants ne sont pas simplement présents dans les fruits, mais ils peuvent également être présents dans les feuilles des plantes aromatiques ou encore dans les feuilles de certains arbres. L'une des plantes les plus étudiées est le romarin, à la fois pour ses propriétés organoleptiques et pour son activité antioxydante. Les ultrasons permettent non seulement d'augmenter le rendement de l'extraction mais rend celle-ci moins dépendante du solvant: on peut donc obtenir les mêmes extraits en utilisant des solvants moins dangereux pour l'environnement lorsque l'on utilise des ultrasons [37]. L'oleuropéine peut également être extraite des feuilles d'olivier et l'utilisation des ultrasons permet d'obtenir le même rendement en 25 minutes qu'après 24 h de macération classique [38].

Divers : les coproduits de l'industrie des jus de fruits ne sont pas seulement intéressants pour leur richesse en huiles essentielles, mais des composés phénoliques peuvent aussi être extraits des peaux d'agrumes [39]. Dans cette étude, les ultrasons ont permis de réduire le temps d'extraction et l'augmentation de la quantité de polyphénols extraits, qui due aux plus faibles températures d'extraction utilisées. Cette température est particulièrement intéressante lors de l'extraction des antioxydants car ces molécules sont thermosensibles. D'autres bons rendements d'extraction de composés phénoliques ont été enregistrés dans la coque de noix de coco et de son de blé [40, 41].

I.4. Coût, investissement et impact environnemental

En général, un procédé d'extraction assisté par ultrasons possède un optimum compris entre 15 et 30 minutes de traitement à température ambiante, alors que les extractions conventionnelles (macération, distillation...) sont très longues et/ou réalisées à la température d'ébullition de solvant pendant plusieurs heures. Pour un réacteur de 1 litre, la consommation énergétique de l'extraction conventionnelle est de 5 kilo Watt heure, alors que l'extraction assistée par ultrasons ne nécessite que 0.25 kW h. Les essais ont été réalisés à l'aide d'un Wattmètre à l'entrée du système de chauffage pour l'extraction conventionnelle et 106 à l'entrée du générateur à ultrasons pour l'extraction assistée par ultrasons. Ceci se répercute directement sur l'impact environnemental du procédé. Alors que le procédé d'extraction par US ne dégage que 200 g de CO₂ dans l'atmosphère, le procédé conventionnel en rejette plus de 4000 g de CO₂. Ceci a été calculé selon la règle que pour obtenir un kWh d'électricité, il faut brûler soit du gaz naturel, du pétrole ou du charbon, et ça en résulte un dégagement de 800 g de CO₂. Les prix des réacteurs à ultrasons industriels varient entre 7000 euros (3 litres) et 200 000 euros (1000 litres). Le choix dans un réacteur à ultrasons n'induit que 25% d'investissement en plus par rapport à un réacteur conventionnel. Mais si on prend en compte les temps du procédé qui sont divisés par un facteur allant de 10 à 100, et une diminution énergétique et de pollution d'un facteur de 10, les procédés assistés par ultrasons ont un coût de production bien inférieure par rapport aux procédés conventionnels [21, 24].

Références bibliographiques

- [1] Veillet S., Tomao V., Chemat F. (2009). Ultrasound Assisted Extraction of aromas and antioxidants. in F. Chemat (Ed) Essential oil and aromas green extractions and applications. *Handbook New Delhi Inde*.
- [2] Giron M.V., Ruiz-Jimenez J., Luque de Castro M.D. (2009). Dependence of fatty-acid composition of edible oils on their enrichment in olive phenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 2797-2802.
- [3] Keys A., Keys M. (1975). How to Eat Well and Stay Well, the Mediterranean Way. *Garden City: Doubleday and Co.* p 325.
- [4] Keys A., Aravanis C., Van Buchem H. *et al.* (1981). The diet and all causes death rate in the seven countries study. *Lancet*. **2**: 58-61.
- [5] Gerber M. (1994). Olive oil and cancer. In: Hill *et al.* Epidemiology of Diet and Cancer. *Chichester Ellis Horwood*. 263-275.
- [6] Ghedira K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie*. **6**: 83-89.
- [7] Petruccioli M., Servili M., Montedero G.F., Federici F. (1988). Development of a recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process. *Biotechnology Letters*. **1**: 55-60.
- [8] Hamdi M., Garcia J.L., Ellouz R. (1992). Integrated biological process for olive mill wastewaters treatment. *Bioprocess Engineering*. **8**: 79-10.
- [9] Kubow S. (1990). Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Science and Technology*. 67-71.
- [10] Gertz C., Klostermann S., Kochhar S.P., (2000). Testing and comparing oxidative stability of vegetable oil and fats at frying temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **102**: 543-551.
- [11] Farag R.S., El-Baroty G.S., Amany-Basuny M. (2003). The influence of phenolic extracts obtained from the olive plants (cvs. Picual and Kronakii) on the stability of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology*. **38**: 81-87.
- [12] Farag R.S., Mahmoud E.A et Basuny A.M. (2007). Use crud olive leaf as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil heating. *International Journal of Food Science and Technology*. **42**(1): 107-115.
- [13] Warner K. (2002). Chemistry of frying fats. In: Akoh C., Min D.B. Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. *New York: Marcel Dekker*. 167-180.

- [14] Artajo L. S., Romero M.P., Morello J.R. , Motilva M.J. (2006). Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **54**: 6079-6088
- [15] Salta F.N., Mylona A., Chiou A., Boskou G., Andrikopoulos N.K. (2007). Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and Technology International*. **13** :413-421.
- [16] Pétrier, C., Gondrexon N., Boldo P. (2008). Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur AF6310*. 1-14.
- [17] Noltingk B. E., et Neppiras E. A. (1950). Cavitation produced by Ultrasonics. *Proceeding of the Physical Society. Section B*. **63**(9): 674-685.
- [18] Suslick K.S., Price G.J. (1999). Application of ultrasound to materials chemistry. *Annual Review on Material Science*. **29**: 295-326.
- [19] Mason T. J. et Lorimer J. P. (2002). Applied Sonochemistry. *Wiley-VCH*. Weinheim, Allemagne.
- [20] Flynn H. (1975). Cavitation dynamics. Free pulsation and models for cavitation bubbles. *Journal of Acoustic Society of America*. **58**: 1160-1170.
- [21] Chemat F. (2011). Eco-extraction du végétal Procédés innovants et solvants alternatifs. *Collection Technique et Ingénierie. Dunod*. 90-118.
- [22] Mason T.J., Paniwnik L., Chemat F. (2003). Ultrasound as a preservation technique. In Food preservation techniques. Zeuthen P., Bogh-Sorensen L. *CRC Press*. Cambridge, Grande Bretagne.
- [23] Mason T.J., Vian M., Chemat F. (2010). Ultrasonic processing. In Alternatives to Conventional Food Processing. *Proctor A. RSC*. London, Grande Bretagne.
- [24] Chemat F., Tomao V., Virot M. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handbook of Food analysis Instruments*. 85-103.
- [25] Chemat F. (2009). Essential oils: green extraction and applications. *Handbook New Delhi Inde*.
- [26] Pena M. R., Barciela J., Herrero C. et Garcia-Martin S. (2005). Comparison of ultrasound-assisted extraction and direct immersion solid-phase microextraction methods for the analysis of monoterpenoids in wine. *Talanta*. **67** (1): 129-135.
- [27] Cabredo-Pinillos S., Cedron-Fernandez T., Gonzalez-Briongos M., Puente-Pascual L. et Saenz-Barrio C. (2006). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method. *Talanta*. **69** (5): 1123-1129.

- [28] Shotipruk A., Kaufman P.B. et Wang H.Y. (2001). Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha x piperata* using ultrasonic extraction. *Biotechnology progress*. **17**(5): 924-928.
- [29] Asfaw N., Licence P., Novitskii A.A. et Poliakoff M. (2005). Green chemistry in Ethiopia: the cleaner extraction of essential oils from *Artemisia afra*: a comparison of clean technology with conventional methodology. *Green Chemistry*. **7** (5): 352-356.
- [30] Da Porto C., Decorti D., Kikic I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*. **12** (4): 1072-1078.
- [31] Jadhav D., Rekha B.N., Gogate P. R., Rathod V. K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Food Engineering*. **93** (4): 421-426.
- [32] Kanakis C.D., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. (2004). Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexane-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **52** (14): 4515-4521.
- [33] Herrera M.C., Luque de Castro M.D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. **1100**(1): 1-7.
- [34] Chen F., Sun Y., Zhao G., Liao X., Hu X., Wu J., Wang Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*. **14** (6): 767-778.
- [35] Liangfu Z., Zelong L. (2008). Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry*. **15**(5): 731-737.
- [36] Palma M., Barroso C.G. (2002). Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analitica Chimica Acta*. **458**(1): 119-130.
- [37] Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. **11** (34): 261-265.
- [38] Japon-Lujan R., Luque-Rodriguez J.M., Luque de Castro M.D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*. **1108** (1): 76-82.

- [39] Ma Y.Q., Chen J.C., Liu D.H., Ye X.Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. **16**(1): 57-62.
- [40] Rodrigues S., Pinto G.A.S., Fernandes F.A.N. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*cocosnucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. **15** (1): 95-100.
- [41] Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y., Li X. (2008). Optimisation of ultrasounds-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*. **106**(2): 804-810.

Chapitre II:

Exemple d'application des ultrasons



Enrichissement de l'huile d'olive



II. Introduction

Le profil des habitants des pays Méditerranéens est caractérisé par un allongement de l'espérance de vie avec moins de risque pour les maladies chroniques [1]. En effet des études épidémiologiques suggèrent que le régime alimentaire et le mode de vie de ces populations, sont liés à la réduction de l'incidence du cancer, du diabète et des maladies cardiovasculaires (pathologies dégénératives associées au stress oxydant) [1, 2]. L'huile d'olive est généralement la principale source de lipides dans cette région, utilisée à des fins culinaires, cosmétiques et médicales.

Les effets nutritionnels et thérapeutiques de l'huile d'olive ont été principalement attribués à son profil adéquat en acides gras (98% du poids total d'huile) et à ses composants mineurs, métabolites secondaires, (2% du poids total d'huile) notamment les composés phénoliques (phénols simples et leurs acylglucosides, flavonoïdes) [3]. Il y a un grand intérêt pour la supplémentation des huiles végétales en antioxydants naturels, afin d'inhiber l'oxydation et de préserver les qualités nutritionnelles et sensorielles [4].

Les feuilles d'olivier, largement utilisées dans la médecine traditionnelle du terroir méditerranéen (par exemple, à lutter contre l'hypertension) [5], constituent une source riche en composés phénoliques (oleuropéine, verbascoside, l'apigénine-7-glucoside, lutéoline-7-glucoside, etc) [6]. Ces substances interviennent dans la protection contre l'attaque des radicaux libres et peuvent agir par différents mécanismes (antioxydant, signalisation) [4]. En outre, les feuilles d'olivier sont considérées comme l'un des plus abondant sous-produits de l'industrie d'huile d'olive (10% du poids total des olives) [4, 5] et peuvent être utilisées en tant que source pas cher de composés phénoliques à haute valeur ajoutée.

L'oleuropéine est présente en quantité importante dans les feuilles d'olivier (60-90 mg/g de matière sèche) [7], mais seulement à l'état de traces dans l'huile d'olive (de l'ordre de partie par million) [6]. Dans le végétal, il a été montré que ce composé s'accumule essentiellement dans les poils foliaires et les cuticules, où ils assurent une résistance face au stress abiotique (dommages d'irradiation) et biotique (pathogènes) [8, 9]. Ce secoiridoïde est généralement extrait des feuilles d'olivier par la méthode conventionnelle (EC), réalisée par macération avec des solvants organiques tels que le méthanol ou l'hexane [10].

L'enrichissement des huiles comestibles avec les polyphénols des feuilles d'olivier, peut être effectué de trois manières différentes: la première est de faire une extraction au solvant avant d'ajouter l'extrait à l'huile (extraction liquide-liquide) [11]. La deuxième méthode dans laquelle l'extrait purifié et séché, est partiellement dissout dans l'huile (extraction solide-liquide) [6]. La troisième est la combinaison de ces deux types d'extraction.

Le premier enrichissement direct de l'huile d'olive, avec les feuilles d'olivier par une extraction assistée aux ultrasons (EAU) en continu, a été développé en 2008 par Luque de Castro et ses collaborateurs [6]. L'EAU est maintenant une technique bien connue et très utilisée dans les laboratoires. En effet les ultrasons ont été appliqués pour améliorer la cinétique d'extraction des produits naturels à partir du matériel végétal, essentiellement par le phénomène de cavitation. L'effet mécanique des ultrasons permet l'accélération et la libération des principes bioactifs du végétal, via la perturbation des parois cellulaires et l'intensification du transfert de masse [12].

Le présent travail propose une application de la méthode de Luque de Castro [6], comme une procédure décrite à l'échelle du laboratoire à amplifier à l'échelle semi-pilote et pilote industriel. Ainsi le procédé a été changé en un système statique ou batch qui est le plus utilisé au sein des petites entreprises traditionnelles de la région Méditerranéenne. Nous appliquons cette méthode d'enrichissement direct d'huile d'olive avec de feuilles d'olivier avec le système en batch (3 L), qui permet la mise en œuvre à l'échelle semi pilote (30 L), et une éventuelle utilisation du produit obtenu en tant que « novel food » riche en antioxydants. Afin de mieux cerner cet objectif, plusieurs tests ont été réalisés : l'activité antiradicalaire de l'huile d'olive enrichie (test DPPH[•]), la stabilité à l'autoxydation des lipides (test de chauffage), l'analyse sensorielle, enfin l'évaluation de la couleur. Cette étude a été également complétée par des analyses histochimiques pour montrer l'efficacité des ultrasons dans l'altération des structures de la feuille contenant les polyphénols.

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Matériel végétal

Les feuilles d'olivier (*Olea europaea*) ont été récoltées au niveau de l'Institut Technique d'Arboriculture Fruitière de Takrietz (I.T.A.F), Wilaya de Bejaia, en Mars 2010.

Certains facteurs ont été pris en considération lors du prélèvement des échantillons :

- La récolte a été effectuée dans Les différentes directions (Est, ouest, nord, sud) ;
- Les feuilles sont prélevées du coté intérieur (moins exposé au soleil), et du coté extérieur (plus exposé au soleil) de l'arbre.

Après identification botanique de la plante, un herbier est déposé au niveau du laboratoire 3BS de l'université de Béjaia. Les deux échantillons étudiés ont été photographiés (voir la figure ci-dessous).



Figure II.1: Arbre d'olivier (*Olea europaea L*) (a) et feuilles et fruits d'olivier (b)

a- Prétraitements du matériel végétal

- Séchage, broyage et tamisage

Après lavage des feuilles récoltées, afin de les débarrasser de la poussière et d'autres impuretés, elles sont aussitôt séchées dans une étuve à 40°C [13], jusqu'à obtenir une masse constante. La température de 40°C permet de préserver de la dégradation des substances thermolabiles telles que les polyphénols et les vitamines [14].

Une fois séchées, les feuilles subissent un broyage à l'aide d'un broyeur électrique de marque « IKA A11 BASIC », jusqu'à obtention d'une poudre fine [15]. Cette dernière a été tamisée à l'aide d'un tamiseur électrique de marque (RETCHE), contenant des tamis de

différentes granulométries, (500, 250, 125 et 63 μ m). Les poudres ainsi obtenues sont conservées dans des récipients scellés et stockées à l'abri de la lumière.

II.1.2. Huile végétale

L'huile d'olive vierge, utilisée dans notre travail est fournie par IeS Labo, Oraison (France). C'est un jus obtenu par des moyens exclusivement mécaniques (pression), à partir du fruit de l'olivier (*Olea europaea* L).

II.1.3. Procédures de l'extraction

Un des objectifs spécifique de notre étude, est l'optimisation de l'enrichissement de l'huile d'olive vierge avec des polyphénols des feuilles d'*Olea europaea* L par deux méthodes :

- 1- Macération conventionnelle;
- 2- Macération assistée par ultrasons.

A cet égard et avant d'avoir recours à un plan d'expérience, des études préliminaires ont été menées.

II.1.4. Etude préliminaire

Une étude préliminaire a été effectuée pour déterminer le rapport optimal solide-liquide (feuille d'olivier - huile), qui sera appliqué dans le reste des investigations. L'effet de la charge des feuilles d'olivier, utilisées pour l'enrichissement de l'huile d'olive vierge, a été réalisé comme suit (**Fig. II.2**) :

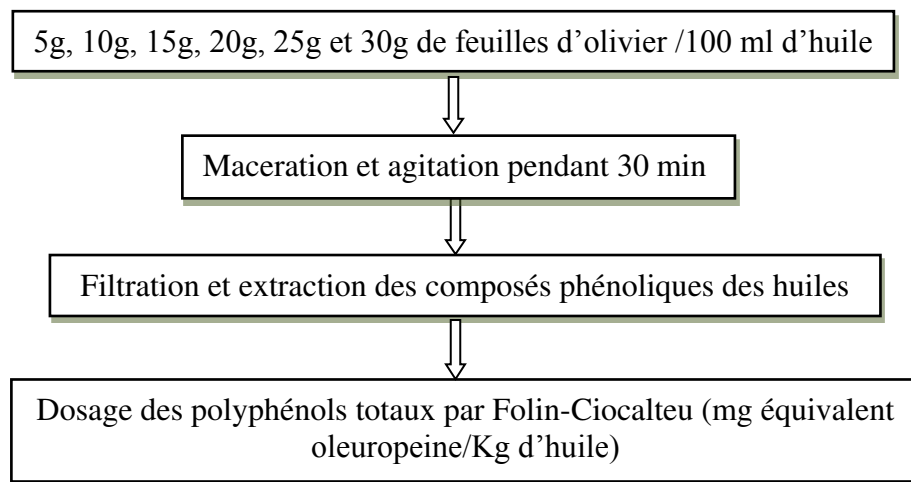


Figure II.2 : Optimisation du rapport feuille d'*Olea europaea* L / huile d'olive.

II.1.5. Macération assistée par ultrasons

150g des feuilles d'olivier (séchées et broyées), ont été introduites dans 1L d'huile d'olive vierge, comme solvant, dans un bac à ultrasons de 3L (**Tab. V**, **Fig. II.3**) durant 45min. L'homogénéisation du mélange a été assurée par un agitateur à hélice (50mm de diamètre et 225 tpm) pour toutes les expériences. Le mélange ainsi obtenu est filtré par un filtre à café afin d'éliminer les traces des feuilles. Tous les essais d'extraction ont été triplés, sauf pour le plan d'expérience.

Tableau V : Description de l'appareil de sonication (bac à ultrason 3L)

Caractéristiques du bac à ultrasons de 3L
- Un réacteur aux ultrasons PEX3 (R.E.U.S., Contes, France) ;
- Un bac en inox 23-13,7cm en dimensions interne d'une capacité maximale de 3L;
- Un transducteur d'une surface de 25 cm ² ;
- Une double enveloppe, qui contrôle de la température du milieu, avec un système de refroidissement et chauffage ;
- Une fréquence de 25 kHz et une puissance de 150 W (sortie du générateur) ;
- La puissance dissipée dans le milieu est 60W, telle qu'elle est mesurée par Calorimétrie [16]

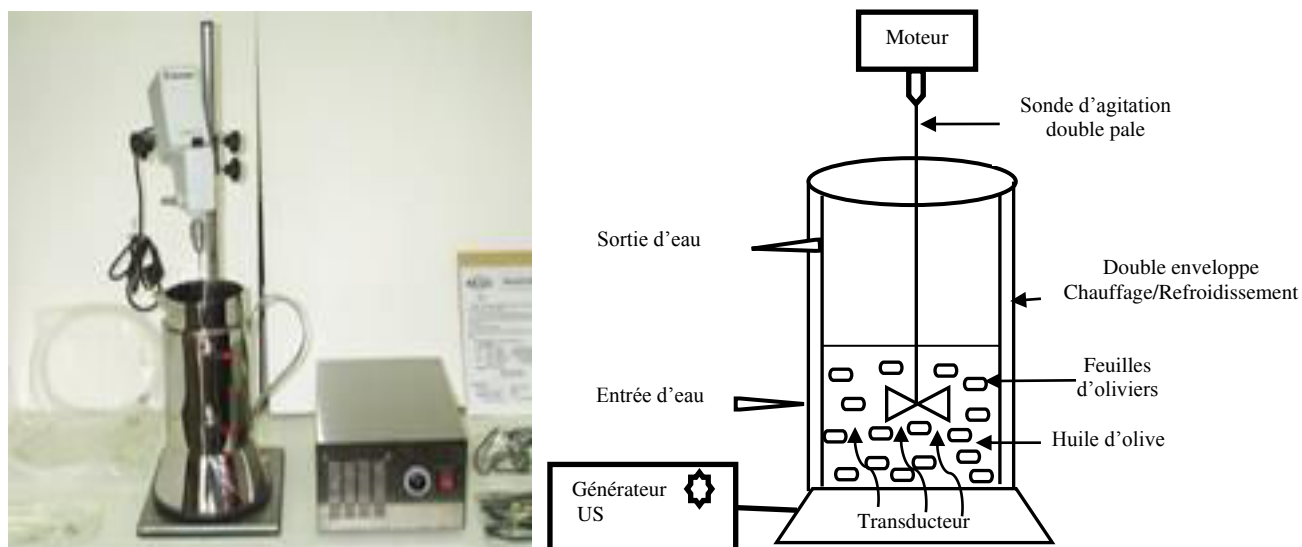


Figure II.3 : Bac à ultrason de laboratoire de 3L (R.E.U.S)

II.1.6. Macération conventionnelle

La méthode conventionnelle, utilisée pour la comparaison [6, 17], a été réalisée dans les mêmes conditions sans application des ultrasons ; 150g des feuilles d'olivier (séchées et broyées), ont été ajoutées à 1L d'huile d'olive vierge dans le réacteur à ultrasons pendant 45min sous agitation.

II.1.7. Extraction des composés phénoliques des huiles

Pour extraire les polyphénols à partir des huiles végétales étudiées (brutes et enrichies), nous avons opté pour le protocole de **Tsimidou *et al.*** [18], c'est une extraction liquide-liquide (**Fig. II.4**).

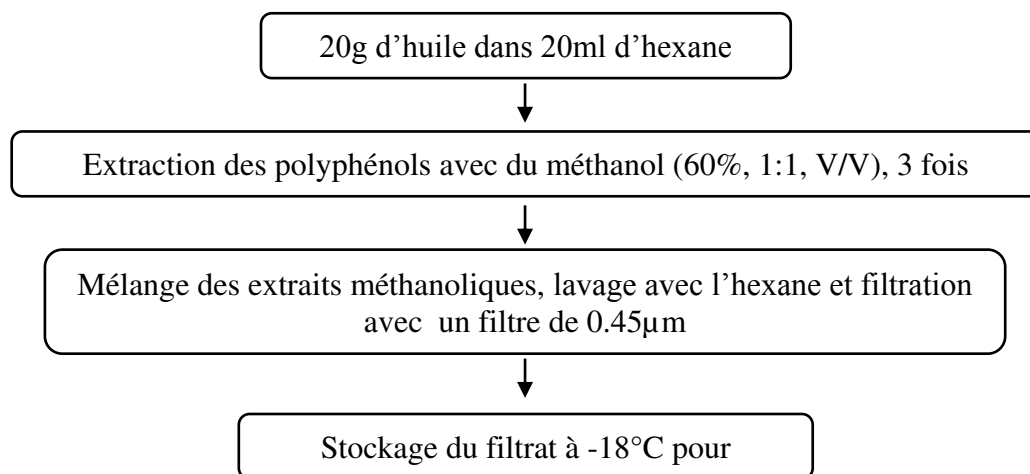


Figure II.4 : Procédé d'extraction des composés phénoliques des huiles végétales [18]

II.1.8. Quantification des polyphénols totaux

L'estimation quantitative des polyphénols, est réalisée à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu [19], mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 760 nm. Elle est proportionnelle aux taux de composés phénoliques [20]. Cette analyse a été réalisée à l'aide de kits de dosages de polyphénols de chez Isitec-lab (Montauban, France) selon le mode opératoire précisé dans le tableau VI [21].

La concentration en composés phénoliques totaux de chaque extrait est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec l'oléuropeine (Annexe 1).

Tableau VI : Mode opératoire pour l'utilisation du kit du dosage des polyphénols

	Blanc	Etalon	Echantillon
Eau distillée	0.1ml		
Etalon (3g/L)		0.1 ml	
Echantillon			0.1ml
Chromogène	2ml	2ml	
Mélanger et attendre 1 minute à température ambiante			
Tampon	1.00 ml	1.00ml	1.00ml
Placer les échantillons à l'abri de la lumière pendant 30 minutes Mesurer l'absorbance à 750 nm			

II.1.9. Plan d'expérience méthodologie et application

II.1.9.1. Méthodologie des plans d'expérience

La méthodologie des plans d'expérience repose sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux, ayant pour but d'obtenir divers renseignements sur les effets des paramètres impliqués sur un critère d'optimisation. De manière classique, la méthodologie consiste à fixer tous les paramètres et à n'en faire varier qu'un, tout en observant une réponse investiguée (critère d'optimisation). Ceci peut représenter un nombre d'essais considérable augmentant de façon quasi-exponentielle avec le nombre de facteurs (variables impliquées dans le modèle étudié) et de niveaux (états distincts pouvant prendre chaque facteur) impliqués. Ainsi, pour trois facteurs testés à cinq niveaux différents, il serait nécessaire de réaliser 53 (= 125) expériences différentes de manière à étudier la totalité du domaine expérimental. Cette étude semble être inconcevable en laboratoire et encore moins au niveau industriel à cause de l'investissement matériel et financier qu'il implique. Les analyses multivariées trouvent ici tout leur intérêt ; elles vont permettre de réduire le nombre d'expériences nécessaires à l'étude de façon importante tout en offrant une complète exploration du domaine expérimental étudié sans pour autant nuire à la précision des résultats.

De nombreuses informations utiles, comme l'influence des variables, les interactions entre les facteurs ou les paramètres optimums pourront ainsi être définis. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés aux relations qui unissent variables et variable

réponse avec pour but final, de modéliser mathématiquement les réponses étudiées et de les optimiser. Ainsi, nous avons choisi de travailler avec une procédure expérimentale de type Box-Wilson [22, 23] plus communément appelée plan composite centré. Cette étude multivariée va permettre d'utiliser la méthodologie des surfaces de réponses et de modéliser ainsi un phénomène ou une réponse étudiée sous la forme d'une équation polynomiale du 2nd degré. Cette méthode expérimentale propose des prédictions de haute qualité et présente l'avantage d'estimer un modèle courbe, et non linéaire, avec précision.

Des surfaces de réponses permettront de déterminer les différentes réponses possibles à l'aide du modèle estimé. Cependant ce modèle reste limité par le nombre de facteurs pouvant être étudiés [23] et nécessite donc une étude préliminaire permettant de cibler les variables les plus influentes. Cette étude multivariée est basée sur un plan factoriel complet à deux niveaux auquel on aura ajouté des niveaux supplémentaires au centre et à l'extérieur du domaine expérimental. Le domaine expérimental étudié pourra être représenté sous la forme d'un carré lorsque deux facteurs sont sollicités, ou encore sous la forme d'un cube lorsque trois facteurs seront investigués. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes appliqués à la réalisation d'un plan composite centré à 3 variables et 5 niveaux pouvant être représentés graphiquement sous la forme d'un cube. La distribution des différents points expérimentaux impliqués dans le modèle peut être illustrée sur la Figure II.5. L'examen de la figure, permet de mettre en évidence la structure du cube divisée en plusieurs zones expérimentales :

- Un plan factoriel complet à deux niveaux (codés ± 1) : $NF = 2^3$ expériences réalisées aux coins du cube. Ce plan permet de former la base du plan composite à partir de trois variables codées à leurs niveaux hauts et bas.
- Des répétitions au centre du domaine expérimental (codées 0) : $Nc =$ nombre d'expériences qui peut être fonction de l'expérimentateur. Ces expériences permettent d'évaluer la répétabilité des essais.
- Des « points étoile » (codés $\pm \alpha$) : $Na = 2 \times 3$ expériences axiales ou étoiles réalisées sur les axes des facteurs du cube à une distance α du centre du domaine. Ces points expérimentaux permettront de définir les paramètres quadratiques du modèle mathématique (effet pouvant impliquer la courbure des surfaces de réponses). La valeur de α est calculée de manière à obtenir une isovariance par rotation. Ainsi, les réponses calculées avec le modèle issu du plan

composite centré (PCC) auront une erreur de prévision identique pour tous les points équidistants du centre du domaine expérimental. Autrement dit, les points étoile représentent ici une sphère circonscrite à un cube, permettant ainsi une répartition homogène de l'erreur de prévision. Ainsi, pour notre étude, nous aurons :

$$\alpha = \pm \sqrt[4]{(N_F)} = \pm (2^3)^{1/4} = \pm 1,6818$$

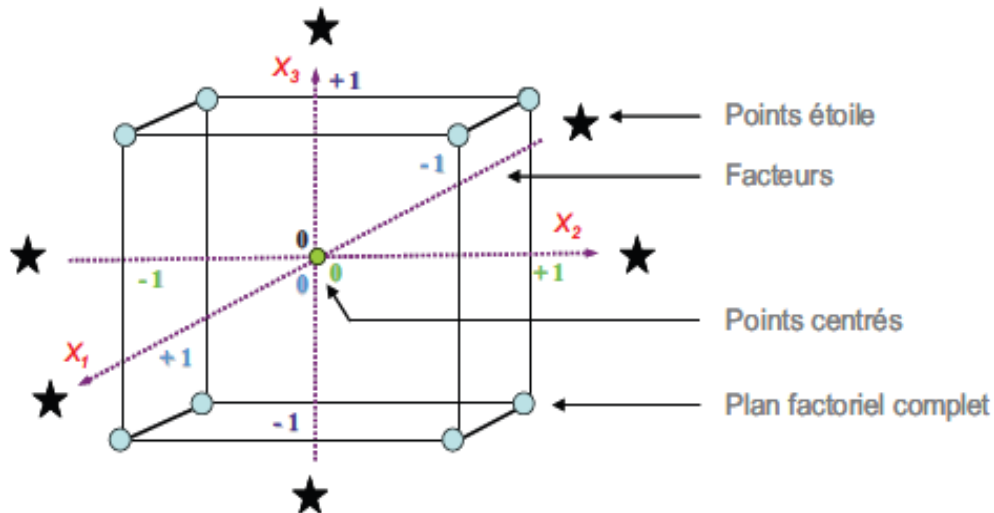


Figure II.5 : Représentation graphique de la distribution virtuelle des points expérimentaux intervenant dans le PCC

Au niveau du plan expérimental, $N_{exp} = N_F + N_c + N_a = 8 + 6 + 6 = 20$ expériences représentées dans le tableau VII. Ainsi, 20 expériences seront réalisées de manière à pouvoir estimer le modèle mathématique de la réponse investiguée. On aura en résumé, 8 expériences représentant un plan factoriel complet à trois facteurs et deux niveaux, 6 points expérimentaux réalisés au centre du domaine expérimental et enfin 6 expériences réalisées à l'extérieur du domaine expérimental. Ces expériences sont représentées en variables codées sur le tableau VII de façon ordonnée en fonction de trois facteurs différents.

Tableau VII : Description des 20 expériences (exprimées en variables codées) intervenant dans le PCC

No.	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

9	-1,6818	0	0
10	1,6818	0	0
11	0	-1,6818	0
12	0	1,6818	0
13	0	0	-1,6818
14	0	0	1,6818

15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

II.1.9.1.1. Analyses statistiques

Les diverses réponses, analyses de données et interprétations seront réalisées en utilisant un logiciel informatique de plans d'expériences statistiques: Statgraphics Plus 2000 (Statgraphics, Manugistics, Rockville, USA). La méthodologie des surfaces de réponses va permettre de modéliser les réponses étudiées sous la forme d'une équation polynomiale du second degré présentée ci-après :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (01)$$

Où :

- Y représente la réponse ou critère d'optimisation étudié (rendement, acides gras...);
- β_0 représente la moyenne des réponses obtenues aux répliques du centre du domaine expérimental ;

- n représente le nombre de variables impliquées dans le modèle ;
- $\beta_{i,j}$ sont des constantes représentant les coefficients de régression du modèle mathématique adopté, ils ne sont pas connus et seront déterminés grâce à l'étude des résultats expérimentaux ;
- X_i illustre les variables opératoires impliquées dans le modèle mathématique, X représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur afin de réaliser un essai ;
- ε représente l'erreur expérimentale.

Le logiciel statistique concédera la réalisation de différentes opérations fondées sur l'analyse de la variance permettant, *in fine*, de proposer un modèle polynomial comme présenté ci-dessus (01). Cette analyse de la variance concédera la détermination des divers coefficients de régression du modèle mathématique et permettra d'évaluer si une variable quantitative est significativement influente ou non. L'analyse de la variance consiste à tester une hypothèse nulle (les moyennes sont égales entre elles) contre l'hypothèse alternative (au moins une moyenne différente). Le principe est alors de comparer la variance de diverses répétitions d'un échantillon à la variance des moyennes entre tous les échantillons [24, 25]. Le rapport entre ces deux variances est appelé ratio- F . cette valeur est comparée à une table statistique permettant l'acceptation ou le rejet de l'hypothèse nulle de départ. Pour chacun des paramètres, la significativité des effets linéaires, quadratiques et des interactions intervenant entre les variables est ainsi testée puis représentée sur un diagramme de Pareto. Ces tests permettront de juger de la pertinence des variables et de modéliser au final la réponse étudiée sous la forme d'un modèle polynomial du 2nd degré [25, 26]. L'adéquation du modèle par rapport aux mesures expérimentales pourra être exprimée à l'aide d'un coefficient de détermination R^2 (le modèle sera d'autant plus adapté que la valeur de R^2 sera proche de 1). Enfin, le modèle mathématique pourra être représenté graphiquement à l'aide de surfaces de réponses permettant de visualiser l'évolution de la variable réponse étudiée, ainsi que les zones où elle est maximale, en fonction des effets des facteurs.

II.1.9.2. Application du plan d'expérience

L'optimisation et l'évaluation de la performance de l'enrichissement assisté par ultrasons ont été exécutés à l'aide d'une méthodologie expérimentale statistique. Après avoir achevé une étude préliminaire, trois variables ont été retenues comme pertinentes. Ces

paramètres opératoires ont pu être étudiés à l'aide d'un plan composite centré et sont définis ci-après :

- Le temps de sonication requis pour effectuer l'étape d'extraction (d'enrichissement),
- la puissance ultrasonore appliquée,
- La température nécessaire pour effectuer l'étape d'enrichissement.

Les variables codées appliquées aux valeurs naturelles des trois variables du plan composite centré sont représentées sur le tableau VIII. Ces paramètres ont été étudiés de manière à optimiser diverses réponses :

- Le taux des polyphénols totaux de l'huile,
- La concentration en oléuropeine,
- La composition de l'huile de manière à évaluer l'impact des variables sur les composantes de l'huile d'olive en hydroxytyrosol et tyrosol.

Tableau VIII : Variables naturelles et codées appliquées aux facteurs investigués

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Puissance (W)	19	27	39	52	60
Température (°C)	16	25	38	51	60
Temps (min)	05	15	30	45	55

II.1.10. Analyse en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Ces dosages ont été réalisés sur une CLHP Waters (Mildford, MA, USA), équipée d'une pompe « Model 600 » et d'un contrôleur de gradient « Model 600 », auxquels sont connectés un injecteur automatique « Model 717 » et un détecteur à barrette de photodiodes « Model 996 ». Le volume de solution étalon ou de solution test injecté est de 20 μ l. Toutes les analyses ont été traitées par le logiciel Empower (Waters).

La séparation des composés phénoliques a été réalisée sur une colonne Purospher Star C18e (250 x 4,6 mm) de 5 μ m avec une pré-colonne Purospher Star C18e (Merck, Allemagne). Le système de solvants utilisés était un gradient de A (eau/ acide formique 0,5 %) et B (Acétonitrile), avec les gradients cités dans le tableau IX.

Tableau IX : Gradient de solvants pour le dosage des phénols par CLHP

Temps (min)	Débit (ml/min)	% A	% B
0	1	95	5
25	1	65	35
30	1	65	35
35	1	0	100

La détection UV-visible a été faite sur la gamme de 200 à 800 nm avec une résolution de 1,2nm et la détection des composés a été réalisée à 280nm. La quantité de composés phénoliques a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage pour chaque composé. Les résultats sont exprimés en mg/kg d'huile pour chaque standard (oleuropéine, tyrosol et hydroxytyrosol).

II.1.11. Etude cinétique

Afin d'évaluer l'avancement de l'enrichissement de l'huile d'olive vierge (HOV), une étude cinétique comparative entre la méthode conventionnelle (HOV-CV) et la technique assistée par ultrasons (HOV-US) a été réalisée après l'optimisation des conditions. Prélever 10mL de l'HOV-CV et de l'HOV-US à différents intervalles de temps (de 10min à 60 min), pour déterminer le taux de polyphénols totaux correspondant (TPT). Les résultats obtenus sont analysés par un modèle mathématique dérivé de la deuxième loi de Fick [27]. L'accumulation du premier ordre du TPT dans la solution est exprimée comme suit :

$$C_t = C_{\infty}(1 - e^{-kt})$$

C_t : TPT au temps t , C_{∞} : TPT final, k : Constante de vitesse de l'extraction apparente du premier ordre, calculée à partir des parcelles $\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty} - C_t}\right)$ linéaires en fonction du temps.

II.1.12. Dosage de α -tocophérols

Le dosage de α -tocophérols a été réalisé selon la méthode officielle AOCS Ce 8-89 en plusieurs étapes : la première étape consiste en un équilibrage du système. Pour cela le solvant de migration (hexane:isopropanol, 99/1) est amené dans le système à un débit d'élution de 1,5 mL/min puis il est maintenu jusqu'à obtention d'une pression constante en tête de colonne (30 minutes minimum). La colonne de séparation utilisée pour ce type d'analyse est une colonne

de silice nucleosil (S.F.C.C.) 5 μm de 4,6 mm x 250 mm. La deuxième étape consiste au dosage de ce composé dans les huiles, 2 grammes d'huile sont solubilisés dans 25 mL d'hexane puis 20 μl de cette solution sont injectés en CLHP. La concentration en tocophérols est ensuite calculée à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec α -tocophérols exprimé en g/kg.

II.1.13. Test de l'activité antiradicalaire

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques des huiles étudiées, via le test DPPH[•], est effectuée par la méthode modifiée de Goupy *et al.* [28] (Fig. II.6).

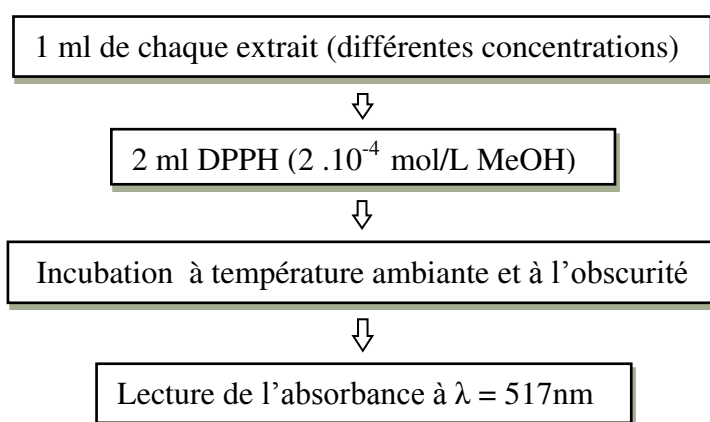


Figure II.6: Etapes du test DPPH [28].

** Le pourcentage de l'inhibition du radical est donné par l'expression suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

Où:

A_0 : Absorbance de la solution du **DPPH[•]**;

A : Absorbance de la solution du **DPPH** après réaction avec l'extrait

** La concentration qui a piégé 50% du radical **DPPH[•]** ainsi que la puissance anti-radicalaire ($\text{ARP}=1/ \text{IC}_{50}$) de chaque extrait d'huile ont été déterminées.

II.1.14. Détermination du taux de la fraction polaire totale

L'effet des conditions de fritures a été étudié par la détermination du taux de la fraction polaire totale (FPT). 400g d'huile (HOV, HOV-CV, HOV-US) ont été chauffés, dans des conditions de friture domestique, i.e 180 ± 5 °C durant plusieurs heures [29]. La température a été contrôlée par un thermocouple (ATC-300) insérée directement dans la friteuse électrique domestique. Tous les échantillons ont été analysés avant les premières sessions de chauffage et après chaque heure jusqu'à dégradation de l'huile, à l'aide d'une sonde *Testo* (Fig. II.7) qui permet, via la mesure de la constante diélectrique, de tester rapidement la qualité de l'huile et la fraction polaire. La fin des tests de chauffage a été déterminée par la valeur de FPT, max 25%, conformément à la loi Française (article 3 du décret-3 N°86-857 du 18/07/86). Cette teneur maximale légale de la FPT dans les huiles de friture, notamment les produits d'hydrolyse (diglycérides, monoglycérides et les acides gras libres) et une distribution complexe des produits d'oxydation incluant les polymères, sont tous formés à des températures inférieures 180°C (la loi Française N°86-857). La valeur FPT est généralement évaluée dans les restaurants et l'industrie agro-alimentaire par des tests commerciaux rapides (la plupart du temps basés sur les lectures colorimétriques), qui ont démontré une bonne corrélation avec les valeurs obtenues par les normes officielles [29].

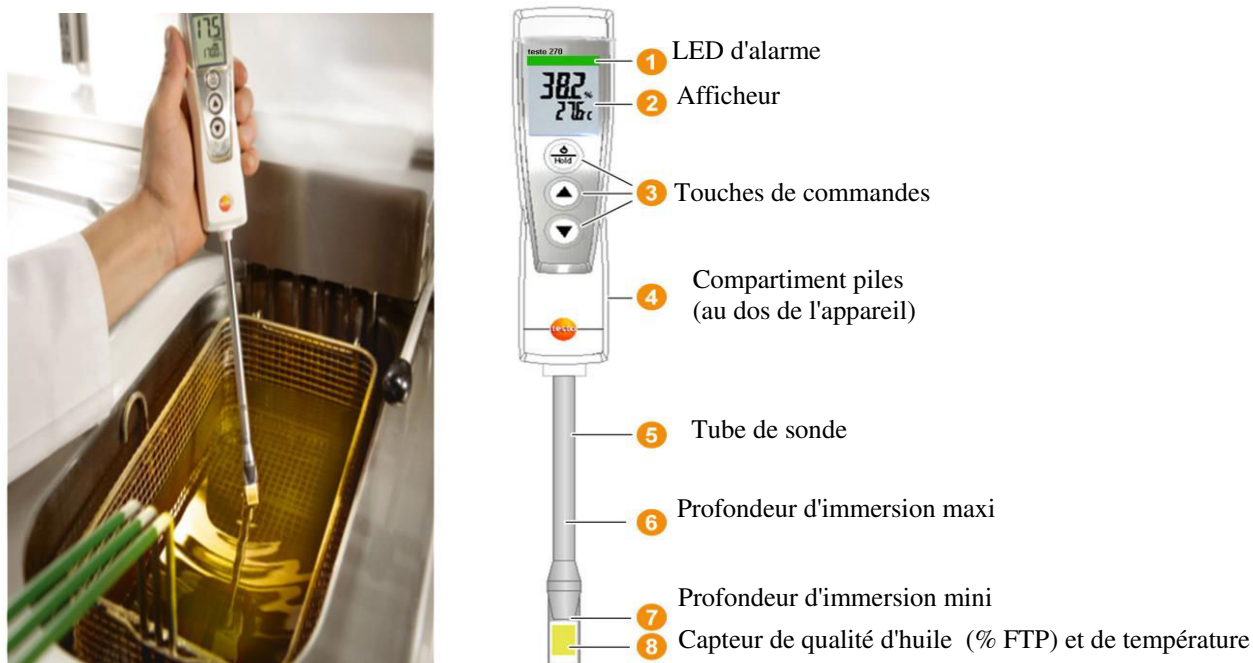


Figure II.7: Image et représentation schématique d'une sonde *Testo*

II.1.15. Evaluation de la couleur

Les couleurs des huiles étudiées ont été déterminées en utilisant un spectrocolorimètre (CR1000 Minolta, l'espace colorimétrique CIELAB). Les coordonnées colorimétriques des solutions (huiles) ont été calculées à partir de l'échelle CIELAB, un modèle de représentation des couleurs développé par le CIE (Commission Internationale de l'Eclairage), en 1976 (**Fig. II.8**).

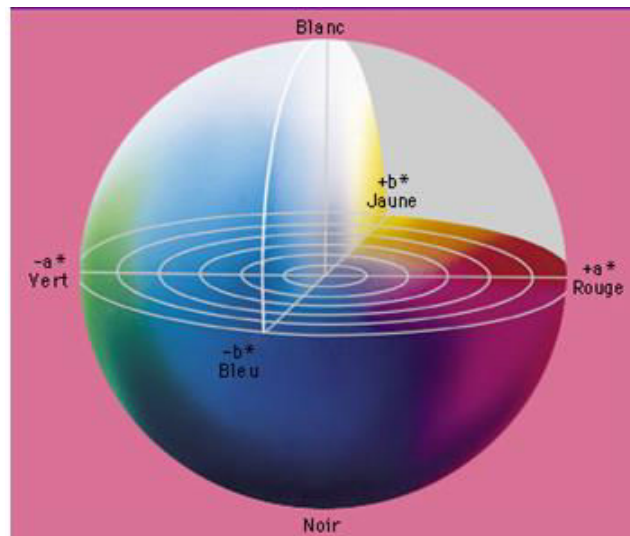


Figure II.8: Représentation 3D du système de couleur CIELAB

Dans ce système, chaque couleur est numériquement spécifiée par un ensemble unique de trois coordonnées cylindriques $L^*a^*b^*$, L^* représente la luminance ou clarté (indice de luminosité relatif allant de 0 pour le noir à 100 pour le blanc absolu), a^* représente la composante chromatique rouge-vert (+60 à -60) et b^* représente une nuance de couleur entre le jaune et le bleu (+60 à -60). Cet espace peut également être repéré par h^*_{ab} qui représente l'angle de teinte (ou tonalité chromatique), avec :

$$h^*_{ab} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

h^*_{ab} est vers de 90° pour les couleurs jaunes et près de 180° (ou -180°) pour les couleurs vertes. [30].

II.1.16. Analyse sensorielle

L'évaluation des propriétés sensorielles des huiles d'olives (HOV, HOV-CV, HOV-US) a été réalisée selon la méthode de **Lalas *et al.* [31]** à partir d'un ensemble d'attributs sensoriels [32]. L'analyse sensorielle des huiles d'olives a été effectuée par un groupe de 12 candidats, sélectionnés au sein de l'équipe du Laboratoire « GREEN » de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. La flaveur des huiles étudiées a été définie par deux attributs sensoriels, à savoir : “ Acceptabilité totale ” et “ Amer ” [33]. Chacun de ces attributs a été coté sur une échelle numérique de 5 points. L'échelle était munie de deux bornes extrêmes : 1 (non acceptable ou non amer) et 5 (très bon ou très amer) en tenant compte de tout arrière-gout ou gout indésirable.

II.1.17. Cytohistologie

Afin de mieux appréhender le phénomène au niveau cellulaire lors de l'extraction assistée par ultrasons, des fragments de feuilles d'olivier ont été prélevés avant, après macération et après sonication. Ces fragments ont été ensuite observés par microscopie électronique à balayage (**Fig. II.9**) et comparés à des fragments de feuilles non traitées. Cette étude est réalisée sur des coupes de 3 µm provenant d'échantillons fixés, inclus à l'historesine et colorées selon la procédure décrite par **El Maâtaoui et Pichot [34]**.

a. Prélèvements et fixation des échantillons

Les fragments étudiés, ont été excisés de 10 feuilles et à fur et à mesure de leur excision, les échantillons ont été immergés dans l'éthanol 70% avant d'être fixés pendant 48 h dans le FAA (Formol/acide acétique/alcool, 1/1/8 : V/V/V). Pour faciliter la pénétration du fixateur, les échantillons ont été soumis à un vide modéré (20 minutes, trompe à vide).

b. Inclusion et section

Après fixation, les échantillons ont été rincés à l'eau, déshydratés dans l'éthanol (séries 70-100%) avant infiltration et inclusion à l'historesine Technovit 7100 (Kultzer) selon les recommandations du fournisseur. Un microtome à rétraction a été utilisé pour la réalisation de coupes transversales sériées (**Fig. II.9**).

c. Colorations

Pour les observations cytohistologiques générales et la mise en évidence des polyphénols, les sections ont été colorées au bleu de toluidine en solution aqueuse à 0,5% pendant 2 min.

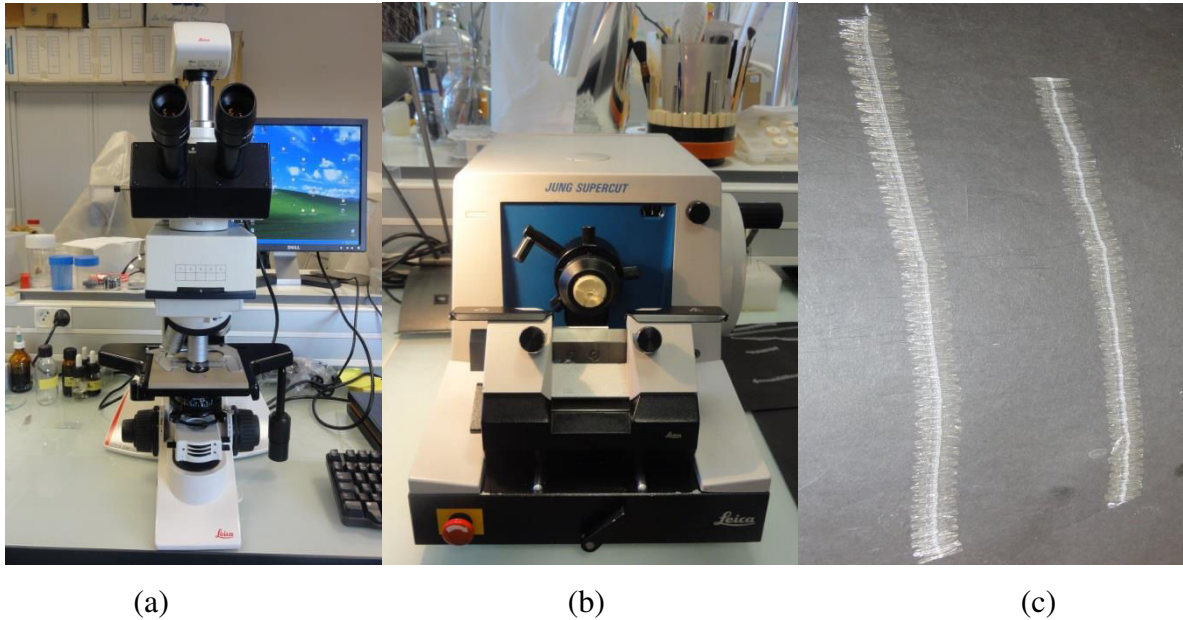


Figure II.9: Photographies (a) microscope électronique à balayage, (b) microtome à rétraction et (c) coupes transversales sériées.

II.2. Résultats et discussions

II.2.1. Etude préliminaire

L'effet de la charge des feuilles d'olivier, utilisées pour l'enrichissement de l'huile d'olive vierge, sur le taux de PT est représenté dans la figure II.10.

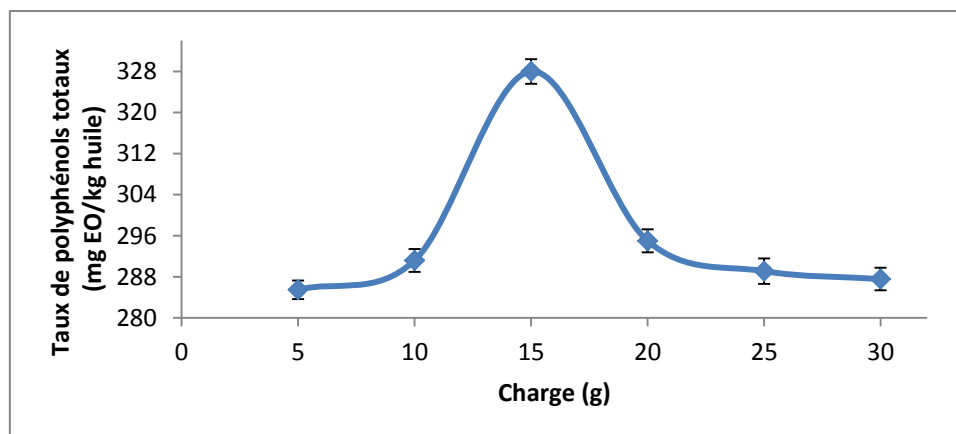


Figure II.10: Effet de la charge sur le taux de polyphénols totaux

Ces résultats montrent clairement que la plus forte concentration de PT ($328 \pm 2,4$ mg OE / kg d'huile), a été obtenue pour un rapport FO/HOV de 15% (w /v). Ce ratio a été appliqué pour le reste des expériences.

II.2.2. Conditions optimales

L'étude menée à l'aide d'un plan composite centré nous a permis de d'étudier trois facteurs influents préférentiellement l'enrichissement de l'HOV en antioxydants des feuilles d'olivier (**Tab. X**): la puissance fournie par l'ultrasonicateur (exprimé en watts), la température requise pour effectuer l'étape d'extraction (exprimée en °C) et le temps nécessaire à l'étape de l'extraction (exprimé en minutes).

Les réponses obtenues pour chaque expérience sont représentés dans le tableau X. Les réponses en TPT, oleuropéine (O), tyrosol (T) et en hydroxytyrosol (H) sont exprimées en mg d'O, de T et d'H par kg d'huile. Il peut être constaté des variations de réponses en fonction des niveaux des facteurs impliqués dans l'expérience; il est également à noter que les expériences ont été exécutées de façon aléatoire afin d'éviter toute influence de l'expérimentateur sur la réponse du plan expérimental.

Tableau X : Expériences réalisées dans le plan expérimental et réponses obtenues

No	Puissance (W)	Température (°C)	Temps (min)	Réponses			
				TPT (mg O/kg oil)	Oleuropéine (mg O/kg oil)	Tyrosol (mg T/kg oil)	Hydroxytyrosol (mg H/kg oil)
1	27	25	45	335.16	44.00	22	50
2	39	38	30	350.37	60.00	24	51
3	39	38	30	346.45	50.25	23	50
4	39	38	55	358.35	60.45	25	52
5	39	38	05	290.12	30.00	24	50
6	39	38	30	346.45	55.50	23	51
7	27	51	45	321.75	37.50	23	50
8	52	51	45	337.05	45.00	23	50
9	39	38	30	345.49	51.00	23	51
10	39	60	30	326.15	36.00	22	50
11	39	38	30	340.31	46.50	24	51
12	52	51	15	322.52	34.50	25	50
13	60	38	30	340.51	49.50	25	51
14	39	16	30	345.23	51.00	26	50
15	52	25	15	358.19	68.00	26	52
16	52	25	45	394.14	84.00	26	53
17	19	38	30	309.26	31.50	23	50
18	27	25	15	335.28	42.00	23	50
19	39	38	30	345.56	53.00	24	51
20	27	51	15	307.09	39.00	22	50

- Les modèles prédits ont été décrits par les équations polynomiales, du second degré :

$$Y1 = 149,043 + 1,39526 P + 1,25675 T + 0,545167 t - 0,00607069 P^2 - 0,0186007 PT + 0,0122571 Pt - 0,00220471 T^2 - 0,00960256 Tt - 0,00985282 t^2$$

$$Y2 = -70,4684 + 2,1032 P + 2,34551 T + 0,255201 t - 0,00708299 P^2 - 0,0297645 PT + 0,0103793 Pt - 0,0109315 T^2 - 0,00576923 Tt - 0,00552187 t^2$$

$$Y3 = 41,0034 + 0,131473 P + 0,264437 T - 0,0035804 t - 0,0002238 P^2 - 0,00236849 PT + 0,000390968 Pt - 0,00156028 T^2 - 0,000641026 Tt + 0,000395376 t^2$$

$$Y4 = 18,9167 + 0,121655 P + 0,0260203 T - 0,0156432 t + 0,000161694 P^2 - 0,00184968 PT - 0,000830685 Pt + 0,00045267 T^2 + 0,0 Tt + 0,00113739 t^2$$

Où:

Y1 Y2, Y3 et Y4: Concentration en PT, oleuropeine, tyrosol et hydroxytyrosol (mg/kg oil) respectivement;

P: Puissance ultrasonore appliquée (W) ; t: Temps de sonication (min) et T: Température (°C), en terme d'unités codées.

II.2.2.1. Analyse de la variance

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée sur les résultats obtenus (**Tab. XI**). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le modèle étudié et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la réponse étudiée, en l'occurrence la concentration de l'oleuropéine. Ainsi, la pertinence statistique de chaque facteur est déterminée et peut être représentée dans le tableau V. Dans ce tableau, le ratio-*F* représente le ratio entre la somme des carrés des écarts à la moyenne d'un effet par la somme des carrés des écarts à la moyenne totale [35].

Tableau XI : Résumé de l'analyse de la variance (ANOVA) pour l'oleuropéine

Source	Somme des carrés	Ddl	Carrés moyens	Ratio- <i>F</i>	Valeur- <i>p</i>
P: Puissance	733,446	1	733,446	33,78	0,0021
T: Température	868,391	1	868,391	40,00	0,0015
t: Temps	453,816	1	453,816	20,90	0,0060
P ²	126,311	1	126,311	5,82	0,0607
PT	508,096	1	508,096	23,40	0,0047
Pt	79,609	1	79,609	3,67	0,1137
T ²	49,0309	1	49,0309	2,26	0,1932
Tt	10,125	1	10,125	0,47	0,5250
t ²	20,8163	1	20,8163	0,96	0,3725
Lack-of-fit	390,971	5	78,1942	3,60	0,0930
Erreur	108,552	5	21,7104		
Total	3274,78	19			

$R^2 = 84.75 \%$, R^2 (adjusted for *Df*) = 71.02%.

La valeur «ratio-*F*» dépend du nombre de degrés de liberté impliqués dans le modèle et est représentée dans la colonne valeur-*p* à un niveau de confiance de 95% par référence à une table statistique. De ce fait, les effets inférieurs à 0,05 dans cette colonne sont considérés comme significatifs.

II.2.2.2. Analyse des surfaces de réponse

A partir de l'analyse ANOVA, un diagramme de Pareto (**Fig. II.11**) représentant les différents effets de manière standardisée, a pu être dressé afin de déterminer les paramètres influents de façon significative, par ordre d'importance pour chaque variable (effets linéaires, interactions entre facteurs et effets quadratiques). La longueur des barres sur ce graphique est proportionnelle à la valeur absolue de l'amplitude des effets estimés des coefficients. La barre transversale représente l'amplitude minimale à partir de laquelle les effets seront considérés comme étant statistiquement significatifs sur la variable réponse étudiée, considérant un niveau de confiance de 95%. Il peut être remarqué sur ce diagramme que l'effet linéaire de la température (T), est la variable quantitative présentant l'influence la plus importante sur la concentration de l'oleuropéine suivie de la puissance ultrasonore (P), du temps de sonication (t) et de l'effet de l'interaction entre la puissance et la température. Cependant les effets quadratiques (P^2 , T^2 et t^2) ainsi que l'interaction entre la puissance, la température et le temps de sonication (Pt et Tt respectivement) n'ont montré aucun effet significatif. Ce dernier suggère une absence totale d'interactions entre les variables dans le domaine expérimental étudié.

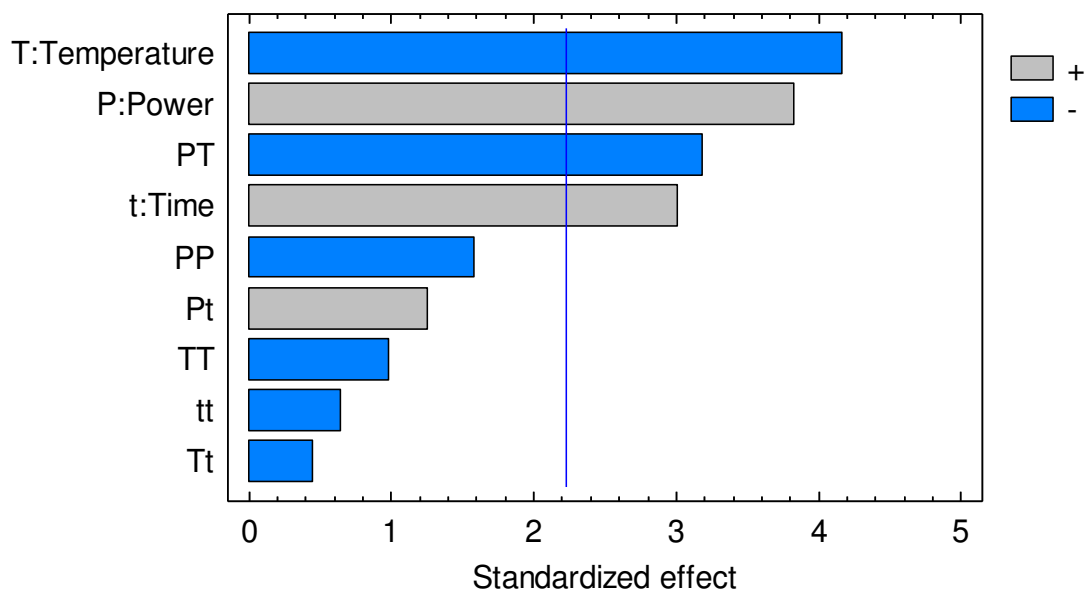


Figure II.11: Diagramme de Pareto pour la concentration d'oleuropéine (mg O/kg huile)

Les paramètres permettant un enrichissement de l'HOV optimisé, sont obtenus par une première dérivation des équations polynomiales du second degré. Ces équations mathématiques dérivées, donnent des équations du premier ordre impliquant la totalité des variables paramétriques étudiées et sont ensuite égalées à 0 puis résolues dans un système d'équations (3 équations à 3 inconnues). Le transfert d'une valeur réelle A vers une variable codée x est réalisé selon la formule suivante.

$$x = \frac{A - A0}{pas}$$

Où:

$A0$: la valeur réelle au centre du repère pour la variable concernée.

Pas : la différence, en valeur réelle, entre la borne supérieure et le centre du repère.

Les conditions optimales d'enrichissement ainsi définies sont rassemblées dans le tableau XII.

Tableau XII: Présentation des paramètres optimisés

Variables	Réponses			
	Y1	Y2	Y3	Y4
Puissance (W)	60	60	60	60
Température (°C)	16	16	16	18
Temps (min)	45	45	17	55

D'après les observations réalisées lors de l'étude des surfaces de réponse (**Fig. II.12**), l'efficacité de l'extraction en termes de concentration en PT, oleuropéine, tyrosol et hydroxytyrosol s'accroît en augmentant P , t . Les conditions finales sélectionnées correspondent aux valeurs maximales choisies pour définir le domaine expérimental [36]. A partir des principales réponses (Y1 et Y2), l'enrichissement assisté par ultra-sons permet de mener l'extraction en 45 min avec une puissance de 60 W et une température de 16°C. Une étude répétable a été conduite en appliquant ces conditions optimales afin d'évaluer la capacité prédictive du modèle. Les résultats expérimentaux ainsi obtenus sont de 111.0 ± 2.2 mg/kg huile pour l'oleuropéine et avec un taux PT de 414.3 ± 3.2 mg EO/kg huile, qui sont très proches des valeurs prédites (104.4 mg/kg huile ; 409.5 mg EO/kg) respectivement. Ce qui implique, un degré de corrélation élevée entre les données observées et les valeurs prédites du modèle de régression ($R^2 > 84.75$, $R^2_{aj} > 71.02$). Ceci démontre l'adéquation du modèle pour les résultats expérimentaux, qui est confirmé par le test du lack of fit ou la valeur- $p > 0,05$ (**Tab XI**). Donc la modélisation des surfaces de réponse peut être effectivement appliquée, pour l'enrichissement de l'HOV par l'oleuropéine de FO.

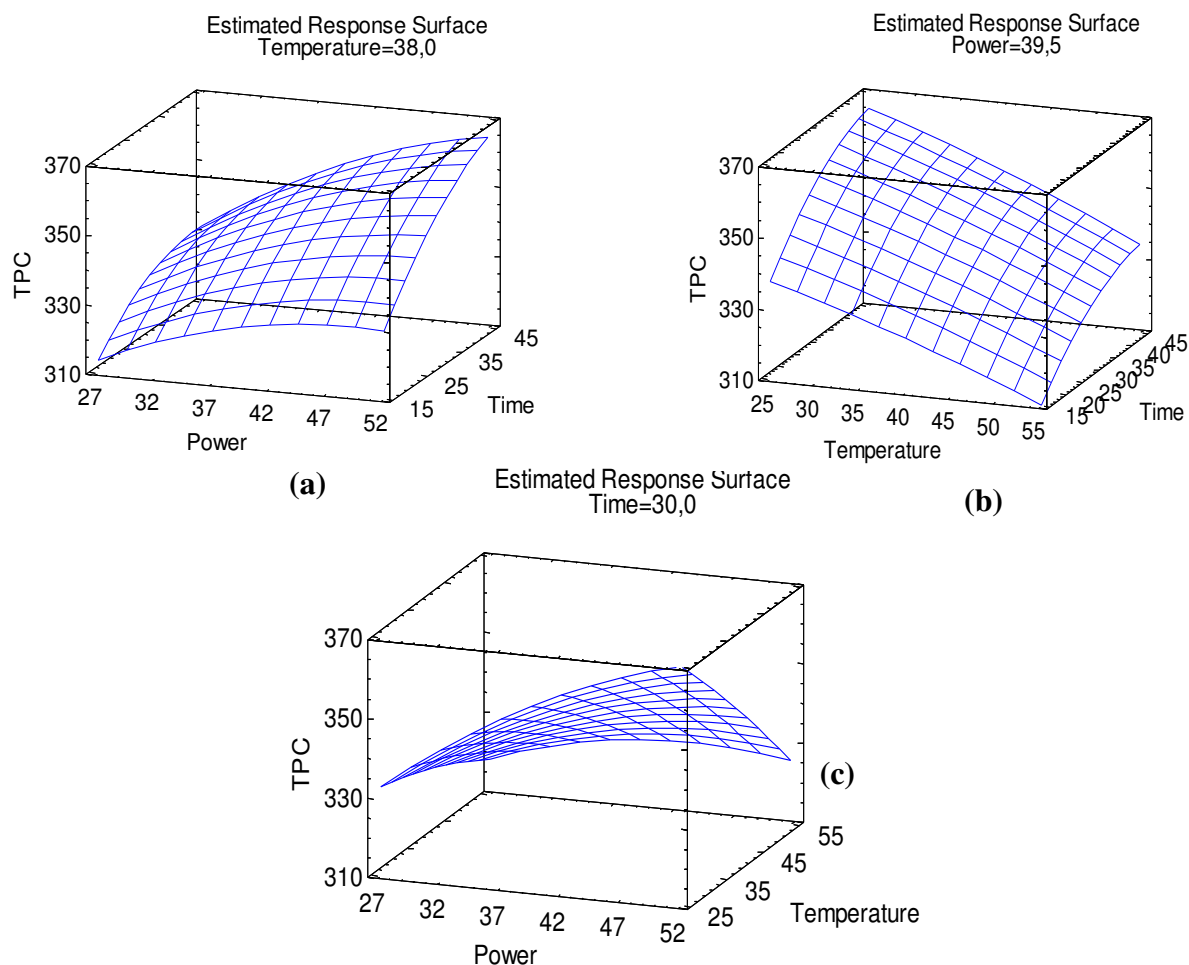


Figure II.12: Paramètres optimisés par la méthodologie de surfaces de réponses pour l'oleuropéine (a) Effet combiné de la puissance et du temps à 38°C, (b) Influence de la température et de la puissance à 39.5 W, (c) Interaction entre la température et la puissance après 30min

II.2.3. Comparaison des méthodes d'extractions: EAU et EC

Une comparaison de technique d'enrichissement assisté par US et classique, de l'HOV par les polyphénols des FO, a été réalisée. Les concentrations des PT de l'HOV-US (60W à 16°C après 45min sous agitation) et de l'HOV-CV (mêmes conditions mais sans ultrasons), sont représentées dans la figure II.13.

Comme première appréciation, l'EAU a montré une augmentation significative de PT de 342.5 ± 1.5 à 414.2 ± 3.2 mg/kg huile pour la macération conventionnelle et l'EAU respectivement. Par référence à la concentration initiale de PT dans l'HOV (*i.e.* 282.3 ± 1.7 mg/kg huile), le gain en PT obtenu par l'EAU, est deux fois supérieur par rapport à l'EC.

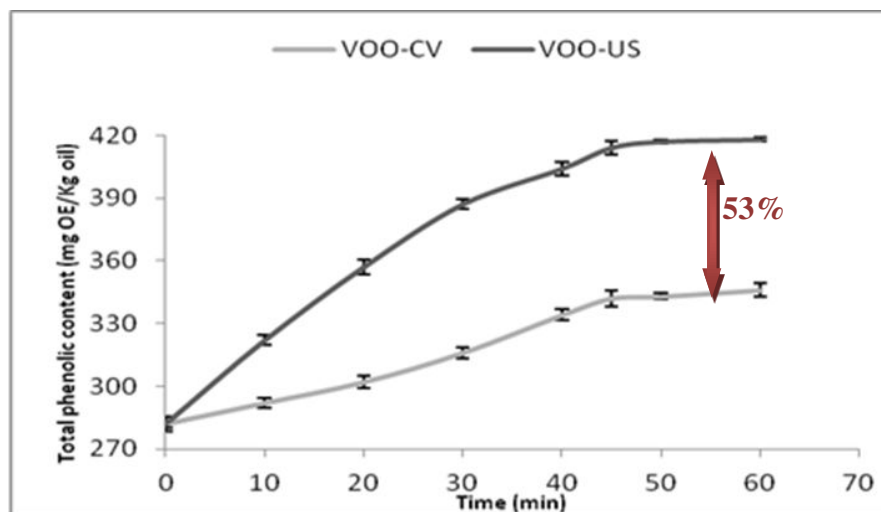


Figure II.13 : Comparaison cinétique de l'enrichissement de l'HOV assisté par ultrasons (VOO-US) et la méthode conventionnelle (VOO-CV)

La cinétique d'enrichissement de l'HOV est nettement améliorée; en effet, nous constatons que l'extraction des phénols totaux est trois fois rapide sous ultrasons ($k = 0.26 \text{ min}^{-1}$) comparativement à la méthode conventionnelle ($k = 0.08 \text{ min}^{-1}$). Cette différence peut être attribuée au phénomène de cavitation induit par les ultrasons dans le milieu. Des cinétiques similaires ont été mises en évidence par **Chemat *et al.* [37]** pour EAU du carvone et du limonene à partir des graines de carvi et par **Virost *et al.* [38]** et **Khan *et al.* [17]** pour EAU des polyphénols à partir du marc de pomme et d'écorce d'orange, respectivement.

La caractérisation de l'oleuropeine, d'hydroxytyrosol et du tyrosol a été obtenue par comparaison de leur temps de retentions HPLC et leur spectres UV avec les étalons. Les chromatogrammes CLHP-DAD de l'HOV avant et après supplémentation sont illustrés dans la figure II.14. A l'issue des résultats obtenus, nous constatons clairement que l'oleuropéine est indétectable dans l'HOV, cependant ce secoiridoïde est présent dans l'HOV-US à une teneur deux fois plus élevée que celle trouvée dans l'HOV-CV (**Tab XII**). L'analyse de la figure II.14, révèle aussi que les principaux composés phénoliques de l'huile d'olive vierge hydroxytyrosol et le tyrosol [34] n'ont pas été dégradés sous l'effet de la sonication, comme l'indique leurs concentrations (**Tab XIII, Fig. II.14**). En effet la dégradation ultrasonique des polyphénols est relativement faible en comparaison avec les composés aromatiques volatiles qui diffusent plus rapidement dans les bulles de cavitation par pyrolyse [39].

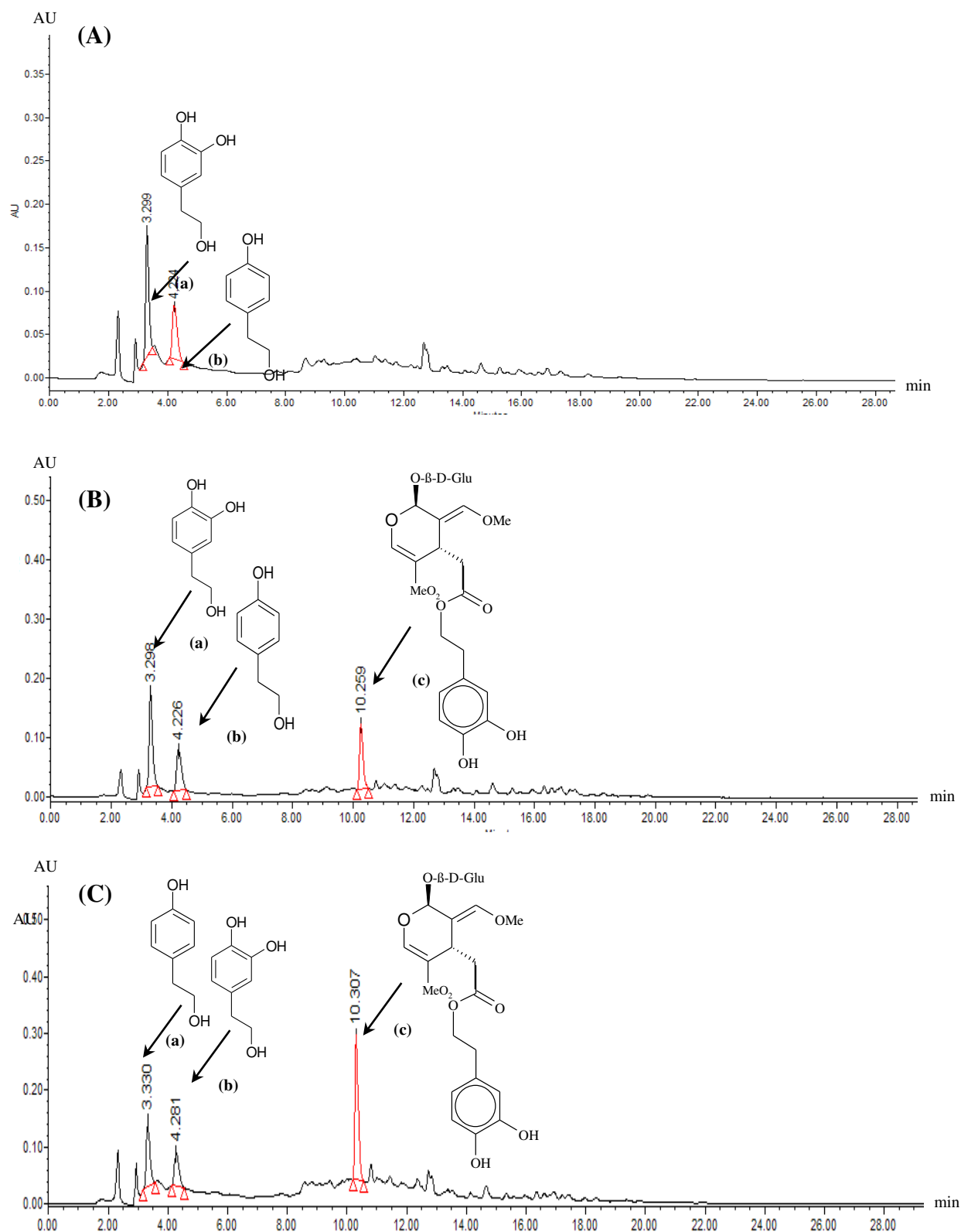


Figure II.14: Chromatogrammes CLHP-DAD à 280 nm des extraits méthanoïques de l'HOV (A), de l'HOV-US (B) et de l'HOV-CV (C). Identification des pics: (a) hydroxytyrosol, (b) tyrosol, (c) oleuropéine

De plus, la dégradation des phénols est favorisée à des fréquences plus élevées (nécessaires à la génération des radicaux hydroxyles par sonolyse de l'eau) que celle utilisée dans cette présente étude (25 kHz).

Tableau XIII : Concentration de l'oleuropéine, hydroxytyrosol et le tyrosol dans l'HOV avant et après enrichissement

Polyphénols (mg/kg huile)	Huiles		
	HOV	HOV-CV	HOV-US
Oleuropéine	ND	50.7±1.7	111.0±2.2
Tyrosol	31.7±0.3	29.1±0.2	25.5±0.1
Hydroxytyrosol	58.7±0,2	55.7±0,7	52.4±0,5

Les résultats obtenus par la méthode proposée ne concordent pas avec l'étude menée par **Luque de Castro** et collaborateurs [6], qui ont démontré l'enrichissement de l'huile d'olive avec les phénols des FO (oleuropéine, verbascoside, apigénine-7-glucoside et lutéoline-7-glucoside) et ayant utilisé une approche dynamique aux ultrasons. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence : technique d'enrichissement, le ratio solide-liquide, la température, le temps de sonication et la variété des FO. Ces paramètres sont supposés avoir un effet important sur la supplémentation de l'huile d'olive.

II.2.4. Histochimie

L'observation microscopique des coupes à partir d'échantillons de contrôle a montré que même la feuille d'olivier séchée conserve son anatomie, avec la présence d'une épaisse adaxiale cuticule et des poils pluricellulaire, comme un parapluie (**Fig. II.15a**). Lorsqu'elles sont traitées au bleu de toluidine (TB), ces deux structures sont colorées en bleu-vert indiquant la présence de substances phénoliques [40]. Comparativement au contrôle, les poils des fragments de feuilles ayant été sujettes à la méthode conventionnelle, ont montré un matériel TB-positif réduit, en particulier à l'intérieur des parois cellulaires (**Fig. II.15b**). Cependant, avec ce traitement, la cuticule semblait conserver une coloration bleu-vert semblable à l'échantillon de contrôle. Les sections des échantillons obtenues de l'extraction assistée aux ultrasons, ont révélé une diminution notable substances TB-positifs, dans les poils et les cuticules à la fois (**Fig. II.15c**), suggérant une extraction efficace des substances

phénoliques via cette procédure. Ceci est probablement dû au phénomène de cavitation qui améliore la cinétique d'extraction des métabolites des végétaux.

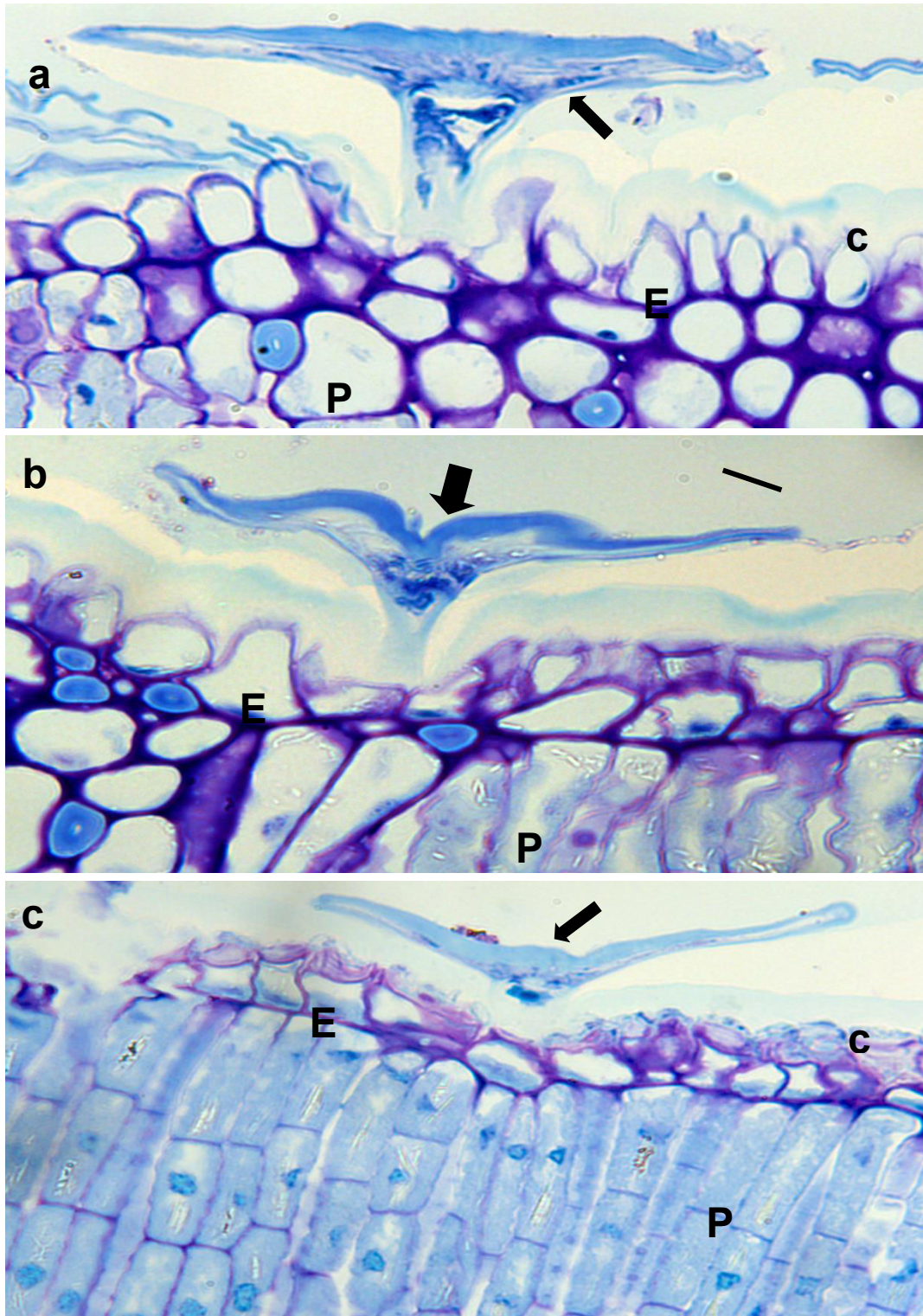


Figure II.15: Photographies de microscopie électronique à balayage des structures des feuilles d'oliviers après différents traitements (A) Contrôle, (B) Macération et (C) Sonication

II.2.5. Activité antioxydante

Plusieurs auteurs ont déterminé l'effet scavenger des huiles sur le radical DPPH^{*} à 517 nm. [5, 41]. Après l'ajout de la solution méthanolique DPPH^{*}, une dissipation de la couleur violette a été observée et pratiquement toutes les huiles (HOV, l'HOV-CV et l'HOV-US) ont réagi positivement. Les résultats de leur pouvoir anti-radicalaire sont exprimés en pourcentage et sont illustrés dans la figure ci-dessous:

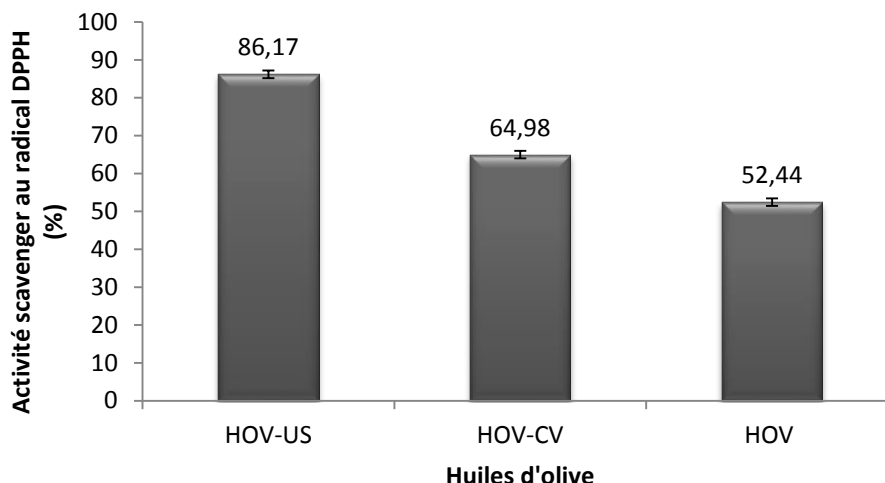


Figure II.16: Activité scavenger du DPPH de l'HOV avant et après enrichissement

Ces histogrammes indiquent que tous les extraits méthanoliques des huiles étudiées présentent la capacité à piéger le radical DPPH et diffère d'une huile à une autre. L'HOV-US a enregistré un taux d'inhibition le plus élevé (86.2%) par rapport aux deux huiles HOV et HOV-CV.

Effet de la concentration sur le radical DPPH^{*}

Le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans la figure II.17. Ces courbes révèlent que le pouvoir anti-radicalaire est proportionnel à la concentration des extraits phénoliques des huiles testées HOV, HOV-CV et HOV-US.

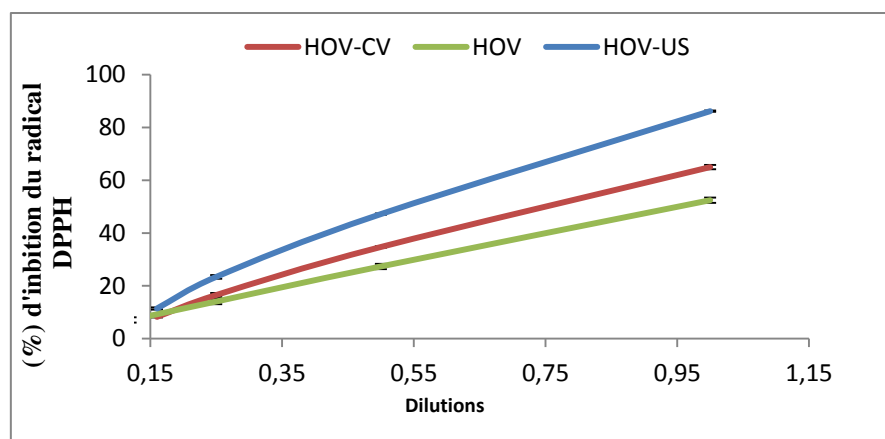


Figure II.17: Activité scavenger du DPPH en fonction de la concentration des huiles.

A partir de ces données, la concentration qui a piégé 50% (IC_{50}) du radical DPPH ainsi que la puissance anti-radicalaire ($ARP=1/IC_{50}$) de chaque huile ont été déterminées (Tab XIV).

Tableau XIV: Résultats du test d'inhibition du radical libre et les huiles étudiées

Capacité antioxydante	Huiles		
	HOV	HOV-CV	HOV-US
RSA (%)	52.9±0.9	65.0±0.8	86.2±0.2
EC_{50} (µg/ml)	109.4±0.09	97.4±0.04	81.34±0.01
ARP ($1/EC_{50}$)	09.1±0.4	10.3±0.5	12.3±0.3

Le tableau montre nettement que l'*HOV-US* nécessite la plus faible concentration pour piéger 50% du radical DPPH ($IC_{50}=81.34±0.01$ mg/ml) et présente la puissance anti-radicalaire (ARP) la plus importante ($12.3±0.3$).

A la lumière des résultats obtenus nous pouvons conclure que l'*HOV-US* détient le pouvoir antioxydant le plus élevé par rapport aux deux huiles d'*HOV* et d'*HOV-CV*. Cela est directement lié à sa plus grande teneur en antioxydants phénoliques notamment l'oleuropéine; qui a confirmé l'existence d'une corrélation fréquente entre la capacité antioxydante et le taux de PT [42]. En effet, ces antioxydants phénoliques sont capables de réduire les espèces réactives d'oxygène (ERO), englobant les radicaux libres, par un mécanisme de protection des biomolécules (le cas des acides gras polyinsaturés) de l'oxydation [43]. L'oleuropéine est un sécoiridoïde ayant fréquemment présenté une activité antioxydante puissante [44], qui peut d'ailleurs contribuer aux propriétés nutritionnelles de l'huile d'olive.

II.2.6. Dosage des α -tocophérol

Dans l'huile d'olive vierge les tocophérols existent essentiellement sous forme α , avec une teneur d'environ 95% de la quantité totale de tocophérols (β et δ tocophérol). [45] Ces composés sont dotés non seulement de l'activité vitaminique mais aussi des propriétés antioxydantes importantes. [46] La présence d' α -tocophérol dans les huiles assure une stabilité des lipides polyinsaturés qui sont sensibles à l'autoxydation [36]. La détermination qualitative et quantitative d' α -tocophérol dans l'HOV avant et après enrichissement sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau XV: Concentration d' α -tocophérol dans les huiles étudiées

α -tocophérol	Huiles		
	HOV	HOV-CV	HOV-US
Concentration (g/kg)	43.0±0.2	46.5±1.2	55.0±2.1

D'après ces données, la supplémentation de l'HOV avec les feuilles d'oliviers par la technique assistée aux ultrasons, a montré une concentration plus élevée en α -tocophérol que celles distinguées dans l'HOV et l'HOV-CV. En effet les feuilles d'*Olea europea* sont riches en tocophérols [2] et l'huile peut être considéré comme un solvant "vert" approprié pour leur extraction.

II.2.7. Enrichissement de l'huile et test de friture

La qualité des huiles a été vérifiée grâce à la mesure du taux de composés polaires formés, jusqu'à ce que la valeur de référence réglementaire soit atteinte (25%). Les résultats obtenus indiquent que l'apparition de la fraction polaire est proportionnelle au temps de chauffage, plus ce dernier augmente plus le pourcentage des composés de dégradation croit. (Fig. II.18).

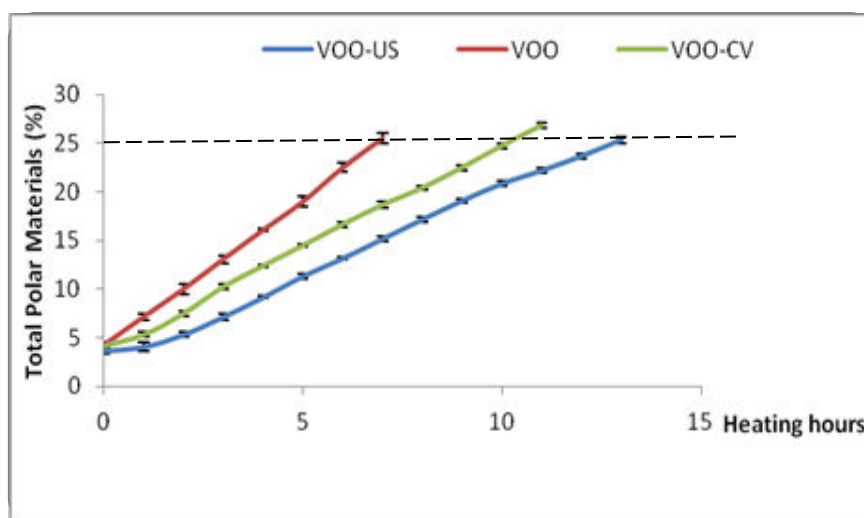


Figure II.18: La fraction polaire totale au cours des sessions de friture (180°C), des huiles étudiées.

Toutes les huiles d'olive ont enregistré des valeurs de FPT très proches avant le chauffage (**Tab XVI, Fig. II.18**) Cependant le temps de chauffage total requis pour atteindre la valeur maximale 25% de FPT varie d'une huile à une autre: $12,6 \pm 0,1$ h pour l'HOV-US ; un gain de temps d'environ de 6h et 3h comparativement à l'HOV et l'HOV-CV respectivement. L'efficacité de la supplémentation assistée par ultrasons de l'HOV est attribuée aux polyphénols, pouvant prolonger significativement la durée de vie de l'huile d'olive. Les concentrations élevées de l'oleuropéine (avec son proton donneur de la fraction hydroxytyrosol) et, dans une moindre mesure, d' α -tocopherol, sont principalement responsables de cet effet confèrent une protection antioxydante importante à l'huile d'olive.

Tableau XVI : Résultats du test de friture pour les huiles analysées

Test de friture	Huiles		
	HOV	HOV-CV	HOV-US
FPT avant friture (%)	4.25 ± 0.28	4.16 ± 0.20	4.08 ± 0.08
Temps de friture pour 25% de FTP (H)	6.9 ± 0.1	10.1 ± 0.1	12.6 ± 0.1

II.2.8. Evaluation de la couleur

La détermination de la couleur des huiles (HOV, HOV-CV, HOV-US) a été réalisée par le l'espace $L^*a^*b^*$, qui modélise les données, luminance et chrominance, de la vision

humaine [23]. Cette mesure a permis d'avoir les résultats du tableau XVII, qui montre que la valeur de la luminance (L^*) des échantillons analysés, suit un ordre croissant $HOV > HOV-CV > HOV-US$. Cependant un ordre inverse a été observé pour « h^*_{ab} »: $HOV-US > HOV-CV > HOV$.

Tableau XVII : Résultats du test de Lab des huiles d'olive vierges

Test Lab	Huiles		
	HOV	HOV-CV	HOV-US
L^*	37.1±0.1	51.6±0.1	58.8±0.2
h^*_{ab} (°)	148.4	137.0	89.9

L'expression de ces résultats en termes de couleur a donné pour l'HOV, l'HOV-CV et l'HOV-US jaune, vert-jaune et un vert clair respectivement. Cette différence peut être attribuée à l'enrichissement de l'HOV par la chlorophylle des feuilles d'olivier.

II.2.9. Analyse sensorielle

Le tableau XVIII montre les résultats de l'évaluation sensorielle des trois échantillons analysés (HOV, HOV-CV et HOV-US) et permet d'observer le degré de variation de chaque attribut sensoriel.

Tableau XVIII : Résultats du test d'analyse sensorielle des huiles d'olive vierges

Analyse sensorielle	Huiles		
	HOV	HOV-CV	HOV-US
Acceptabilité totale	4	3	3
Amertume	1	2	4

Bien que l'amertume augmente dans les échantillons d'HOV-CV et d'HOV-US, les caractéristiques sensorielles des huiles indiquent que l'acceptabilité totale est bonne pour l'HOV avant et après enrichissement. Ce goût amer est directement liée à l'oleuropéine [3] dont la concentration a été élevée au cours de l'extraction conventionnelle et celle assistée aux ultrasons (**Tab. XVIII**). Cependant, une évaluation sensorielle plus approfondie de ces huiles par des groupes spécialisés dans ce domaine, est nécessaire dans une perspective de développement de nouveaux produits.

II.2.10. Etude de l'extraction à l'échelle pilote et essais industriels

Pour étendre les différentes expériences menées au niveau du laboratoire, un réacteur plus puissant, un bac d'extraction de 30L, a été également utilisé dans cette étude. Ce réacteur se compose d'une sortie quadruple des ultrasons à 25 kHz et 4×200 W. Les systèmes de pompage sont couplés au bain à ultrasons dans le but de remplir, d'agiter le mélange et de vider le système à la fin de l'expérience (**Fig. II.19**). Les conditions sélectionnées pour l'étude de l'extraction à l'échelle semi-pilote étaient les mêmes conditions optimales, appliquées précédemment pour l'étude au laboratoire.

Le rendement en polyphénols totaux obtenu avec le dispositif ultrasonique de 30L est égal à celui déduit à partir du bac d'extraction assisté aux ultrasons de 3L: 53% plus élevé que la macération conventionnelle.

Ces résultats, montrent aussi que l'utilisation éventuelle de l'enrichissement par ultrasons est prometteuse pour l'extraction à l'échelle industrielle. L'extraction assistée aux ultrasons pourrait réduire le temps d'extraction, en améliorant le rendement final, et d'abaisser la température de fonctionnement, ce qui entraîne des coûts d'investissement nettement inférieurs.

EAU peut également être utilisée pour produire de grandes quantités d'antioxydants naturels, par utilisation des réacteurs d'EU industriels, disponibles sur le marché mondial, appropriés pour l'enrichissement des huiles comestibles d'un volume de 100 à 1000 litres. Ces réacteurs ultrasonores sont adaptés pour l'extraction de 15 à 150 kg de matière végétale sèche par heure.



Figure II.19: Equipement ultrasonique (30 L) à l'échelle pilote, utilisé pour l'enrichissement assisté par ultrasons de l'HOV.

Conclusion

A la lumière de l'ensemble des résultats (**Tab. XIX**), nous pouvons conclure que le procédé assisté par ultrasons facilite largement l'enrichissement de l'huile d'olive vierge en composés phénoliques des feuilles d'oliviers, comparativement à la macération conventionnelle ;

Tableau XIX : Les caractéristiques des huiles étudiées: HOV, HOV-CV et HOV-US

	HOV	HOV-CV	HOV-US
<i>TPT (mg EO/kg oil)</i>	282.0±1.7	342.5±1.5	414.3±3.2
<i>Phenols (mg/kg oil)</i>			
- Oleuropéine	ND	50.7±1.7	111.0±2.2
- Tyrosol	31.7±0.3	29.1±0.2	25.5±0.1
- Hydroxytyrosol	58.7±0,2	55.7±0,7	52.4±0,5
<i>Activité antioxydante</i>			
- RSA (%)	52.9±0.9	65.0±0,8	86.2±0,2
- EC ₅₀ (µg/mL)	109.4±0.09	97.43±0.04	81.34±0.01
- ARP (1/IC ₅₀)	09.1±0.4	10.3±0.5	12.3±0.3
Teneur α -Tocopherol (g/kg of oil)	43.0±0,2	46.5±1,2	55.0±2,1
<i>FPT (%)</i>			
- Avant friture	4.25±0.28	4.16±0.20	4.08±0.08
- Temps de friture pour 25% de FPT(h)	6.9±0.1	10.1±0.1	12.6±0.1
<i>Analyse sensorielle</i>			
- Acceptabilité totale	4	3	3
- Amertume	1	2	4
<i>Test Lab</i>			
- L*	58.8±0.2	51.6±0.1	37.1±0.1
- h _{ab}	89.9°	137.0°	148.4°

Les polyphénols originels d'huile étudiée, tyrosol et hydroxytyrosol n'ont pas été dégradés d'une manière significative, sous l'effet de la sonication (même concentration avant et après enrichissement) ;

L'huile d'olive enrichie en polyphénols des feuilles d'*Olea europea* par l'EAU a enregistré la plus importante capacité antiradicalaire et une meilleure stabilité à la dégradation thermique (DPPH et essais de chauffage). Ce qui peut être attribué aux concentrations élevées d'oleuropéine et d' α -tocopherol ;

Au terme de ce travail, cette étude suggère que l'extraction assistée aux ultrasons des antioxydants naturels des feuilles d'olivier, peut être un procédé efficace et adéquat afin d'améliorer la stabilité et la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive avec peu d'impact sur les qualités sensorielles.

Références bibliographiques

- [1] Huang C.L., Sumpio B.E. (2008). Mediterranean diet and cardiovascular health. *American College of Surgeons*. **207** (03): 408–416.
- [2] Lalas S., Athanasiadis V., Gortzi O., Bounitsi M., Giovanoudis I., Tsaknis J., Bogiatzis F. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*. **127**: 1521–1525.
- [3] Lesage-Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J.-C., Lorquin J., Delattre M., Simon J.-L., Asther M., Labat M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*. **75**: 501–507.
- [4] Bouaziz H., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidant from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*. **108**: 253–262.
- [5] Salta F.N., Mylona A., Chiou A., Boskou G., Andrikopoulos N.K. (2007). Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*. **13**: 413–421.
- [6] Japon-Lujan R., Janeiro P., Luque de Castro M.D. (2008). Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasound-assisted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 7231–7235.
- [7] Omar S.H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*. **78**: 133–154.
- [8] Karabourniotis G., Fasseas C. (1996). The dense indumentum with its polyphenols content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany*. **74**: 347–351.
- [9] Erbay Z., Icier F. (2010). The importance and potential uses of olive leaves. *Food Reviews International*. **26**: 319–334.
- [10] Japon-Lujan R., Luque-Rodriguez J.M., Luque de Castro M.D. (2006). Multivariate optimisation of the microwave extraction of oleuropein, related biophenols from olive leaves. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. **385**: 753–759.
- [11] Japon-Lujan R., Luque de Castro M.D. (2008). Liquid-liquid extraction for the enrichment of edible oils with biophenols from olive leaf extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 2505–2511.
- [12] Vinatoru M., Toma M., Mason T.J. (1999). Ultrasound assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. *Advances in Sonochemistry*. **05** : 209–247.

- [13] Kablan B.J., Adiko M. et Abrogoua. (2008). Evaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*. **06**: 282–288.
- [14] Wichlt M. et Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. *Edition: 2ème TEC & DOC*. 200–201.
- [15] Awika J. M., Rooney L. W. et Waniska R. D. (2004). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. **90**: 293-301.
- [16] Kimura T., Sakamoyo T., Leveque J.M., Sohmiya H., Fujita M., Ikeda S., Ando T. (1996). Standardization of ultrasonic power for sonochemical reaction. *Ultrasonics Sonochemistry*. **03**: S157–S161.
- [17] Khan M.K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.S., Dangles O., Chemat F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis L.*) peel. *Food Chemistry*. **119**: 851–858.
- [18] Tsimidou M., Papadopolus G., Boskou D. (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil part 1. *Food Chemistry*. **45**: 141–144.
- [19] Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. **16**: 2349–2351.
- [20] Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod. Paris*. 173–201.
- [21] SITEC-LAB SEPPAL, Indice de Folin/Polyphenols totaux, Montauban, France.
- [22] Box G.E.P. et Wilson K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*. **13**: 01–38.
- [23] Yoon J. (2007). Application of experimental design and optimization to PFC model calibration in uniaxial compression simulations. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences*. **44**: 871-889.
- [24] Ben Amor B. (2008). Thèse de Doctorat. *Université de La Rochelle, N° : 2008LAROS223*.
- [25] Lazic Z.R. (2004). Design of Experiments in Chemical Engineering. *Wiley*. 620
- [26] Eriksson L., Johansson E. *et coll.* (2000). Design of Experiments -Principles and Applications. *Umetrics Academy*.
- [27] Spiro M., Selwood R.M. (1984). The kinetics and mechanism of caffeine infusion from coffee: the effect of partical size. *Journal of Science Food and Agriculture*. **35**: 915–924.

- [28] Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. (2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 615–622.
- [29] Casal S., Malheiro R., Sendas A., Oliveira B.P.P., Pereira J.A. (2010). Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 2972–2979.
- [30] Malien-Aubert C., Dangles O., Amiot M.J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**: 170–176.
- [31] Lalas S., Aggelousis G., Gortzi O., Dourtoglou V., Tsaknis J. (2007). Protection of traditional Greek foods using a plant extract. *Italian Journal of Food Science*. **19** (03): 279–286.
- [32] Recueil des normes françaises : Analyse Sensorielle. (2002). *Editions AFNOR, Paris*.
- [33] Buccelato F. (1981). Orange blossom. *Perfumer and Flavorist*. **03**: 31-34.
- [34] El Maâtaoui M., Pichot C. (1999). Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens L.* *Planta*. **208**: 345–351.
- [35] Cuoco G., Mathe C., Archier P., Chemat F., Vieillescazes C. (2009). A multivariate study of ultrasound-assisted extraction of madder dyes and characterisation by liquid chromatography-photodiode array detection. *Ultrasonics Sonochemistr*. **19**: 75–82.
- [36] Garcia-Ayuso L.E., Luque de Castro M.D. (1999). A multivariate study of the performance of a microwave-assisted soxhlet extractor for olive seeds. *Analytica Chimica Acta*. 382–309.
- [37] Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum L.*: a multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*. **79**: 1079–1086.
- [38] Chemat S., Lagha A., Aitamar H., Bartels P.V., Chemat F. (2004). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*. **19**: 188–195.
- [39] Virot M., Tomao V., Colnagui G., Visinoni F., Chemat F. (2007). New microwaveintegrated Soxhlet extraction: an advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography A*. **1174**: 138–144.

- [40] Papoti V.T., Tsimidou M.Z. (2009). Looking through the qualities of a fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract. *Food Chemistry*. **112**: 246–252.
- [41] Chowdhury P., Viraraghavan T. (2009). Sonochemical degradation of chlorinated organic compounds, phenolic compounds and organic dyes – a review. *Science of the Total Environment*. **407**: 2474–2492.
- [42] O'Brien T.P., McCully M.E. (1981). The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods. *Termarcarphi Pty Ltd., Melbourne, Australia*,. 357 pp.
- [43] Chiou A., Kalogeropolous N., Salta F., Efstathiou P., Andri Kopolous N.K. (2009). Panfrying of French fries in three different edible oils enriched with olive leaf extract: oxidative stability and fate of microconstituents. *Food Science and Technology*. **42**: 1090–1097.
- [44] Artajo L.S., Romero M.P., Morello J.R., Motilva M.J. (2006). Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 6079–6088.
- [45] Dangles O. (2006). The physico-chemical properties of polyphenols: How do they relate to their roles in plants, foods and human health. *AgroFood Industry Hi-Tech*. **17**: 64–67.
- [46] Altioek E., Baycin D., Bayraktar O., Ulku S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*. **62**: 342–348.
- [47] Tasioula-Margari M., Okogeri O. (2001). Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry*. **74**: 377–383.
- [48] Kiritsakis A. (1998). Olive Oil: From the Tree to the Table. *Food and Nutrition Press*. Connecticut. p. 347.

PARTIE 2:

Propriétés physico-chimiques des polyphénols dans le tractus digestif



Table des matières, Partie 2 : Propriétés physico-chimiques des polyphénols dans le tractus digestif

Chapitre I: Etat des connaissances

I.1. Etat des connaissances.....	103
I.1. Caractéristiques physico-chimiques du bol alimentaire dans le compartiment gastrique.	103
I.1.1. pH du bol alimentaire au sein de l'estomac.....	103
I.1.1. Teneur en oxygène dans l'estomac.....	104
I.1.1. Systèmes de digestion <i>in vitro</i>	104
I.2. Choix du modèle chimique du contenu gastrique.....	105
I.3. Sérum albumine et β -cyclodextrine.....	106
I.1.3.1. Protéine sérum albumine bovine (SAB)	106
I.1.3.1.1. Généralités.....	106
I.1.3.1.2. Ligands de l'albumine.....	108
I.1.3.2. Cyclodextrines.....	110
I.1.3.2.1. Structure et propriétés.....	110
I.1.3.2.1. Formation de complexes.....	111
I.1.3.2.2. Applications diverses.....	113
Références bibliographiques.....	114

Chapitre II: Activité antioxydante des polyphénols

II. Activité antioxydante des polyphénols.....	118
II.1. Test de réduction du radical stable DPPH [•]	119
II.2. Objectifs et enjeux.....	121
II.3. Matériels et méthodes.....	122
II.3.1. Réactifs.....	122
II.3.1. Analyses.....	122
II.3.2. Analyse des données (<i>curve fitting</i>)	123
II.4. Résultats et discussion.....	123
II.4.1. Solubilisation du DPPH [•] en milieu aqueux.....	123
II.4.2. Caractéristiques spectrales du DPPH [•] dans le système micellaire.....	124
II.4.3. Modèle cinétique.....	126
II.4.4. Relations structure - activité.....	128
II.4.5. Mécanisme d'oxydation.....	129

II.4.5.1. Quercétine.....	129
II.4.5.2. Catéchine.....	131
II.4.5.3. Rutine.....	132
Conclusion.....	138
Références bibliographiques.....	140

Chapitre III: Interaction des polyphénols avec des ions métalliques

III.1. Etat des connaissances.....	146
III.1.1. Ions métalliques.....	146
III.1.2. Fer, cuivre et aluminium en biologie.....	146
III.1.3. Interaction des polyphénols par des métaux de transition (Fe, Cu).....	148
III.1.3.1. Complexation des polyphénols avec du fer et du cuivre.....	149
Références bibliographiques.....	158
III.2. Interaction des ions métalliques avec les polyphénols.....	162
III.2.1. Analyses	163
III.2.2. Complexation	164
III.2.3. Dosage de Fe ^{II}	164
III.2.4. Procédures d'ajustement de courbes (<i>curve fitting</i>).....	165
III.2.5. Analyses en Chromatographie Liquide Ultra Performance (CLUP).....	165
III.2.6. Interaction des ions métalliques avec la rutine.....	166
III.2.6.1. Interaction de la rutine avec Al ^{III}	168
III.2.6.2. Interaction de la rutine avec les ions de Fer.....	171
III.2.6.2.1. Complexation rutine - Fe ³⁺	171
III.2.7. Interaction des ions métalliques avec l'acide chlorogénique.....	179
III.2.7.1. Interaction de l'acide chlorogénique avec Al ^{III}	180
III.2.7.2. Complexation Acide chlorogénique-Fe ⁺³	183
III.2.7.3. Complexation Acide chlorogénique-Fe ²⁺	188
III.2.8. Interaction de catéchine avec les ions métalliques.....	190
III.2.9. Interaction des ions du cuivre et des polyphénols.....	192
III.2.10. Polyphénols et autoxydation de Fe ^{II}	194
III.2.10.1. Complexation rutine - Fe ²⁺ en présence d'ions phosphate.....	195
Discussion et conclusion.....	199
Références bibliographiques.....	203

Chapitre I:

Etat des connaissances

*« Une confrontation permanente entre théorie et expérience est une condition
nécessaire à l'expression de la créativité »*

Pierre Joliot, La Recherche Passionnément

I. Etat des connaissances

I.1. Caractéristiques physico-chimiques du bol alimentaire dans le compartiment gastrique

Le bol alimentaire est une masse alimentaire mastiquée, imprégnée de salive, prête à être digérée. Depuis l'isthme du gosier jusqu'à l'entrée dans l'estomac, les aliments prennent de cinq à dix secondes pour descendre le long de l'œsophage. Ils séjournent entre 2 et 6 heures dans l'estomac pour être partiellement digérés. L'estomac est un milieu complexe dont les caractéristiques, pH, volume et composition varient en fonction de son état (à jeun ou postprandial) et du repas ingéré.

I.1.1. pH du bol alimentaire au sein de l'estomac

Les repas sont connus pour tamponner l'acidité intra-gastrique. Ainsi, après l'ingestion d'un repas, le pH intra-gastrique augmente durant les trente premières minutes, jusqu'à 5 ou 6 avant de diminuer rapidement [1].

Par exemple, après un repas composé d'huile de tournesol et de purées de légumes, le pH stomacal a rapidement augmenté en moins de 30 minutes. Ainsi il est passé de 1,8 à 5,4, 5,8 ou 6,2 dans le cas de purées de tomates, d'épinard ou de carottes respectivement, avant de redescendre à son pH basal inférieur à 2 à jeun [2].

L'influence d'autres types d'aliments sur le pH intra-gastrique a aussi été évaluée. Par exemple, celui-ci a été suivi pendant 4 heures après l'ingestion de 130 g de pain et 430 mL d'eau par 8 personnes intubées d'une électrode de pH dans l'estomac. Comme dans l'étude précédente, le pH maximal moyen a été enregistré 30 minutes après l'ingestion du repas et atteint une valeur moyenne de 5,1 (± 2). Ce pH maximal correspond au remplissage complet de l'estomac. Une heure après l'ingestion du repas, le pH décroît à 2 pour atteindre son niveau basal de 1,7 ($\pm 0,2$), environ 80 minutes après l'ingestion du repas [3].

L'administration intra-gastrique de solutions protéiques de pH initial 7 a conduit à une diminution du pH gastrique plus progressive. Pendant les 30 premières minutes, celui-ci a diminué jusqu'à 6 avant d'atteindre une valeur d'environ 4, une heure après le début de la digestion [4].

Enfin, Armand *et al.* ont également étudié en détail le contenu gastrique de cinq volontaires après ingestion d'un repas test à base d'huile d'olive, d'œufs et de saccharose

(volume = 400 mL, pH = 7,5). Les variations de pH ont été mesurées toutes les heures. A jeun, le pH stomacal est très faible (pH 1,5). Sa valeur maximale est obtenue après une heure de digestion (pH 4) avant de diminuer progressivement durant la vidange (environ 4 heures) [5]. Compte tenu du pH initial du repas et des résultats des études précédentes, la valeur de pH maximale enregistrée au cours de ces travaux peut paraître faible. Son protocole (analyse toutes les heures) ne permet pas de connaître la valeur du pH gastrique 30 minutes après l'ingestion du repas qui pourrait être supérieure.

Le pH gastrique dépend donc de la composition du repas ingéré, ce qui explique les variations observées entre les différentes études portant sur les légumes, le pain, les protéines ou encore les lipides. Les résultats au sein d'une même étude sont souvent eux-mêmes sujets à une grande fluctuation, soulignant ainsi la variabilité inter-individuelle.

I.1.1. Teneur en oxygène dans l'estomac

Peu d'études se sont intéressées à la mesure de la teneur en dioxygène de l'estomac. Toutefois, celui-ci est ouvert à l'air durant le temps du repas quand il reçoit des aliments mastiqués. Une expérience réalisée à partir de 20 g de pain mastiqués, puis placés dans une eau désoxygénée, a entraîné une concentration en dioxygène dissous de 250 μM , c'est-à-dire à une saturation de la solution [6]. Ainsi, la mastication des aliments participe à l'apport en dioxygène et l'estomac peut être perçu comme un environnement aérobie.

I.1.1. Systèmes de digestion *in vitro*

Pour limiter les études sur l'homme, souvent onéreuses et difficiles à mettre en place, des systèmes de digestion *in vitro*, qui modélisent les diverses étapes de la digestion, ont été mis au point. De nombreux chercheurs ont ainsi utilisé un dispositif mis en place par Gil-Izquierdo *et al.* [7, 8], lui-même adapté de Miller *et al.* [9]. Ce dispositif est constitué de deux étapes. Brièvement, une digestion initiale est réalisée à l'aide d'un mélange de pepsine et de HCl, pendant deux heures, à 37°C, pour simuler les conditions gastriques. Elle est suivie d'une digestion en présence de sels biliaires et de pancréatine pendant 2 heures à 37°C, pour simuler les conditions régnant dans le petit intestin. Ce genre d'expérimentations est très utilisé pour estimer la «bioaccessibilité» des composés phénoliques et autres microconstituants, c'est-à-dire leur relargage hors de la matrice alimentaire (ex. : jus de fruits, fruits) et leur disponibilité pour l'absorption à travers l'intestin. Il est aussi utilisé pour étudier la stabilité ou la transformation de microconstituants au cours de la digestion.

Si ces modèles chimiques représentent fidèlement la digestion d'un point de vue physiologique (enzymes, pH, durées), ils ne prennent pas en considération certains éléments importants de la phase gastrique. Ainsi, les différents macroconstituants apportés par un repas, les modifications physiques du bol alimentaire (structuration en émulsion) et les variations du pH entre début et fin de digestion n'y sont pas reproduits. Conçus pour prédire la bioaccessibilité de nutriments, ces dispositifs ne modélisent pas le potentiel antioxydant du tractus digestif lui-même.

I.2. Choix du modèle chimique du contenu gastrique

Le bol alimentaire est caractérisé par la présence de nutriments oxydables (lipides polyinsaturés, protéines), d'initiateurs d'oxydation, notamment le fer (hème ou faiblement lié) et de micronutriments réducteurs (polyphénols, vitamines C et E, caroténoïdes).

Les aliments se retrouvent dans l'estomac principalement sous la forme d'une émulsion de lipides dispersés dans une phase aqueuse et contenant des enzymes, des ions métalliques, du dioxygène, des protéines et des polysaccharides. Le pH décroît au cours de la phase gastrique, variant d'environ 6 immédiatement après l'ingestion d'un repas à 1,5 quatre heures plus tard. Le dioxygène y est présent en quantité non limitante.

Pour étudier le pouvoir antioxydant des polyphénols et leurs interactions avec les composants alimentaires lors de la digestion, nous nous proposons de mettre au point un modèle chimique, de type milieu micellaire faiblement acide, modélisant simplement l'estomac après ingestion d'un repas :

- Le premier chapitre décrira la mise au point d'un protocole de réduction du radical DPPH en milieu micellaire aqueux et l'étude de l'influence d'une protéine (sérum albumine bovine) et d'un modèle d'amidon (β -cyclodextrine) sur l'activité antiradicalaire des composés phénoliques ;
- Le deuxième chapitre traitera de la capacité des composés phénoliques à complexer les ions du fer en milieu faiblement acide. Ce phénomène est susceptible de limiter l'absorption intestinale du fer mais aussi de protéger le tractus digestif du stress oxydant induit par le fer libre. Des études cinétiques ont été conduites pour comparer l'affinité des phénols pour Fe^{II} et Fe^{III} .

I.3. Sérum albumine et β -cyclodextrine

Le pouvoir antioxydant potentiel des polyphénols dans le milieu gastrique est susceptible d'être modulé par leurs interactions avec les protéines et les polysaccharides de la matrice végétale ou des autres composants du bol alimentaire.

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'influence de la protéine SAB et de la β -cyclodextrine sur l'activité antioxydante de polyphénols communs dans l'alimentation. Le protocole utilisé est la réduction du radical DPPH[•] dans un milieu aqueux modélisant simplement l'estomac après ingestion d'un repas.

L'interaction des polyphénols avec les ions métalliques (fer, cuivre), seront aussi étudiées en présence de SAB.

Ces différentes études nécessitent, au préalable, de faire le point sur les caractéristiques générales de ces deux molécules: la protéine SAB et la β -cyclodextrine.

I.1.3.1. Protéine sérum albumine bovine (SAB)

I.1.3.1.1. Généralités

La sérum albumine est la protéine majoritaire du plasma sanguin. Son rôle principal est le *transport des acides gras libres (non estérifiés), des hormones et des médicaments*. Ses multiples capacités de liaison et sa forte concentration plasmatique (environ 0,6 mM) en font une protéine de transport et de détoxification très importante pour l'organisme.

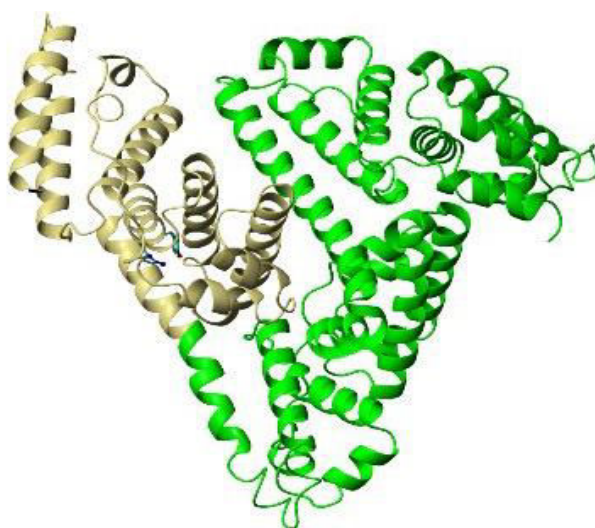


Figure I.1: Sérum albumine humaine.

Le sang est composé de cellules (érythrocytes et globules blancs), de fragments de cellules (thrombocytes) et d'une phase liquide, le plasma dont le pH est compris entre 7,35 et 7,45 (pH physiologique). Le plasma est composé de 92 % d'eau, de petits solutés (gaz, minéraux, nutriments) et de macromolécules telles que les protéines dont l'albumine fait partie. L'albumine est synthétisée par le foie puis délivrée dans la circulation sanguine où elle reste 27 jours avant d'être éliminée [10].

L'albumine est une protéine globulaire d'une masse moléculaire de 66500 Da environ. Elle est constituée de 583-585 résidus d'acides aminés, selon l'espèce considérée, parmi lesquels on trouve 35 résidus cystéine qui participent à la formation de 17 ponts disulfures (1 seul résidu thiol) qui s'établissent au sein des segments d'hélices α . Dans le tableau suivant sont rassemblés les différents acides aminés présents dans les sérum albumines humaines (SAH), bovine (SAB) et du rat.

Tableau XX : Composition en acides aminés de l'albumine de sérum de mammifères [11]

Acides aminés	Homme	Bovin	Rat
Acide aspartique	36	40	32
Asparagine	17	14	20
Thréonine	28	34	33
Sérine	24	28	24
Acide glutamique	62	59	57
Glutamine	20	20	25
Proline	24	28	30
Glycine	12	16	17
Alanine	62	46	61
Valine	41	36	35
Cystéine	35	35	35
Méthionine	6	4	6
Isoleucine	8	14	13
Leucine	61	61	56
Tyrosine	18	20	21
Phénylalanine	31	27	26
Lysine	59	59	53
Histidine	16	17	15
Tryptophane	1	2	1
Arginine	24	23	24
Total	585	583	584
Masse Molaire (Da)	66 438,41	66 411,17	65 850,51

L'albumine est de nature flexible et peut adopter rapidement différentes conformations. Elle est composée de 9 boucles avec trois domaines I, II et III similaires d'un point de vue structural. Chaque domaine est divisé en deux sous-domaines A et B. L'étude par diffraction des rayons X montre que l'albumine présente une forme triangulaire en forme de cœur de 8 nm de côté et 3 nm d'épaisseur en moyenne pour un volume moléculaire d'environ 88 nm³ [11].

I.1.3.1.2. Ligands de l'albumine

De par sa grande flexibilité, l'albumine a une capacité de liaison d'une grande variété de ligands différents. Elle transporte facilement les petites molécules produites par l'organisme ou apportées par l'alimentation. Par exemple, les acides gras, insolubles dans le plasma, mais aussi des métabolites toxiques comme la bilirubine (produit de dégradation de l'hème) sont fortement liés à l'albumine. Il en est de même pour les vitamines, les ions métalliques et les oligo-éléments (**Tab. XXI**) [11, 12].

Tableau XXI : Quelques ligands de l'albumine [11]

Composés	Constante d'association K_a (M^{-1})	Nombre de ligand liés n
Acides biliaires	$(3-200) \times 10^3$	3
Acides gras à longues chaînes	$1-69 \times 10^7$	1 à 7
Bilirubine	$9,5 \times 10^7$	1
Calcium	$15,1 \times 10^2$	1 à 4
Cuivre (II)	$1,5 \times 10^{16}$	1
Folate	$9,0 \times 10^2$	
Hématine	$1,1 \times 10^8$	1
Magnésium	$1,0 \times 10^2$	12
Progestérone	$3,6 \times 10^5$	1
L-Tryptophane	$1,0 \times 10^4$	1
Vitamine D ₃	$6,0 \times 10^5$	1
Zinc (II)	$3,4 \times 10^7$	1

a. Interactions des polyphénols avec la sérum albumine

L'agencement des hélices α dans les sous-domaines IIA et IIIA forme des cavités qui permettent de lier de nombreux ligands exogènes. Ainsi, deux sites de forte affinité pour les composés aromatiques et les hétérocycles sont localisés dans les sous-domaines IIA et IIIA, appelés aussi site I et site II respectivement (nomenclature de Sudlow, 1975). Le sous

domaine IIIA est séparé du sous-domaine IIA par une surface chargée positivement qui lui permet de lier de petits acides aromatiques sous forme d'anions carboxylates.

Les interactions albumine-phénols ont été beaucoup étudiées dans le cas des flavonoïdes et des acides hydroxycinnamiques (**Tab. XXII**).

Tableau XXII : Liaison de divers polyphénols à la SAB

Composé	K (M ⁻¹)	Méthode utilisée	Référence
Quercétine	134x10 ³ (pH 7,4)	Fluorescence	Dufour & Dangles [13]
	86 x10 ³ (pH 5)		Dufour & Dangles [13]
	110x10 ³ (pH 7)		Rawel et al. [14]
	42x10 ³ (pH 5)		Rawel et al. [14]
Rutine	11x10 ³ (pH 7,4)	Fluorescence Electrophorèse capillaire	Dufour & Dangles [13]
	2-1,6x10 ³ (pH 7,4)		Lu et al. [15]
Catéchine	3,5x10 ³ (pH 7,2) n = 1	Fluorescence	Roy et al. [16]
Epicatéchine	4,6x10 ³ (pH 7,2) n = 0,9	Fluorescence	Roy et al. [16]
Acide caféique	30x10 ³ (pH 7,4)	Dialyse à l'équilibre Précipitation au TCA	Adzet et al. [17]
	8x10 ³ (pH 7,4)		
Acide chlorogénique	13-16x10 ³ (pH 7,4)	Dialyse à l'équilibre Fluorescence	Prigent et al. [18]
	4,8x10 ³ (pH 7) n = 2		Rawel et al. [19]

(TCA = acide trichloroacétique)

Divers auteurs ont montré que les flavonoïdes manifestent une affinité modérée pour l'albumine avec des constantes d'association variant de 1 à 15 x 10⁴ M⁻¹ [13, 14]. A l'aide de marqueurs de sites (warfarine et DNSA pour le sous-domaine IIA, ibuprofène et diazépam pour le sous-domaine IIIA), il a été montré que la complexation albumine-flavonoïde se déroule majoritairement dans le sous-domaine IIA, en accord avec le quenching de fluorescence du résidu Trp-214 (lui-même localisé dans ce sous-domaine) qu'elle produit [13]. La stœchiométrie des complexes est 1:1 dans la plupart des études [13, 20]. Les principales interactions responsables de l'association protéine-flavonoïde se répartissent entre liaisons hydrogène, interactions ioniques et interactions de van der Waals [21].

Concernant l'association entre les acides hydroxycinnamiques et l'albumine, l'association se déroulerait également dans le sous-domaine IIA. Elle résulterait à la fois d'interactions de van der Waals entre le cycle aromatique de l'acide et des résidus hydrophobes, d'interactions ioniques entre le groupement carboxylate et les résidus cationiques (basiques) et de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles et la chaîne polypeptidique [22].

I.1.3.2. Cyclodextrines

I.1.3.2.1. Structure et propriétés

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α -D-glucopyranose en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons α -1,4. Elles sont dénommées respectivement α -, β - ou γ -cyclodextrine. Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles. La partie extérieure est donc hautement hydrophile. Les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 se situent sur le côté le plus large du cône appelé face secondaire tandis que les hydroxyles primaires en C6 se trouvent du côté le plus étroit (face primaire) (Fig. I.2). La libre rotation des hydroxyles primaires diminue le diamètre effectif de la cavité du côté où ils se trouvent alors que les hydroxyles secondaires sont en position plus figée. L'intérieur de la cavité est constituée par des atomes d'hydrogène portés par les carbones C3 et C5 ainsi que par les atomes d'oxygène participant à la liaison glycosidique, ce qui lui confère un caractère apolaire [23-25].

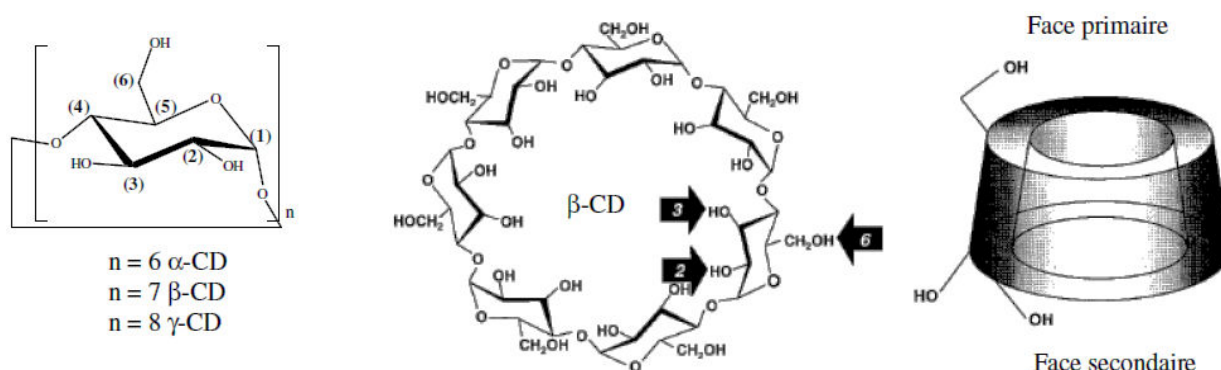


Figure I.2: Représentations de la structure chimique des cyclodextrines naturelles [25, 26]

Quelques caractéristiques des cyclodextrines naturelles (α -, β - et γ -CD) sont reprises dans le tableau XXIII. Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire augmentent avec le nombre d'unités glucopyranose constitutives. Bien que toutes les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leur solubilité dans l'eau augmente dans le sens: β - < α - < γ -CD.

Tableau XXIII : Caractéristiques des cyclodextrines naturelles [27, 28]

Cyclodextrine	Diamètre de la cavité centrale (Å)	Masse moléculaire	Solubilité aqueuse à 25°C (g/100 ml)	% m/m d'eau de cristallisation
α -CD	4,7 - 5,3	972	14,5	10,2
β -CD	6,0 - 6,5	1135	1,85	13,2 – 14,5
γ -CD	7,5 - 8,3	1297	23,2	8,13 – 17,7

Les cyclodextrines se trouvent sous forme hydratée à l'état solide. La teneur en eau à l'équilibre dépend des conditions de cristallisation et de la nature de la cyclodextrine.

I.1.3.2.1. Formation de complexes

Etant donné leur structure particulière et la dualité de leur polarité, les cyclodextrines sont capables d'augmenter la solubilité aqueuse de composés en formant des complexes d'inclusion. Possédant une cavité plutôt hydrophobe, elles peuvent encapsuler des substances ou des parties de molécules à caractère lipophile [29]. Des complexes de stoechiométries diverses peuvent être formés (**Fig. I.3**). On parle de complexe 1:1 lorsqu'une molécule invitée interagit avec une molécule de cyclodextrine. Un complexe 1:2 voire 1:3 est formé si la molécule invitée est de grande taille et si plusieurs molécules de cyclodextrines peuvent interagir avec elle. Par contre, un rapport 2:1 est obtenu dans le cas où la cavité de la cyclodextrine est suffisamment spacieuse pour accueillir deux molécules. La taille de la cavité et de la molécule invitée jouent donc un rôle important dans le processus de complexation [23].

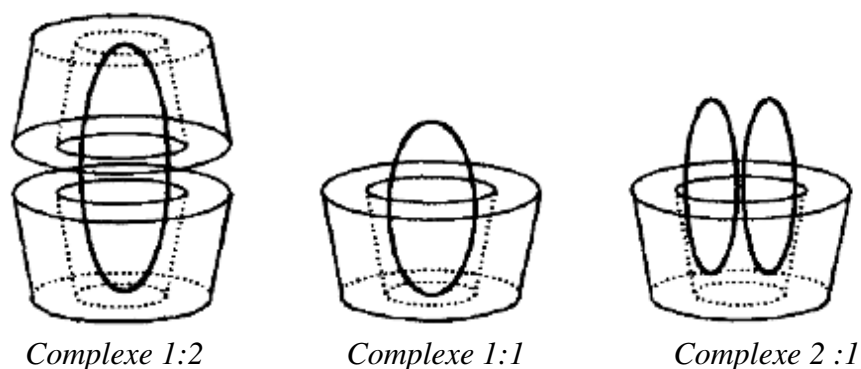


Figure I.3 : Représentations schématiques de complexes d'inclusion de stoechiométries différentes [30].

Outre la taille, des facteurs tels que l'encombrement stérique, la charge et la polarité de la molécule invitée sont importants pour la formation de complexes d'inclusion. Il existe une corrélation directe entre le caractère hydrophobe de la molécule ou de certaines parties de celle-ci et la stabilité du complexe formé [23]. Aucun lien covalent n'est formé ou rompu durant la complexation. La principale force provoquant la formation des complexes est la stabilisation énergétique du système par le remplacement dans la cavité, des molécules d'eau à haute enthalpie par des molécules hydrophobes qui développent des interactions de van der Waals avec la face interne du macrocycle [31]. Ce processus réversible (les molécules complexées sont en équilibre avec les molécules libres en solution) peut être quantifié par une constante d'équilibre appelée constante de stabilité (K).

a. Etude des complexes

Les analyses effectuées, afin de mettre en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion en solution, se basent sur les modifications des caractéristiques physico-chimiques de la substance complexée. En théorie, toute méthode qui permettrait de mettre en évidence des changements au niveau par exemple, de la solubilité (diagramme de solubilité), de la rétention en chromatographie liquide, de l'absorption dans le domaine UV-visible, de la fluorescence ou des déplacements chimiques en résonance magnétique nucléaire, peut être employée pour l'étude des complexes [32, 33].

Divers auteurs ont montré que les polyphénols manifestent une affinité modérée pour la β -CD [34, 35]. Ce macrocycle peut interagir avec les polyphénols grâce à des liaisons de Van der Waals, des liaisons hydrogènes et par effet hydrophobe [36]. Les constantes de stabilité des complexes d'inclusion varient de 20 à 600 M^{-1} , comme le montre le tableau ci-dessous :

Tableau XXIV : Interaction de divers polyphénols avec la β -cyclodextrine

Composé	K (M^{-1})	Méthode utilisée	Référence
Quercétine	600 (pH 7,4 ; 30°C), n = 1	Diagramme de solubilité	Jullian <i>et al.</i> [37]
Rutine	250 (pH 7,4), n = 1 270	Chromatographie sur couche mince Fluorescence	Leder <i>et al.</i> [38] Haiyun <i>et al.</i> [39] Nguyen <i>et al.</i> [40]
Catéchine	20 (25°C) n = 1	Spectroscopie RMN	Jullian <i>et al.</i> [41]
Acide caféique	300 (pH 7 ; 20°C)	Fluorescence	Górnas <i>et al.</i> [42]
Acide chlorogénique	530 (pH 3,6; 25°C) 600 (pH 6,5; 25°C) 400 (pH 7; 20°C)	Spectrométrie UV-Vis RMN Fluorescence	Irwin <i>et al.</i> [43] Górnas <i>et al.</i> [42]
Hydroxytyrosol	90 (pH 7), n = 1	Spectroscopie RMN	López-García <i>et al.</i> [44]

I.1.3.2.2. Applications diverses

Compte tenu de leurs propriétés, les cyclodextrines trouvent des applications essentiellement dans l'industrie pharmaceutique (formulation de médicaments) et alimentaire (encapsulation des arômes) [45], mais également en agriculture et dans l'industrie textile, cosmétique ou chimique. Elles peuvent être utilisées dans les méthodes séparatives (séparation d'isomères et d'énantiomères) et dans les réactions catalytiques grâce à leur faculté à mimer les enzymes [31, 46].

Références bibliographiques

- [1] Vo L., Simonian H.P., Doma S., Fisher R.S., Parkman H.P. (2005). The effect of rabeprazole on regional gastric acidity and the postprandial cardia/gastro-oesophageal junction acid layer in normal subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. **21**: 1321-1330.
- [2] Tyssandier V., Reboul E., Dumas J.F., Bougteloup-Demange C., Armand M., Marcand J. *et al.* (2003). Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **284**: G913-G923.
- [3] Hoebler C., Lecannu G., Belleville C., Devaux MF., Popineau Y., Barry JL. (2002). Development of an in vitro system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 389-402.
- [4] Calbet J.A.L., Holst J.J. (2004). Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. *European Journal of Nutrition*. **43**:127-139.
- [5] Armand M., Borel P., Dubois C., Senft M., Peyrot J., Salducci J. *et al.* (1994). Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *American Journal of Physiology*. **266**: G372-G381.
- [6] Gorelik S., Lapidot T., Shaham I., Granit R., Ligumsky M., Kohen R., Kanner J. (2005). Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 3397-3402.
- [7] Gil-Izquierdo A., Zafrilla P., Tomas-Barberan FA. (2002). An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*. **214**: 155-159.
- [8] McDougall G.J., Dobson P., Smith P., Blake A., Stewart D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 5896-5904.
- [9] Miller D.D, Schricker B.R, Rasmussen R.R, Van Campen D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*. **34**: 2248-2256.
- [10] Meloun B., Moravek L., Kostka V. (2005). Complete amino acid sequence of human serum albumin. *Febs Letters*. **58** (1): 134-137.
- [11] Peters T. (1995). All about albumin. Biochemistry, genetics, and medical applications. *Academic press*.

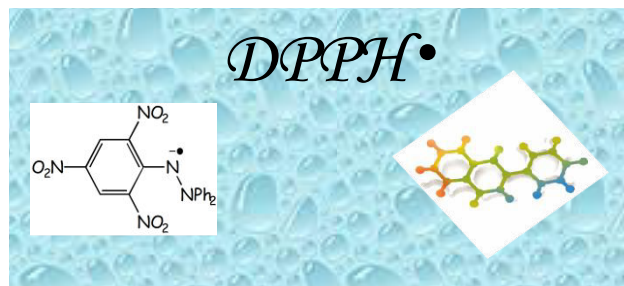
- [12] Alluis B. (2000). Modifications chimiques de flavonoïdes, étude de leurs pouvoirs complexant (protéines, métaux, pigments) et antioxydant. *Thèse : Université Claude Bernard de Lyon I*.
- [13] Dufour C., Dangles O. (2005). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta, General Subjects*. **1721**: 164-173.
- [14] Rawel HM, Frey SK, Meidtnr K, Kroll J, Schweigert FJ. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular Nutrition & Food Research*. **50**: 705-713.
- [15] Lu Q.h., Ba C.d., Chen D.y. (2008). Investigating noncovalent interactions of rutin - serum albumin by capillary electrophoresis - frontal analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **47**: 888-891.
- [16] Roy D., Dutta S., Maity S.S., Ghosh S., Roy A.S., Ghosh K.S., Dasgupta S. (2012). Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins. *Journal of Luminescence*. **132**: 1364–1375.
- [17] Adzet T., Camarasa J., Escubedo E., Merlos M. (1988). In vitro study of caffeic acid - BSA interaction. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. **13**: 11-14.
- [18] Prigent S.V.E, Gruppen H., Visser A., van Koningsveld G.A, de Jong G.A.H, Voragen A.G.J. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 5088-5095.
- [19] Rawel H.A, Meidtnr K., Kroll J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 4228-4235.
- [20] Pastukhov A.V., Levchenko L.A., Sadkov A.P. (2007). Spectroscopic study on binding of rutin to human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*. **842**: 60-66.
- [21] Papadopoulou A., Green R.J., Frazier R.A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 158-163.
- [22] Kang J., Liu Y., Xie M.X., Li S., Jiang M., Wang Y.D. (2004). Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. **1674**: 205-214.
- [23] Szejtli J. (1988). Cyclodextrin Technology. *Davies, J.E.D (Ed) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht*. 450 p.
- [24] Frömring K.H., Szejtli J. (1994). Cyclodextrins in Pharmacy. *Davies, J.E.D. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. 224 p.

- [25] Armspach D., Gattuso G., Königer R., Stoddart J.F. (1999). Cyclodextrins. In: *Bioorganic Chemistry : Carbohydrates*. Hecht, S.M. (Ed.), *Oxford University Press, Oxford*. 458-488.
- [26] Uekama K., Hirayama F., Irie T. (1998). **Cyclodextrin drug carrier systems**. *Chemical Reviews*. **98**: 2 045-2076.
- [27] Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. (2005). Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *APPS Pharmscitech*. **6**: E329-E357.
- [28] Cal K., Centkowska K. (2008). Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **68**: 467-478.
- [29] Brewster M.E., Loftsson T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **59**: 645-666.
- [30] Barillaro V., Dive G., Bertholet P., Evrard B., Delattre L., Frédérick M., Ziémons E., Piel G. (2008). Theoretical and experimental investigations of organic acids/cyclodextrin complexes and their consequences upon the formation of miconazole/cyclodextrin/acid ternary inclusion complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. **347**: 62-70.
- [31] Del Valle E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. **39**: 1033-1046.
- [32] Loftsson T., Jarho P., Másson M., Järvinen T. (2005). Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. **2**: 335-351.
- [33] Piel G., Moutard S., Perly B., Henry de Hassonville S., Bertholet P., Barillaro V., Piette M., Delattre L., Evrard B. (2004). Comparison of two methods currently used to determine the interaction between cyclodextrins and drugs: phase solubility diagrams and NMR spectroscopy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **14**: 87-91.
- [34] Freitas V., Carvalho E., Mateus N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*. **81**: 503-509.
- [35] Haslam E. (1998). Practical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action. *Cambridge University Press UK*. p420.
- [36] Malpezzi L., Fronza G., Fuganti C., Mele A., Bruckner S. (2004). Crystal architecture and conformational properties of the inclusion complex, neohesperidin dihydrochalcone-cyclomaltoheptaose (beta-cyclodextrin), by X-ray diffraction. *Carbohydrate Research*. **339**(12): 2117-2125.
- [37] Jullian C., Moyano L., Yañez C., Olea-Azar C. (2007). Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A*. **67**: 230-234.

- [38] Lederer M., Leipzig-Pagani E. (1996). A simple alternative determination of the formation constant for the inclusion complex between rutin and β -cyclodextrin. *Analytica Chimica Acta*. **329**: 311-314.
- [39] Haiyun D., Jianbin C., Shuang Z. G., Jinhao P. (2003). Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β -cyclodextrin with rutin. *Spectrochimica Acta Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **59**(14): 3421–3429.
- [40] Nguyen T.A., Liu B., Zhao J., Donald S., Hook J.M. (2013). An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*. **136**: 186–192.
- [41] Jullian C., Miranda S., Zapata-Torres G., Mendiza F., Olea-Azar C. (2007). Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+) catechin by NMR and molecular modeling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **15**: 3217–3224.
- [42] Gornas P., Grażyna Neunert., Krzysztof Baczyński., Krzysztof Polewski. (2009). Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chemistry*. **114**: 190–196.
- [43] Irwin P.L., Pfeffer P.E., Landis W. Doner L.W., Sapers G.M., Brewster J.D., Gerald Nagahashi G and Hicks K.B. (1994). Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydrate Research*. **256**: 13-27.
- [44] López-García M. Á., López O., Maya I., Fernández-Bolaños J.G. (2010). Complexation of hydroxytyrosol with β -cyclodextrins. An efficient photoprotection. *Tetrahedron*. **66**: 8006-8011.
- [45] Szenté L., Szejtli J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*. **15**: 137-142.
- [46] Schneiderman E., Stalcup A.M. (2000). Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **745**: 83-102.

Chapitre II:

Activité antioxydante des polyphénols



II. Activité antioxydante des polyphénols

Les données récentes sur la biodisponibilité et les effets santé potentiels des polyphénols montrent clairement la nécessité de reconsidérer leur activité antioxydante. Elle ne pourrait être que marginale dans les effets biologiques post-absorption en raison même des faibles concentrations circulantes (au mieux 1 μM) au regard de la capacité antioxydante totale du plasma (de l'ordre de 1 mM) mais aussi en raison de la forte conjugaison intestinale et hépatique des polyphénols qui typiquement abaisse fortement leur pouvoir réducteur. C'est la raison pour laquelle notre travail est focalisé sur la modélisation d'effets antioxydants avant absorption intestinale, c'est-à-dire dans le tractus digestif. Notre hypothèse est que c'est en ce site, où les formes natives peuvent s'accumuler en fortes concentrations, que l'étude de l'activité antioxydante des polyphénols prend tout son sens.

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour déterminer l'activité antioxydante d'aliments, d'extraits ou de composés individuels. Ces tests peuvent se diviser en deux catégories: les tests mesurant le transfert d'électrons ou d'hydrogène vers un radical coloré stable facile à détecter (DPPH, TEAC) et ceux faisant intervenir une compétition (ORAC, décoloration de β -carotène et de crocine) entre l'antioxydant et une cible à protéger (pigments, lipides). D'après une étude récente [1], 19 méthodes sont utilisées actuellement pour l'estimation *in vitro* du pouvoir antioxydant d'un échantillon et la méthode au DPPH^{*} représente le test le plus souvent adopté (Fig. II.1). Il est important de sélectionner et d'employer des méthodes fiables et rapides dans le but d'évaluer cette activité. A cet effet, le test choisi dans ce travail est la réduction du radical DPPH^{*} par les polyphénols en modèle simple de l'environnement gastrique.

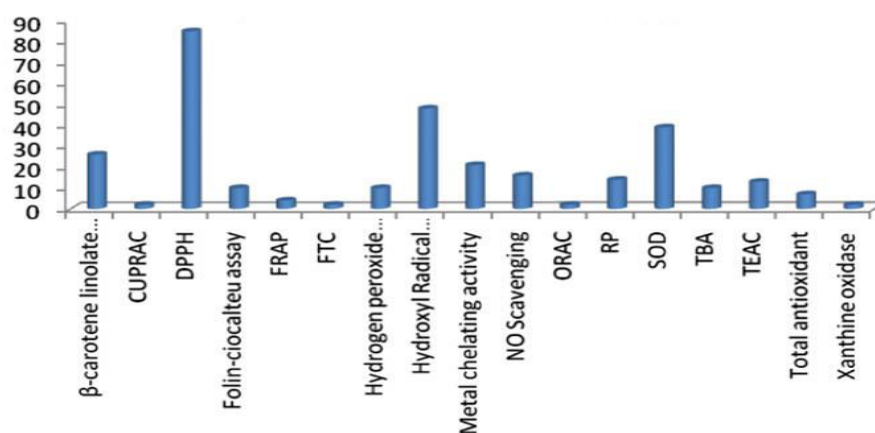


Figure II.1: Fréquence d'utilisation des méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante [1]

II.1. Test de réduction du radical stable DPPH•

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [2, 3]. Il possède un électron non apparié typiquement représenté sur l'atome d'azote adjacent au noyau picryle mais fortement délocalisé (Fig. II.2). Du fait de cette délocalisation et du volume stérique, le radical ne forme pas de dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH• [4].

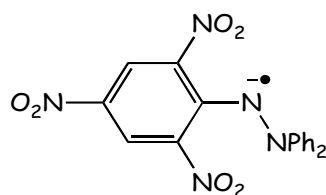


Figure II.2: Structure du radical stable DPPH•

Le radical DPPH• présente une bande d'absorption maximale à 515 nm dans le méthanol. Cette bande disparaît lors de la réduction du DPPH (en l'hydrazine correspondante) par un composé donneur d'atomes H (ArOH), selon l'éq.1 et la Figure II.3 [5, 6, 7].

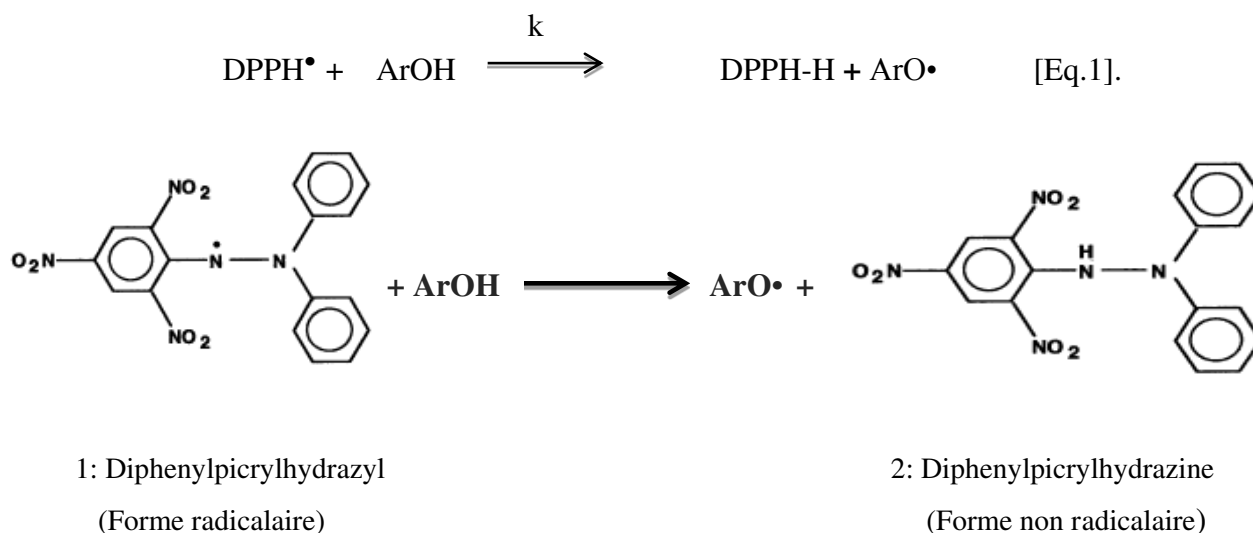


Figure II.3: Réduction du radical DPPH• [8]

Le composé à tester est ajouté à une solution méthanolique ou éthanolique de DPPH• en grand excès. Dans la version la plus simple du test, après 10 à 30 min de réaction dans le noir (durée nécessaire pour le transfert de tous les atomes H labiles), l'absorbance

résiduelle à 515 nm est enregistrée. La procédure est répétée en modifiant les concentrations du composé à tester [9].

Le potentiel donneur d'atomes H d'un échantillon est le plus souvent exprimé par le paramètre EC50 qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration initiale de DPPH•. Plus le EC50 est faible, plus l'antioxydant est efficace (plus grand nombre d'atomes H labiles), ce qui permet de déterminer des relations entre structure chimique et activité [10, 11]. Une analyse plus fine permet également de caractériser les antioxydants par des paramètres cinétiques. On peut ainsi déterminer la stoechiométrie totale (n_{tot} , inversement proportionnelle à EC50) de la réaction, soit le nombre de radicaux DPPH• réduits par molécule d'antioxydant mais aussi la constante de vitesse de transfert du premier atome H vers le DPPH• [12].

Du point de vue méthodologique, le test de capture du radical libre DPPH• est simple, rapide et peu coûteux [13]. Il est recommandé pour des composés contenant des atomes H labiles de type SH, NH et OH. Il s'effectue à température ambiante, ce qui permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles comme les polyphénols. Les résultats sont très reproductibles et comparables à d'autres méthodes telles que le test TEAC (capture du radical-cation ABTS•⁺, exprimé en équivalent Trolox). Cette méthode est largement utilisée pour tester l'activité antiradicalaire de jus de fruits et légumes ou d'extraits riches en composés phénoliques [1, 14, 15].

En conclusion, le DPPH est très commode pour une première évaluation d'antioxydants donneurs d'atomes H en milieu organique (méthanol ou éthanol). Toutefois, le point le plus délicat reste l'extrapolation des résultats à des situations d'intérêt biologique (ex. : action dans le tractus digestif) d'où la nécessité de remplacer les solvants organiques par un environnement aqueux incorporant une variété de biomolécules avec lesquelles les polyphénols sont susceptibles d'interagir.

II.2. Objectifs et enjeux

Les tests *in vitro* simples de détermination de l'activité antioxydante des polyphénols ont une portée limitée et sont difficilement extrapolables pour évaluer l'effet antioxydant des molécules après ingestion, ces composés étant transformés lors de leur séjour dans l'organisme. L'effet des polyphénols sur la protection antioxydante des tissus est influencé par leur biodisponibilité qui varie considérablement d'une molécule à une autre. L'ensemble des phénomènes de conjugaison que peuvent subir les polyphénols induit une modification de leur capacité antioxydante [16].

Les propriétés antioxydantes des polyphénols dépendent également de leur environnement physicochimique qui varie selon les conditions physiologiques et les tissus considérés. Une influence majeure des protéines plasmatiques comme l'albumine ainsi que des autres antioxydants présents a été mise en évidence [17, 18]. Ainsi, les propriétés bénéfiques des polyphénols sur la santé ne peuvent pas être expliquées seulement par leur potentiel antioxydant mesuré *in vitro*, dans des solvants organiques, et les tests de capacité antioxydante de ces molécules ont une faible valeur prédictive de leur effet *in vivo*.

C'est pour répondre à cette problématique que la priorité doit être de mettre au point des tests antioxydants modélisant au plus près les conditions prévalant in vivo.

Ce travail s'inscrit dans la perspective de développer un test antiradicalaire mettant en jeu des analyses cinétiques quantitatives des réactions de transfert d'atomes H des polyphénols au radical DPPH• dans un *milieu micellaire faiblement acide modélisant simplement l'estomac après ingestion d'un repas*. Afin d'appréhender au mieux les propriétés antioxydantes des composés phénoliques dans ce système, notre étude est complétée par la mise en évidence de l'influence de composants du bol alimentaire, tels que les protéines et les polysaccharides, sur la capacité de ces antioxydants à piéger des espèces radicalaires.

II.3. Matériels et méthodes

II.3.1. Réactifs

L'ensemble des réactifs utilisés lors des expériences est rassemblé dans le tableau XXV.

Tableau XXV: Liste de réactifs et solvants utilisés

	Réactifs	Pureté %	Fournisseur
Polyphénols	Quercétine dihydrate	98	Aldrich (Allemagne)
	(+)-Rutine hydrate	95	Aldrich (USA)
	(+) Catéchine hydrate	96	Fluka (Indonésie)
	Hydroxytyrosol	-	Sigma-Aldrich (USA)
	Acide chlorogénique	97	Aldrich (Allemagne)
	Oleuropéine	-	Aldrich (Allemagne)
Protéine	SAB (sérum albumine bovine)	96	Sigma
Polysaccharide	β -Cyclodextrine	-	Aldrich
Tampon acétate	Acide acétique glacial	-	Prolabo
	Acétate de sodium trihydraté	99	Alfa Aesar
Autres	Brij 35	-	Sigma Aldrich
	DPPH	90	Sigma
	Méthanol UV-Vis	99.9	-Merck

II.3.1. Analyses

Les réactions de transfert des atomes H des polyphénols sélectionnés (quercétine, catéchine, rutine, oléuropéine, hydroxytyrosol et acide chlorogénique) au radical DPPH[•] ont été suivies par spectroscopie UV-Visible (HP 8453 à barrettes de diodes). La température dans la cellule a été maintenue à 25°C au moyen d'un bain thermostaté. La solution du DPPH[•] a été préparée dans le tampon acétate (0.1M, pH 5) en présence du Brij 35 (détergent non ionique, 20 mM).

Les solutions de DPPH[•] (300 μ M) et de phénols (50 ou 150 μ M) ont été individuellement préparées dans le tampon acétate (0.1M, pH 5) en présence de Brij 35 (détergent non ionique, 20 mM). Le cas échéant, les solutions de phénols contenaient également de la BSA (250 μ M) ou de la β -CD (250 μ M). Dans 1 ml de la solution de DPPH[•] fraîchement préparée à 150 μ M et placé dans la cellule du spectrophotomètre, sont ajoutées 1 ml d'une solution de polyphénol dans le tampon acétate à pH 5 (rapport molaire DPPH[•]/polyphénol = 2 ou 6). La réaction de réduction est suivie dans le temps (mode cinétique), en présence et en absence de la protéine SAB et d'un modèle d'amidon (β -cyclodextrine) comme suit : les spectres sont enregistrés pendant 2 min à un intervalle de 0.5 s afin de déterminer les constantes de vitesse et les stœchiométries. Des cinétiques de 60 min ont été utilisées pour déterminer les stœchiométries totales.

II.3.2. Analyse des données (*curve fitting*)

Le traitement des données par des procédures d'ajustement de courbes (*curve fitting*) exprimant la variation de l'absorbance en fonction du temps (détermination des constantes de vitesse) a été réalisé sur un PC à l'aide du programme *Scientist* (MicroMath, Salt Lake City, USA) après implémentation dans les modèles des conditions initiales de concentrations et des équations adéquates déduites de la loi de Beer-Lambert et des lois de la cinétique chimique (voir plus loin). Les courbes théoriques sont ajustées aux courbes expérimentales par régression non linéaire selon la méthode des moindres carrés. Pour l'analyse statistique, seules les données ayant un coefficient de corrélation > 0.99 , ont été prises en compte. Le calcul de la moyenne et de l'écart type est réalisé avec Excel 2010. Pour chaque antioxydant, les résultats correspondants, constantes de vitesse et stœchiométries, représentent la moyenne de trois essais.

II.4. Résultats et discussion

Le DPPH[•], un radical organique libre et stable, est très utilisé pour l'estimation de la capacité antioxydante. Par ailleurs sa très faible solubilité dans l'eau limite son application en solution aqueuse. De ce fait, nous avons opté pour l'incorporation du DPPH[•] dans un milieu micellaire faiblement acide pour améliorer sa solubilité et nous rapprocher des conditions gastriques. L'évaluation du pouvoir antioxydant dans ce système est plus pertinente que dans les solvants organiques typiquement utilisés (méthanol et éthanol) et permettra d'incorporer dans le modèle des protéines et polysaccharides.

II.4.1. Solubilisation du DPPH[•] en milieu aqueux

Dans un premier temps, la solubilisation du DPPH[•] en milieu aqueux en présence d'un détergent a été évaluée et les résultats sont présentés sur la Figure II.4. Six solutions de DPPH[•] (25 - 200 μM) dans le tampon acétate (0.1 M, pH 5) en présence de 20 mM de Brij 35 ont été analysées à 529 nm. Une bonne linéarité concentration - absorbance a été observée jusqu'à 150 μM , puis l'absorbance de la solution de DPPH[•] sature, probablement en raison de phénomènes d'agrégation. Ainsi, grâce au détergent non ionique Brij 35 [$\text{C}_{12}\text{H}_{25}-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{23}-\text{OH}$], le radical DPPH[•] a été solubilisé en milieu aqueux à une concentration adéquate de 150 μM , à laquelle toutes les expériences ont été effectuées. En effet, à cette concentration, nous remarquons une absorbance stable et reproductible. Ainsi, le coefficient d'absorption molaire a pu être calculé : $\epsilon^{529 \text{ nm}} = 10700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

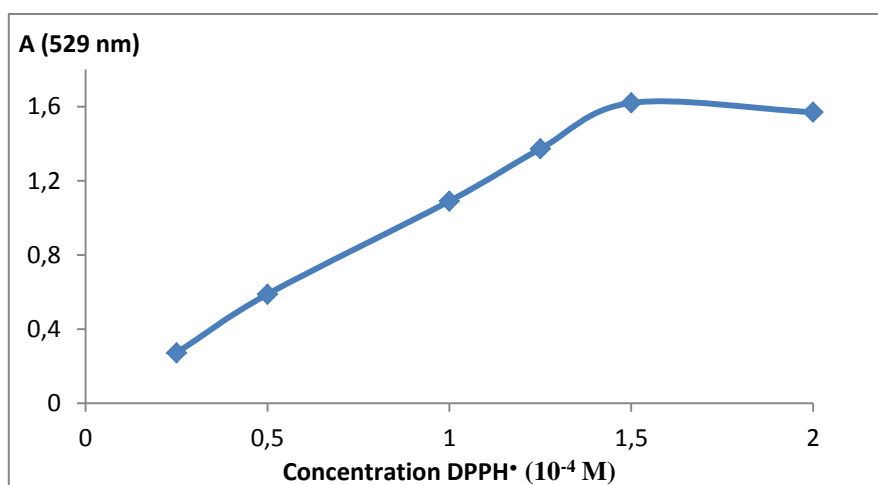


Figure II.4: Solubilisation du radical DPPH• en tampon acétate (pH 5) en présence du détergent Brij 35 (20 mM)

II.4.2. Caractéristiques spectrales du DPPH• dans le système micellaire

Le spectre d'absorbance du DPPH• dans le tampon acétate (0.1 M, pH 5) en présence de Brij 35 (20 mM) est présenté dans la Figure II.5. Il est à noter que l'absorption maximale de DPPH• est à 529 nm, avec un coefficient d'absorption molaire de $10700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ce résultat est en accord avec les caractéristiques spectrales du DPPH• dans le méthanol rapportées par Goupy *et al.* [12] et Noipa *et al.* [19] comme suit: $\epsilon = 11240 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 515 nm et $\epsilon = 10730 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 516 nm, respectivement. Le décalage du maximum d'absorption de 515 nm à 529 peut être dû à la diminution de la polarité du milieu environnant les molécules de DPPH• [19, 20].

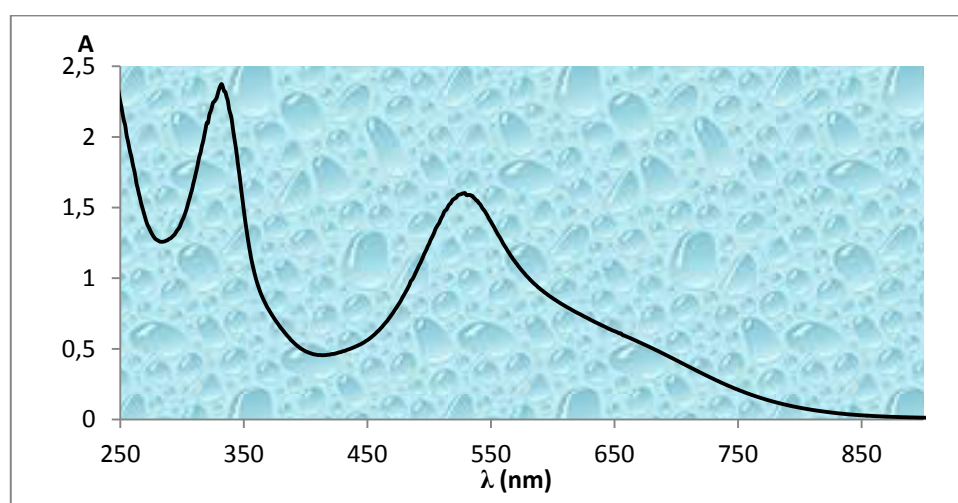
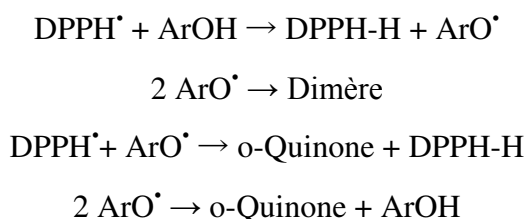


Figure II.5: Spectre d'absorption du DPPH• (1.5 mM) dans le tampon acétate (0.1 M, pH 5) en présence du Brij 35 (20 mM)

Puisque la sensibilité de la méthode, exprimée par l'absorption molaire du DPPH•, est très satisfaisante, l'estimation de l'activité scavenger des antioxydants en milieu aqueux peut être effectuée par mesure de la diminution de l'absorbance à 529 nm, donc de la même manière que dans la version classique du test DPPH• en solution méthanolique.

Après l'ajout d'une série d'antioxydants (quercétine, catéchine, rutine, oléuropéine, hydroxytyrosol et acide chlorogénique), l'absorbance visible décroît rapidement pendant 1 à 2 min à la suite du transfert des atomes H les plus labiles de l'antioxydant. Cette étape est généralement suivie d'une diminution beaucoup plus lente de l'absorbance visible, mettant en évidence la capacité des produits de dégradation de l'antioxydant à transférer les atomes H résiduels [21, 22].

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants peut opérer selon deux types de mécanismes: (i) le transfert de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle; (ii) le transfert d'un électron à partir de la fraction d'ion phénate présente dans le milieu [23-25]. Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles selon le devenir du radical aryloxy (Ar-OH: composé phénolique, typiquement un noyau catéchol) [15] :



La quinone elle-même est typiquement instable et peut conduire à des dimères ou réagir avec des nucléophiles présents dans le milieu. Ces composés (dimères, adduits quinone-nucléophile) sont susceptibles d'exprimer une activité antioxydante résiduelle.

Pour comparer les cinétiques obtenues, un modèle théorique établi par **Goupy et al.** [12] a été utilisé. Ce modèle permet de calculer k_1 , la constante de vitesse pour la capture du premier atome H de l'antioxydant et n , la stœchiométrie de l'antioxydant (le nombre de moles de radicaux piégés par mole d'antioxydant), qui n'est qu'une estimation partielle sur la durée de la cinétique. Seul le premier stade de la réaction (étape rapide) a fait l'objet d'une analyse cinétique détaillée. En revanche, les cinétiques sur une période d'une heure sont utilisées pour la détermination de la stœchiométrie totale (n_{tot}) des polyphénols testés, qui est l'équivalent de n quand la réaction est supposée complètement terminée (**Eq. 2**).

$$n_{\text{tot}} = (A_0 - A_f) / \epsilon c \quad [\text{Eq. 2}]$$

- Où :
- A_0 : Absorbance initiale de la cinétique ;
 - A_f : Absorbance finale de la cinétique ;
 - c : Concentration initiale de l'antioxydant;
 - ϵ : Coefficient d'absorption molaire à 529nm.

NB: pour l'application de l'Eq 2, le DPPH• doit être en fort excès. Plus précisément, le rapport molaire initial DPPH• / antioxydant ($A_0 / \epsilon C$) doit être supérieur à n_{tot} .

II.4.3. Modèle cinétique

Afin d'analyser les réactions de transfert des atomes H entre le DPPH• et un antioxydant donné au cours de l'étape rapide (1-2 min), un modèle simple, sans hypothèse sur le mécanisme de dégradation de l'antioxydant, peut être utilisé. Un antioxydant de stœchiométrie n est simplement considéré comme n sous-unités indépendantes, notées AH, qui transfèrent un seul atome H au radical DPPH• avec la même constante de vitesse k [22, 26]. Ainsi, les équations 3 et 4 peuvent être utilisées dans les procédures d'ajustement des courbes exprimant l'absorbance en fonction du temps (A : absorbance à un temps t ; A_0 : absorbance initiale de la cinétique; c : concentration initiale de l'antioxydant; c_0 : concentration initiale du DPPH•; C : concentration initiale des sous-unités AH; $C = nc$).

$$A = \epsilon [\text{DPPH}\bullet] \quad [\text{Eq 3}]$$

$$R = -\frac{d}{dt} [\text{ArOH}] = -\frac{d}{dt} [\text{DPPH}\bullet] = k [\text{ArOH}] [\text{DPPH}\bullet] \quad [\text{Eq 4}]$$

Ainsi la vitesse initiale de consommation du radical DPPH• peut s'écrire : $R_0 = kncc_0 = k_1cc_0$, k_1 étant la constante de vitesse du transfert du premier atome H de l'antioxydant testé vers le radical DPPH•. Donc, la constante k peut être identifiée à k_1/n . L'analyse des données (*curve fitting*) a été réalisée avec les deux paramètres à optimiser n et k_1 , puisque cette dernière permet une comparaison plus simple entre les antioxydants que k .

Les résultats des analyses cinétiques quantitatives des réactions de transfert d'atomes H des polyphénols (quercétine, rutine, catéchine, acide chlorogénique, oléuropéine, hydroxytyrosol) au radical DPPH• sont rassemblés dans le tableau XXVI.

Tableau XXVI: cinétiques de transfert d'atomes H des polyphénols testés vers le radical DPPH• (tampon acétate 0.1 M, Brij 35 20 mM, pH 5, 25°C, N = 3)

Antioxydants	$k_1 / M^{-1}s^{-1}$	n (partiel)	n (total)
SAB	6.6 ± 0.1	-	1.66 ± 0.03
Quercétine	3716 ± 251	$1,75 \pm 0,02$	$5,05 \pm 0,01$
Quercétine + SAB	2775 ± 35	$1,63 \pm 0,01$	$4,65 \pm 0,02$
Quercétine + β -CD	881 ± 108	$1,81 \pm 0,20$	$4,20 \pm 0,10$
Rutine	2917 ± 10	$1,39 \pm 0,01$	$3,65 \pm 0,06$
Rutine + SAB	1781 ± 16	$1,59 \pm 0,01$	$3,38 \pm 0,03$
Rutine + β -CD	1746 ± 92	$1,38 \pm 0,02$	$3,75 \pm 0,15$
Catéchine	1689 ± 112	$1,59 \pm 0,06$	$3,56 \pm 0,13$
Catéchine + SAB	1303 ± 66	$1,55 \pm 0,07$	$2,63 \pm 0,29$
Catéchine + β -CD	1112 ± 20	$1,32 \pm 0,20$	$3,91 \pm 0,07$
Acide chlorogénique	2556 ± 176	$1,61 \pm 0,01$	$2,99 \pm 0,11$
Acide chlorogénique + SAB	1904 ± 74	$1,71 \pm 0,02$	$2,97 \pm 0,07$
Acide chlorogénique + β -CD	2502 ± 11	$1,65 \pm 0,01$	$2,08 \pm 0,21$
Oleuropéine	3703 ± 246	$1,67 \pm 0,01$	$2,81 \pm 0,05$
Oleuropéine + SAB	4960 ± 244	$1,65 \pm 0,01$	$3,63 \pm 0,07$
Oleuropéine + β -CD	3359 ± 156	$1,66 \pm 0,01$	$3,06 \pm 0,21$
Hydroxytyrosol	1808 ± 69	$1,61 \pm 0,01$	$2,78 \pm 0,03$
Hydroxytyrosol + SAB	2103 ± 146	$1,73 \pm 0,01$	$3,16 \pm 0,09$
Hydroxytyrosol + β -CD	1912 ± 46	$1,67 \pm 0,04$	$2,94 \pm 0,21$

- La constante de vitesse k_1 et la stœchiométrie partielle n sont obtenues avec 2 equiv. DPPH
- La stœchiométrie totale (n_{tot}) est calculée à partir de Eq 2 après 60 min de réaction avec 6 equiv. DPPH

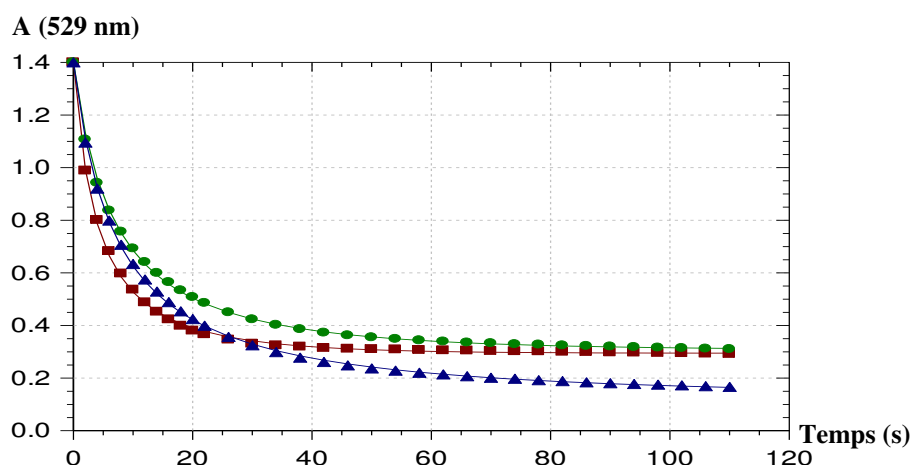


Figure II.6: Tracé de l'absorbance du radical DPPH à 529 nm en fonction du temps après addition de rutine. Les courbes en trait plein sont le résultat de la procédure de *curve fitting*. DPPH: 150 μ M, rutine: 75 μ M dans tampon acétate pH 5 en présence de Brij 35 (20 mM). ■: rutine, ●: 1 rutine + β -CD (250 μ M), ▲: rutine + BSA (250 μ M).

Au terme de l'étape rapide (**Fig. II.6**), le nombre de moles de DPPH réduites par mole d'antioxydant (n partiel) est environ de 2, ce qui correspond au transfert des 2 atomes H labiles des noyaux catéchol. Par ailleurs, les stœchiométries totales (n_{tot}) des différents polyphénols étudiés sont de l'ordre de 3 à 5 radicaux DPPH piégés par molécule d'antioxydant.

Les valeurs de k_I relativement élevées confirment que tous les polyphénols sélectionnés sont de bons donneurs d'atomes H. En effet, par arrachement d'un 1^{er} atome H, les polyphénols porteurs d'un groupement catéchol (1,2-dihydroxybenzène) sont transformés en *ortho*-semiquinones, qui sont des radicaux relativement stables grâce à la délocalisation des électrons et à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire [**12, 27, 28**]. Toutefois, la quercétine ($k_I \approx 37 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et la rutine ($k_I \approx 29 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), sont de meilleurs donneurs d'atomes H que la catéchine ($k_I \approx 17 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), ce qui souligne le rôle favorable de la conjugaison des cycles B et C dans la stabilisation du radical semiquinone. En outre, la quercétine a une stœchiométrie totale plus importante ($n_{\text{tot}} = 5$) que celle de la rutine et de la catéchine ($n_{\text{tot}} \approx 4$), ce qui confirme le rôle de C3-OH dans les réactions de transfert d'atomes H.

II.4.4. Relations structure - activité

Nos résultats sont en accord avec les relations établies entre la structure des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres. En effet, de nombreuses études convergent pour proposer que l'activité dépend essentiellement de trois critères, représentés dans le schéma ci-dessous [**29, 30**].

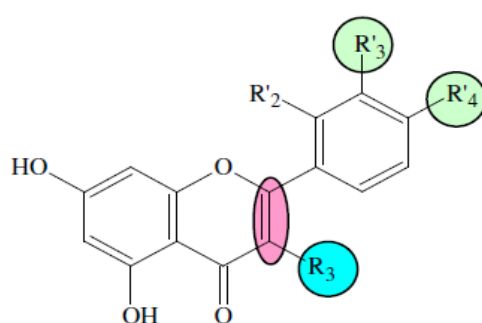


Figure I.7: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

- (1) La présence d'un cycle B de type catéchol (3',4'-dihydroxy) ;
 - (2) La double-liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4-oxo ;
 - (3) La présence du groupement 3-OH en combinaison avec la double-liaison C2-C3.
- La quercétine combine ces trois critères structuraux et se révèle bien la plus active.

La rutine est moins active en accord avec sa stabilité bien plus importante vis-à-vis de l'oxydation. En effet, la glycosylation du groupement OH du cycle C abaisse fortement le caractère réducteur du noyau flavonol [31, 32], ce qui va de pair avec une baisse de l'activité antioxydante.

Le même résultat a été obtenu par **Rice-Evans *et al.* [29]**, qui ont rapporté que l'activité de réduction du radical $ABTS^{\bullet+}$ par la quercétine est deux fois plus élevée que celle de la catéchine et de la rutine (**Fig. II.8**).

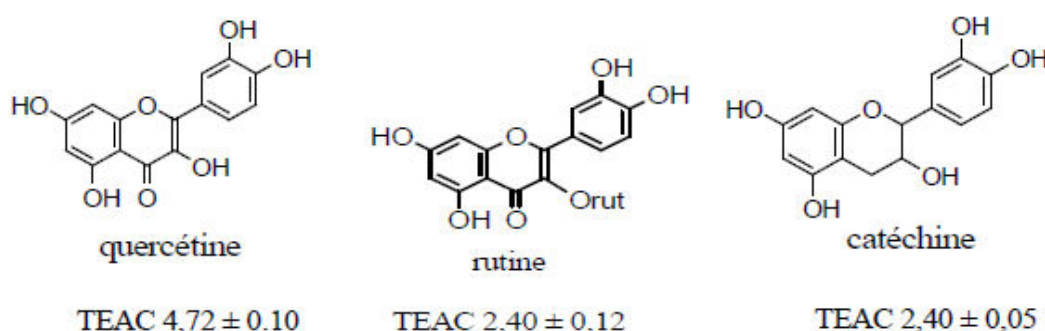


Figure II.8: Réduction du radical $ABTS^{\bullet+}$ par la quercétine, la rutine et la catéchine, capacité exprimée en equiv. Trolox (plus la valeur de TEAC est élevée, plus la molécule est active).

II.4.5. Mécanisme d'oxydation

Les polyphénols ayant des stœchiométries élevées ont une capacité importante à piéger les radicaux libres par transferts multiples d'atomes H ou d'électrons du phénol de départ et de certains de ses produits d'oxydation, comme dans le cas de la quercétine [33]. Les données de la littérature sur les voies d'oxydation des flavonoïdes permettent d'interpréter les différences observées.

II.4.5.1. Quercétine

Les voies générales de dégradation oxydante de la quercétine lors du piégeage du radical $DPPH^{\bullet}$ ont été proposées par **Goupy *et al.* [12]**. La figure II.9 représente les mécanismes d'oxydation possible de la quercétine. Le radical aryloxy est généré par l'arrachement d'un atome d'H sur l'un des OH les plus labiles de la quercétine (O3-H, O3'-H, O4'-H). L'arrachage d'un second atome H ou la dismutation des radicaux aryloxy conduit à une *o*-quinone et une *p*-méthylènequinone tautomères. Deux voies distinctes sont alors possibles selon le nucléophile (eau ou quercétine) :

Suite à l'addition d'une molécule d'eau sur l'intermédiaire *p*-méthylènequinone, il se forme un composé de type benzopyranone, rapidement converti en une forme plus stable de structure benzofuranone. La coupure oxydante de celle-ci conduit aux acides protocatéchique (3,4- dihydroxybenzoïque) et 2,4,6-trihydroxyphénylglyoxylique [34]. En présence de fortes concentrations de flavonol, la quercétine elle-même peut jouer le rôle du nucléophile. Son addition via le noyau catéchol sur la *p*-méthylènequinone entraîne la formation d'un dimère [33].

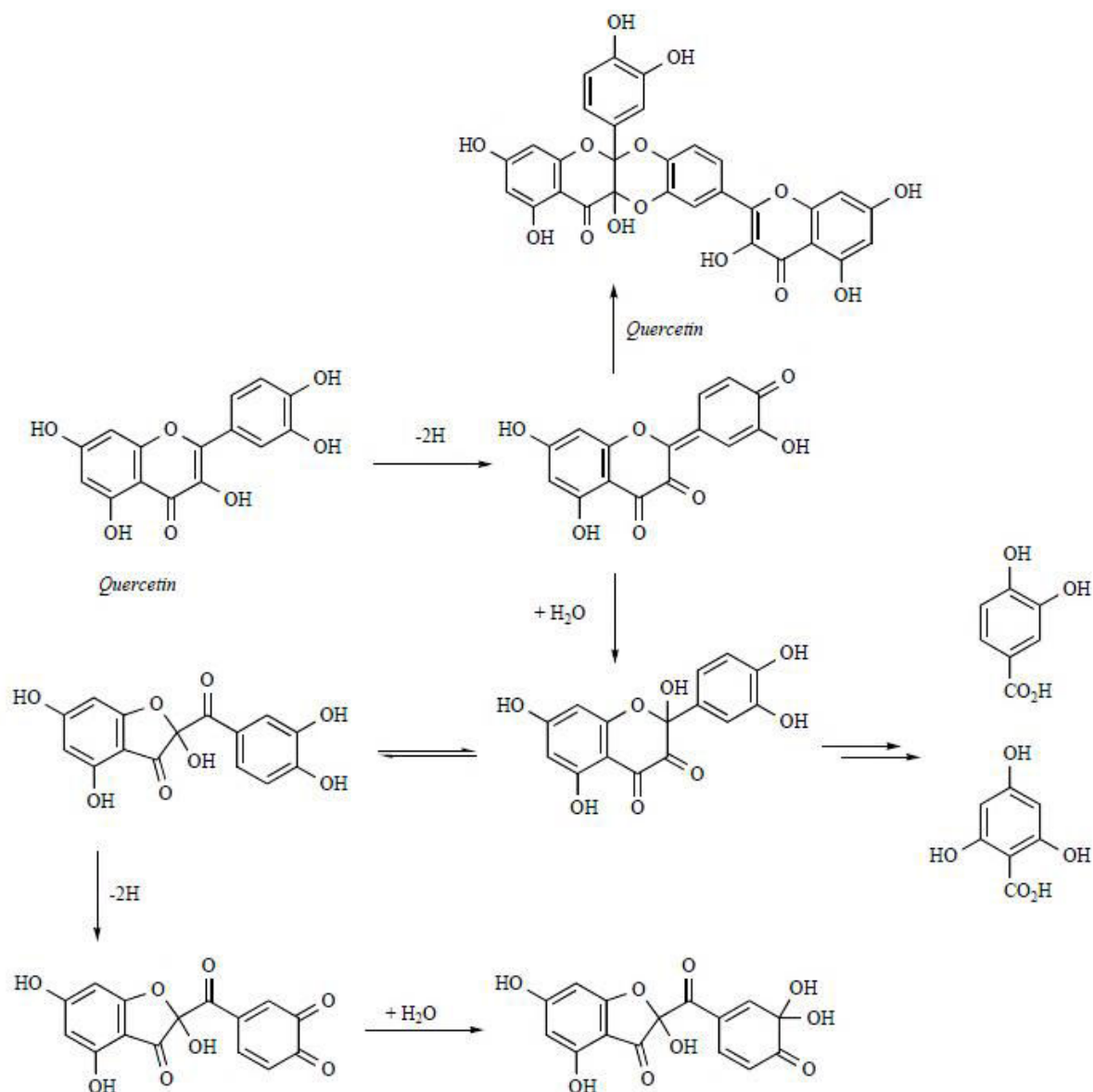


Figure II.9: Mécanisme générale d'oxydation de la quercétine [28].

Les cascades réactionnelles (**Fig. II.9**) avec régénération des groupements catéchol riches en électrons, de même que la formation de simples produits de clivage (acide 3,4-dihydroxybenzoïque) avec une activité de transfert d'atome H résiduelle, permettent de comprendre les stœchiométries élevées observées dans les réactions antiradicalaires des flavonoïdes les plus efficaces [12]. Les étapes d'oxydation de la quercétine semblent assez générales et ont été effectivement mises en évidence dans des émulsions lipidiques [36] et des complexes avec la sérum albumine [37].

Les produits d'oxydation de la quercétine, notamment le dérivé benzofuranone et l'acide protocatéchique, possèdent un pouvoir antioxydant propre. Ils contribuent au pouvoir antioxydant global de ce flavonol, ce qui explique pourquoi la quercétine est un très bon antioxydant en général, dont l'effet protecteur peut persister même après sa consommation totale.

II.4.5.2. Catéchine

Lors de son oxydation, l'évolution principale de la catéchine est la dimérisation (**Fig. II.10**). En effet, deux dimères oxydés ont été caractérisés dans des travaux antérieurs [36, 39]. La voie d'oxydation proposée par **Dangles et al.** [40] quand la catéchine réagit avec le DPPH dans le méthanol peut être aussi proposée dans le milieu micellaire: un transfert de deux atomes H de la catéchine (CatH₂) au DPPH pour former l'o-quinone (Cat) qui subit (sur les atomes électrophiles C-2' et C-6') l'attaque nucléophile du carbone C-6 ou C-8 d'une 2^e unité CatH₂ avec formation d'un dimère incolore de type biaryle.

Le noyau catéchol nouvellement formé s'oxyde à son tour et la p-méthylènequinone ainsi formée subit l'addition nucléophile intramoléculaire de groupes OH à proximité (**Fig. II.10**) [38, 39]. Dans les deux types de dimères, un noyau catéchol est présent, ce qui laisse supposer qu'ils possèdent des propriétés antioxydantes. Ils sont effectivement consommés à leur tour et doivent donc contribuer à l'activité réductrice globale de la catéchine.

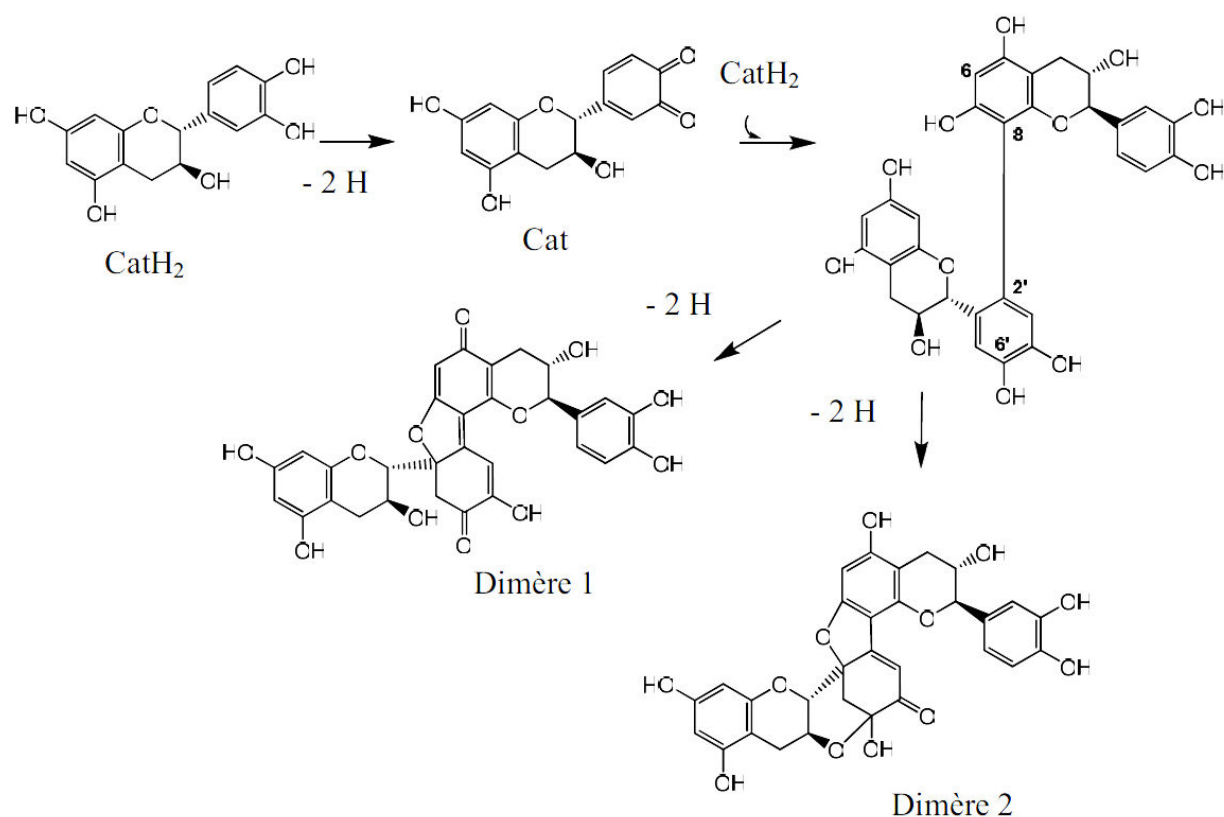


Figure II.10: Mécanisme général d'oxydation de la catéchine.

II.4.5.3. Rutine

Il n'existe à l'heure actuelle aucune information sur la structure des produits d'oxydation de la rutine. Seul l'intermédiaire *o*-quinone, formé lors de l'oxydation de la rutine par le DPPH, a été mis en évidence [22, 34, 41].

D'après les travaux de Nkhili [42], les analyses CLHP-SM ont montré que les produits d'oxydation de la rutine en présence de H₂O₂ et des ions du cuivre sont des produits d'addition de solvant (H₂O ou MeOH) sur le cycle B de l'intermédiaire *o*-quinone résultant de l'oxydation biélectronique de la rutine. Ainsi un mécanisme d'oxydation éventuel de la rutine au cours de sa réaction avec le radical DPPH• a été proposé et schématisé dans la figure II.11.

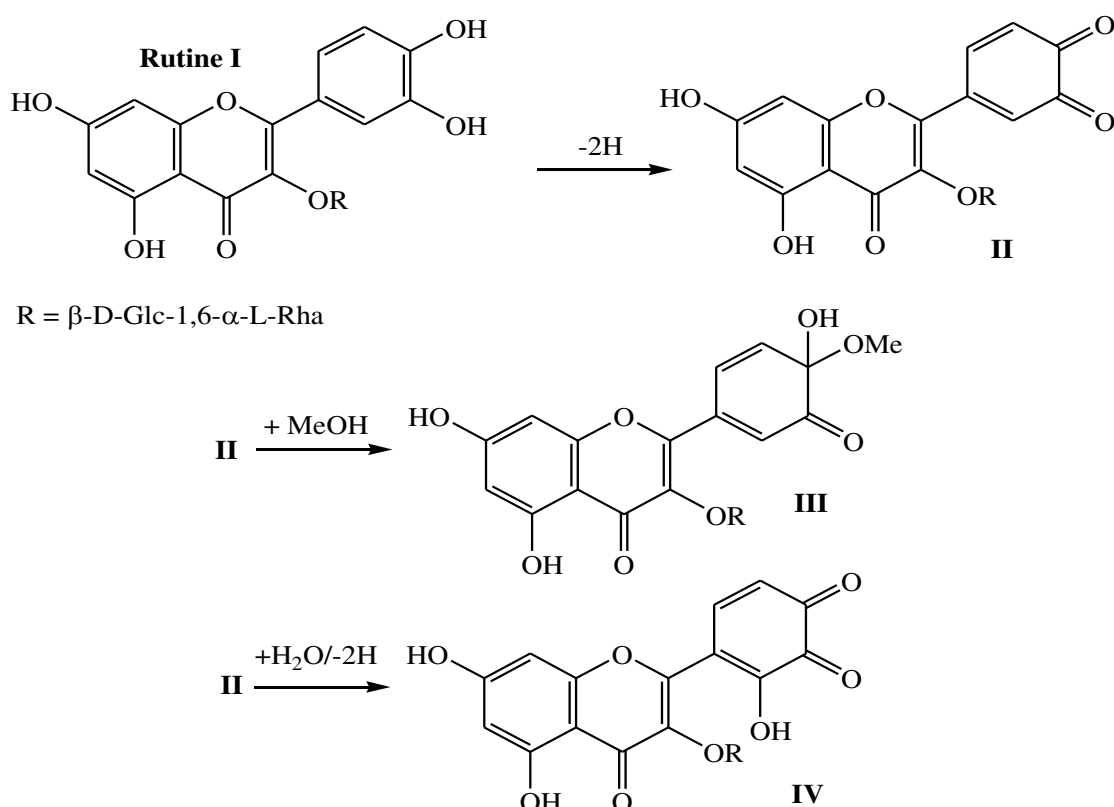


Figure II.11: Proposition de structures pour les produits d'oxydation de la rutine (II – IV) [42]

Les produits **III** et **IV** correspondent à l'addition de solvant (MeOH ou H₂O) sur l'*o*-quinone formée par oxydation à deux électrons de la rutine suivie d'une ré-oxydation éventuelle (produit **IV**). Les sites d'addition de solvant sont hypothétiques mais permettent de proposer une structure pour certains fragments. On peut noter que la présence du résidu rutinose empêche la formation d'un intermédiaire de type *p*-méthylènequinone comme dans le cas de la quercétine. Du coup, l'addition de solvant sur le cycle C avec forte déconjugaison n'a pas lieu. L'addition du solvant a vraisemblablement lieu sur le cycle B avec maintien d'une forte conjugaison d'où l'absorption des produits **III** et **IV** au-delà de 300 nm.

Cependant, en l'absence de H₂O₂, l'analyse par CLHP ultra-rapide avec détection par SM de type trappe d'ions montre que l'autoxydation de la rutine induite par Cu^{II} conduit à un mélange complexe de dimères (résultats en cours de publication par l'équipe). Ces résultats sont en accord avec les produits identifiés par oxydation enzymatique de la quercétine 3-O- β -D-glucoside [43]. Ainsi, l'addition d'une 2^e molécule de rutine sur l'*o*-quinone II semble également une voie majeure dans la formation des produits d'oxydation terminaux de la rutine.

Les données quantifiant la capacité des polyphénols alimentaires (quercétine, rutine, catéchine, acide chlorogénique) à capter le radical DPPH• dans différents milieux sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Tableau XXVII : Réactivité des polyphénols avec le radical DPPH dans différents milieux à 25°C

Polyphénols	Quercétine	Rutine	Catéchine	Acide chlorogénique
$k_1 / M^{-1} s^{-1}$	723 (± 15) ^a	669 (± 9) ^a	1293 (± 38) ^a	363 (± 4) ^a
	3347 (± 56) ^b	1028 (± 56) ^b	-	-
	3716 (± 251) ^c	2917 (± 10) ^c	1689 (± 112) ^c	2556 (± 176)
n (partiel)	3.19 (± 0.02) ^a	2.12 (± 0.01) ^a	2.12 (± 0.01) ^a	2.19 (± 0.02) ^a
	2.02 (± 0.01) ^b	1.91 (± 0.01) ^b	-	-
	1.75 (± 0.01) ^c	1.39 (± 0.01) ^c	1.59 (± 0.06) ^c	1.61 (± 0.01) ^c
n (total)	6.9 ^a	5.9 ^a	2.0 – 2.5 ^a	2.19 ^a
	5.05 ^c	3.65 ^c	3.56 ^c	3.56 ^c

^a Dans MeOH [12, 22]

^b Dans MeOH-tampon phosphate pH 7.4 (1:1) [40]

^c Dans tampon acétate pH 5 + Brij 35 (20 mM)

Ces résultats mettent en évidence une réactivité variable de ces polyphénols vis-à-vis du radical DPPH• d'un milieu à un autre. Ainsi, les paramètres cinétiques (constante de vitesse k_1 , stoechiométries n et n_{tot}) varient comme suit: $k_1^c > k_1^b > k_1^a$ et $n, n_{tot}^a > n, n_{tot}^b > n, n_{tot}^c$.

Les constantes de vitesse de transfert d'atomes H des différents phénols sont influencées par la nature du solvant [44] quelle que soit la nature des radicaux libres piégés [45]. En particulier, les réactions en milieu protique sont ralenties par la formation de liaisons hydrogène entre les groupements OH des phénols et les molécules de solvant. Par ailleurs, les réactions en milieu micellaire apparaissent plus rapides. De même, **Noipa et al.** [19] ont rapporté que le taux de capture du radical DPPH• par les polyphénols est plus important en solution micellaire que dans le méthanol en raison de l'incorporation du DPPH à l'intérieur du coeur hydrophobe de la micelle (**Fig. II.12**), ce qui amène le transfert d'atomes H à se dérouler dans un environnement moins polaire. **Chat et al.** [41] ont également montré que la rutine solubilisée en présence de Brij 35 interagit avec les micelles par son cycle B (**Fig. II.13**). De ce fait, le flavonol oriente son unité antioxydante (noyau catéchol) vers le radical DPPH, ce qui facilite le transfert d'atomes H.

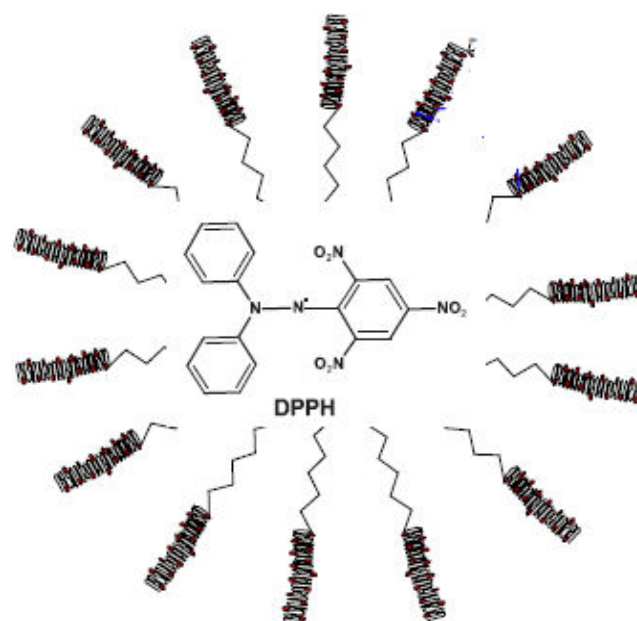


Figure II.12: Positionnement du DPPH• dans une micelle de Brij 35

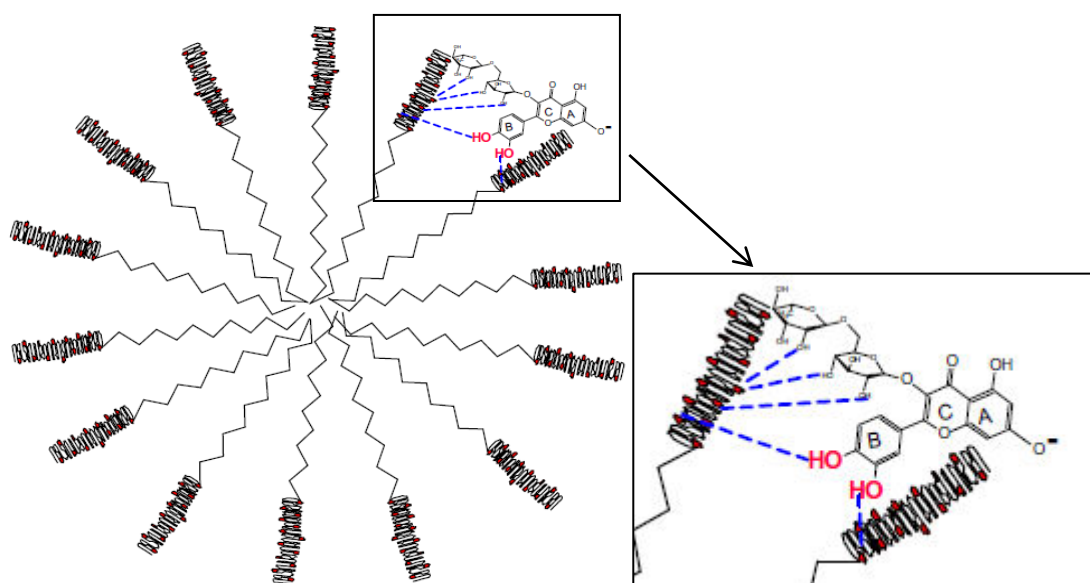


Figure II.13: Positionnement de la rutine dans une micelle de Brij 35 [41].

A la lumière des résultats d'analyse cinétique du pouvoir antioxydant du DPPH•, en présence de la protéine SAB et du polysaccharide β -cyclodextrine (**Tab. XXVI**), nous constatons clairement que l'impact de présence de ces deux composants alimentaires sur le caractère réducteur des polyphénols testés est assez faible. Il est en outre plus net sur k_1 que sur la stoechiométrie. Nous pouvons en donner les interprétations suivantes:

Les flavonoïdes (quercétine, rutine, catéchine) semblent interagir assez fortement avec la β -CD ou la SAB d'où un ralentissement significatif. Cependant, nous pouvons noter que la

présence de Brij et le pH acide peuvent affecter les valeurs des constantes de liaison K , surtout avec la SAB (dénaturation partielle de la protéine, changement dans l'état de charge), d'où la difficulté de comparer avec les données de la littérature. En effet, aux alentours de pH 5, l'albumine subit une modification de sa charge globale ($pH_i = 4,7 - 4,9$) ainsi que des changements réversibles de configuration, mis en évidence par son comportement électrophorétique [46].

A partir des travaux antérieurs, les constantes d'association pour la complexation de la SAB par la quercétine, la rutine et la catéchine ont été déterminées: **Rawel et al.** ont mis en évidence une diminution de l'affinité de la quercétine pour la SAB de $K= 110 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 7 à $K= 41,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 5 [47]. Par ailleurs, Dufour et Dangles ont observé que K diminue de $134 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à $86 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ quand le pH varie de 7,4 à 5 [48]. **Art et al.** ont utilisé le test TEAC pour comparer la capacité réductrice de la quercétine et de son complexe avec la SAB. qui présente un pouvoir antioxydant inférieur à celui du flavonol libre, mettant ainsi en évidence un phénomène de «masquage» [49]. Par ailleurs l'affinité de la rutine pour la SAB est estimée à $K= 1,6 - 11 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 7,4 [48, 50] et celle de la catéchine à $K= 3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 7,2 [50]. Une réduction modérée de l'activité de capture du radical DPPH• par l'acide chlorogénique a été aussi montrée, avec des valeurs de la constante de liaison à la SAB s'échelonnant de 5 à $16 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 7 - 7,4 telles que rapportées par **Rawel et al. & Prigent et al.** [47, 52] respectivement.

Le caractère donneur d'atomes H des flavonols, quercétine et rutine, au radical DPPH• en présence de la β -CD s'est révélé inférieur au pouvoir antioxydant individuel des deux polyphénols. Le complexe d'inclusion de la quercétine au sein de la β -CD est 2 à 3 fois plus stable que celui de la rutine : $K= 600 \text{ M}^{-1}$ et $K= 250 \text{ M}^{-1}$ à pH 7,4 respectivement [53, 54]. Ainsi, la β -CD entraîne un ralentissement notable (un facteur 4) du transfert d'atomes H de la quercétine au DPPH alors que l'effet est faible avec la rutine. Curieusement, en solution non micellaire (mélange MeOH - eau, 1:4), **Jullian et al.** [53] ont constaté une activité antioxydante (test DPPH•) plus forte pour le complexe quercétine - β -CD (1:1) que pour le phénol libre. Enfin, nous remarquons une faible influence de la β -CD sur l'activité de la catéchine, qui est confirmée par la plus faible constante d'association : $K = 20 \text{ M}^{-1}$ [55].

Le pouvoir antioxydant reste inchangé pour l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et l'acide chlorogénique : il n'y a donc pas d'influence significative de la SAB ou la β -CD sur l'activité de

ces phénols. A notre connaissance, aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature concernant l'interaction de ces phénols avec la protéine SAB.

L'absence d'effet de la β -CD sur l'activité de l'hydroxytyrosol est en bonne adéquation avec la constante de stabilité faible du complexe correspondant: $K = 90 \text{ M}^{-1}$ [56]. Par contre, l'acide chlorogénique a une affinité notable pour la β -CD : $K = 400$ à 600 M^{-1} selon Górnas *et al.* [57] et Irwin *et al.* [58], respectivement. Malgré cette association, **Zhao *et al.*** n'ont observé aucune différence significative entre le pouvoir antiradicalaire de l'acide chlorogénique et celui de son complexe [59], ce qui est en accord avec le résultat de ce travail. Ces données suggèrent une absence de « masquage » des noyaux catéchol de ces phénols par la β -CD, au cours de leurs réactions avec le radical DPPH•.

La stœchiométrie totale de la SAB elle-même est de l'ordre de 1,66 (**Tab. XXVI**) du fait de la réactivité de son unique résidu cystéine libre (Cys-34). Pour autant, les valeurs de n_{tot} des flavonoïdes en présence de SAB sont plus faibles qu'en présence de β -CD. Ce résultat suggère que les quinones dérivées des flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec les résidus nucléophiles de la SAB, ce qui peut limiter l'activité résiduelle des produits d'oxydation.

De ces résultat, nous pouvons dire que, dans le milieu micellaire à pH 5, les polyphénols abondants dans l'alimentation exercent un pouvoir antioxydant et que la présence de la protéine SAB et de la β -cyclodéxtrine ne modifient pas fortement la réactivité et le devenir des phénols (formation de dimères, de produits de coupure...), quand ils réagissent avec le DPPH dans ces conditions. Les phénols de l'olive, insensibles à ces interactions, semblent plus disponibles pour une action antioxydante au sein du bol alimentaire.

Conclusion

La capacité de transfert des atomes H des polyphénols est une propriété biologique importante, en lien avec l'aptitude de ces antioxydants à convertir les ERO (radicaux oxygènes et peroxygènes) en espèces non toxiques pour l'organisme. Le test DPPH•, simple et pratique, peut donner une évaluation quantitative de la vitesse et de la stœchiométrie des réactions de transfert d'atomes H des polyphénols. Cependant, les travaux effectués jusqu'à présent ont été essentiellement conduits en solution alcoolique ou hydro-alcoolique.

Afin de prédire le potentiel antioxydant des polyphénols chez l'humain, nous avons mis au point avec succès un test DPPH• en milieu micellaire faiblement acide modélisant simplement l'estomac après ingestion d'un repas. Cette étude a mis en jeu des analyses cinétiques quantitatives des réactions de transfert d'atomes H des polyphénols alimentaires (quercétine, rutine, catéchine, acide chlorogénique, oleuropéine et hydroxytyrosol) au radical DPPH•. Ce travail a été complété par la mise en évidence de l'influence de composants du bol alimentaire, la protéine SAB et le polysaccharide β -cyclodextrine, sur la capacité des phénols à piéger des espèces radicalaires.

L'ensemble des données collectées a montré :

- 1- Une stabilité du radical DPPH• solubilisé en milieu aqueux en présence d'un tensioactif non ionique (Brij 35), avec un coefficient d'absorption molaire quasiment identique à celui mesuré dans le méthanol;
- 2- Un pouvoir antioxydant important des polyphénols testés dans le système micellaire;
- 3- Une réactivité variable de ces polyphénols vis-à-vis du radical DPPH• dans le milieu micellaire: le nombre de moles de DPPH réduites par mole d'antioxydant est environ de 2 (n partiel), au cours du premier stade (transfert des atomes H les plus labiles). Par ailleurs, les stœchiométries totales (n_{tot}) varient de 3 à 5 ;
- 4- Que la réactivité des phénols avec le radical DPPH• (valeurs de k_1) est plus forte dans le milieu micellaire (malgré le pH acide) qu'en solution (hydro)alcoolique ;
- 5- Que la présence de la protéine SAB et de la β -cyclodextrine ne modifie pas fortement la réactivité et le devenir des phénols (produits d'oxydation) quand ils réduisent le DPPH•. Les

phénols de l'olive (oleuropéine et hydroxytyrosol) apparaissent sensiblement plus disponibles pour une action antioxydante au sein du bol alimentaire.

Ces résultats confirment le potentiel de ces polyphénols (quercétine, rutine, catéchine, acide chlorogénique, oleuropéine et hydroxytyrosol) pour une action protectrice contre le stress oxydant dans le compartiment gastrique. Ainsi l'étude menée a permis de «mimer une partie du puzzle » que constitue le compartiment gastro-intestinal où diverses interactions peuvent avoir lieu entre les polyphénols et les composants du bol alimentaire, tels que les protéines et les polysaccharides.

Pour autant, le contrôle et la compréhension de la réactivité des aliments dans l'estomac (en particulier, les risques d'oxydation) sont des voies en cours d'exploration. En effet, l'estomac est un organe très complexe où plusieurs paramètres entrent en jeu après l'ingestion d'un repas, notamment, le pH, la température, les différentes interactions, la digestion partielle des protéines et des lipides et le brassage. Afin de progresser dans la compréhension des phénomènes, des expériences en digesteur artificiel, en modèle animal et chez l'humain sont également nécessaires.

Références bibliographiques

- [1] Alam Md. N., Bristi N. J., Rafiquzzaman Md. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **21**: 143–152.
- [2] Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. **181**: 1199-1200.
- [3] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*. **28**: 25-30.
- [4] Bondet C., Brand-Williams W., and Berset C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*. **30**: 609–615.
- [5] Nenadis N., Tsimidou M. (2002). Observation on Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using Rapid 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) Tests. *Journal of the American Oil and Chemistry*. **79** (12): 1191-1194.
- [6] Sendra J-M., Sentandreu E., Navarro J-L. (2006). Reduction Kinetic of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *European Food Research and Technology*. **223**: 615-624.
- [7] Liu H., Qiu N., Ding H., Yao R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*. **6**: 123–155.
- [8] Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. **26**(2): 211-219.
- [9] Katalinic V., Milos M., Kulisic T et Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extract of antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*. **94**: 550-557.
- [10] Villano D., Fernandez-Pachon MS., Moya ML., Troncoso AM., Garcia-Parrilla MC. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. **71**: 230-235.
- [11] Ordoudi SA., Tsimidou MZ., Vafiadis AP., Bakalbassis EG. (2006). Structure-DPPH scavenging activity relationships: parallel study of catechol and guaiacol acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 5763-5768.
- [12] Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. (2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . **51**(3): 615-622.

- [13] Marxen K., Vanselow K.H., Lippermeier S., Hintze R., Ruser A et Hansen U-P. (2007). Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Full research Paper*. **07**: 2080-2095.
- [14] Sanchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Review Food Science and Technology International*. **8**:121-137.
- [15] Popovici C., Saykova I., Tylkowsk B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. **4**: 25-39.
- [16] Manach C., Morand C., Crespy V., et al. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters*. **426**: 331-336.
- [17] Dangles O., Dufour C., Manach C., et al. (2001). Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods in Enzymology*. **335**: 319-333.
- [18] Laranjinha J. (2001). Redox cycles of caffeic acid with alpha-tocopherol and ascorbate. *Methods In Enzymology*. **335**: 282-295.
- [19] Gawandi, V. B., Guha S. N., Priyadarsini K. I., and Mohan H. (2001). Steady-state and time-resolved studies on spectral and redox properties of dye-surfactant interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*. **242**: 220–229.
- [20] Noipa T., Srijaranai S., Tuntulani T., Ngeontae W. (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*. **44**: 798–806.
- [21]. Alluis B. et Dangles O. (2001). Quercetin glycosides and sulfates: chemical synthesis, complexation and antioxidant properties. *Helvetica Chimica Acta*. **84**: 1133-1156.
- [22] Dangles O., Fargeix G., Dufour C. (1999). One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. **2**: 1387-1395.
- [23] Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 1841-1856.
- [24] Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*. **21**(6): 895-902.
- [25] Anouar, E.; Kosinova, P.; Kozlowski, D.; Mokrini, R.; Duroux, J.-L.; Trouillas, P. (2009). New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: a combined theoretical and experimental approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **11**: 7659-7668.

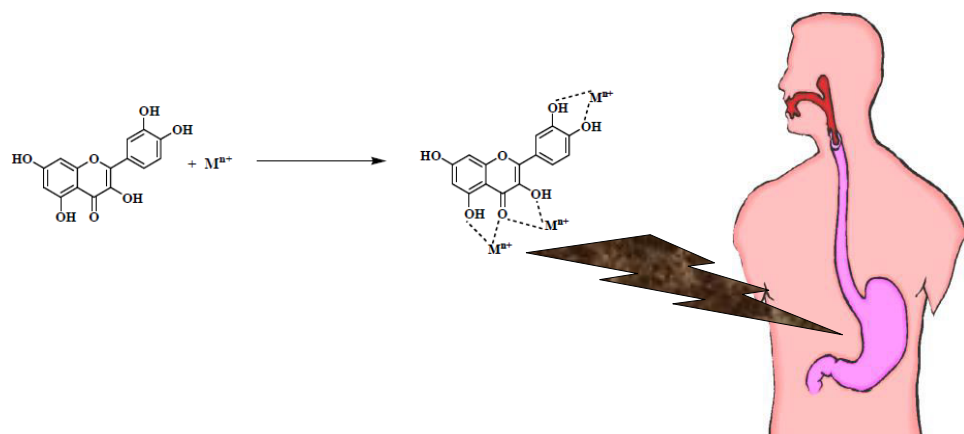
- [26] Dufour C., da Silva E., Poitier P., Queneau Y., Dangles O. (2002). Gallic esters of sucrose as efficient radical scavengers in lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 3425-3430.
- [27] Lucarini M., Mugnaini V., Pedulli G.F. (2002). Bond dissociation enthalpies of polyphenols: the importance of cooperative effects. *Journal of Organic Chemistry*. **67**: 928-931.
- [28] Dangles O. (2012). Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*. **16**: 692-714.
- [29] 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.
- [30] Pietta P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Production*. **63**: 1035-1042.
- [31] Buchner N., Krumbein A., Rohn S., Kroh LW. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **20**: 3229-3235.
- [32] Makris D.P., Rossiter J.T. (2000). Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 3830-3838.
- [33] Goupy P., Bautista-Ortin A.-B., Fulcrand H., Dangles O. (2009). Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the DPPH radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **57**: 5762-5770.
- [34] Krishnamachari V., Levine L. H., Pare P. W. (2002). Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: a unified mechanism for quercetin radical scavenging. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **50**: 4357-4363.
- [35] Ghidouche S., Es-Safi N.-E., Ducrot P.H. (2008). Mechanistic study on the enzymatic oxidation of flavonols. *Tetrahedron Letters*. **49**: 619-623.
- [36] Lorrain B., Dangles O., Genot C., Dufour C. (2010). Chemical modeling of hemeinduced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **58**: 676-683.
- [37] Dufour C., Loonis M. (2007). Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1770**: 958-965.
- [38] Guyot S., Vercauteren J., Cheynier V. (1996). Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*. **42**: 1279-1288.

- [39] Guyot S., Cheynier V., Souquet JM., Moutounet M. (1995). influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **43**: 2458- 2462.
- [40] Dangles O., Fargeix G., Dufour C. (2000). Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3', 4', 7-trihydroxyflavylium ion. *Journal of the Chemistry Society, Perkin Transactions*. **2**: 1653-1663.
- [41] Chat O.A., Najar M.H., Aijaz Ahmad Dar A.A. (2013). Evaluation of reduction kinetics of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylradical by flavonoid glycoside Rutin in mixed solvent based micellar media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **436**: 343– 353.
- [42] Nkhili E. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. Avignon. p. 327.
- [43] Ghidouche S., Es-Safi N.-E., Ducrot P.-H. (2008). Mechanistic study on the enzymatic oxidation of flavonols. *Tetrahedron Letters*. **49**: 619-623.
- [44] Aliaga C., Juarez-Ruiz J.M., Scaiano J.C., Aspee A. (2008). Hydrogen-transfer reactions from phenols to TEMPO prefluorescent probes in micellar systems. *Organic Letters*. **10**: 2147– 2150.
- [45] Valgimigli L., Banks J.T., Ingold K.U., Luszyk J. (1995). Kinetic solvent effects on hydroxylic hydrogen atom abstractions are independent of the nature of the abstracting radical. Two extreme tests using vitamin E and phenol. *Journal of the American Chemical Society*. **117**: 9966–9971.
- [46] Peters T. (1995). All about albumin. Biochemistry, genetics, and medical applications. *Academic press*.
- [47] Rawel HM., Frey SK., Meidtner K., Kroll J., Schweigert FJ. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular Nutrition & Food Research*. **50**: 705-713.
- [48] Dufour C., Dangles O. (2005). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects*. **1721**: 164-173.
- [49] Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Voss H.P., Bast A. (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*. **39**: 787-791.
- [50] Lu Q.h., Ba C.d., Chen D.y. (2008). Investigating noncovalent interactions of rutin - serum albumin by capillary electrophoresis - frontal analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **47**: 888-891.

- [51]. Roy D., Dutta S., Maity S.S., Ghosh S., Roy A.S., Ghosh K.S., Dasgupta S. (2012). Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins. *Journal of Luminescence*. **132**: 1364–1375.
- [52] Prigent SVE., Gruppen H., Visser A., van Koningsveld GA., de Jong GAH., Voragen AGJ. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 5088-5095.
- [53] Jullian C., Moyano L., Yañez C., Olea-Azar C. (2007). Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A*. **67**: 230–234.
- [54] Lederer M., Leipzig-Pagani E. (1996). A simple alternative determination of the formation constant for the inclusion complex between rutin and β -cyclodextrin. *Analytica Chimica Acta*. **329**: 311-314.
- [55] Jullian C., Miranda S., Zapata-Torres G., Mendiza F., Olea-Azar C. (2007). Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+) catechin by NMR and molecular modeling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **15**: 3217–3224.
- [56] López-García M. Á., López O., Maya I., Fernández-Bolaños J.G. (2010). Complexation of hydroxytyrosol with β -cyclodextrins. An efficient photoprotection. *Tetrahedron*. **66**: 8006- 8011
- [57] Gornas P., Grażyna Neunert , Krzysztof Baczyński, Krzysztof Polewski. (2009). Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chemistry*. **114**: 190–196.
- [58] Irwin P.L., Pfeffer P.E., Landis W. Doner L.W., Sapers G.M., Brewster J.D., Gerald Nagahashi G and Hicks K.B. (1994). Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydrate Research*. **256**: 13-27.
- [59] Zhao M., Wang H., Yang B., Tao H. (2010). Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*. **120**: 1138–1142.

Chapitre III:

Interaction des polyphénols avec les ions métalliques



Etat des connaissances

III.1. Etat des connaissances

III.1.1. Ions métalliques

Les métaux de transition constituent une grande famille d'éléments chimiques ayant chacun des propriétés spécifiques en fonction de la structure électronique de leur sous-couche d incomplète (configuration nd^x avec $n = 3, 4, 5$ et x compris entre 1 et 9). Ces métaux sont de bons réducteurs et forment facilement des ions par perte d'un ou plusieurs électrons. Ils possèdent plusieurs degrés d'oxydation stables, Les métaux de transition et leurs cations sont susceptibles de former des complexes de coordination avec une grande variété de ligands organiques et inorganiques. Par exemple, le dioxygène peut entrer dans le système de coordination du métal (M) et ainsi former des complexes tels que $M^{n+}-O_2$ ou $M^{n+}-O_2-M^{n+}$ ou encore $M^{n+}=O$ après clivage de la liaison O–O. Ces types de complexes interviennent dans le cycle catalytique de nombreuses métalloenzymes (oxydases, oxygénases) [1]. Dans ce travail de thèse, seul le fer et le cuivre seront étudiés. En effet, ils possèdent une réactivité propre, et par rapport aux autres métaux de transition, ils sont présents dans les aliments, et les systèmes biologiques en quantité non négligeable. La concentration du fer et du cuivre dans les fruits et légumes peut atteindre respectivement 10 $\mu\text{g/g}$ et 260 $\mu\text{g/g}$. [2] Impliqués dans la réaction de Fenton, ils peuvent induire des pathologies liées à la production d'espèces réactives de l'oxygène [1, 3].

L'aluminium a fait aussi l'objet de cette étude, comme exemple d'un métal inerte, mais qui peut s'accumuler dans les plantes et donc être consommé par les animaux ou l'homme. Il est suspecté de provoquer ainsi des problèmes de santé (encéphalopathie, épilepsie, troubles de mémoire) [4, 5].

III.1.2. Fer, cuivre et aluminium en biologie

- Fer

L'organisme d'un humain adulte possède 4 g de fer dont environ 2/3 sous forme d'hémoglobine (transport de O_2 dans le sang). Dix pourcents supplémentaires sont sous forme de myoglobine (transport de O_2 dans les muscles) et une faible quantité dans plusieurs enzymes contenant du fer (ex. : les monoxygénases à cytochromes P450).

Le fer existe dans l'alimentation sous la forme oxydée Fe^{III} . L'acide chlorhydrique sécrété par la paroi de l'estomac permet sa solubilisation et la vitamine C et/ou les

polyphénols de l'alimentation réduisent une partie du Fe^{III} en Fe^{II} et facilitent ainsi son absorption. Ils existent des maladies impliquant des anomalies du métabolisme de fer. En dessous du taux optimal, il y a risque d'anémie et au-dessus risque de stress oxydant [6].

- **Cuivre**

Le cuivre est largement distribué dans la nature et est un élément essentiel à la vie. Le corps humain adulte en contient 80 mg. Il est absorbé au niveau de l'estomac et de la partie supérieure de l'intestin grêle, probablement sous forme de complexe avec des acides aminés tels que l'histidine. Ces complexes du cuivre entrent dans le sang et la plupart du cuivre se lie fortement à l'albumine du sérum tandis que le reste est stocké. Dans le foie par exemple, le cuivre est incorporé dans la céruloplasmine, une glycoprotéine. On ne peut pas exclure la possibilité que les ions du cuivre, même sous forme liée, participent à la production des radicaux hydroxyles (réaction de Fenton). Ces derniers, très réactifs, réagiront aussitôt avec le ligand (protéine) et demeureront indétectables en solution.

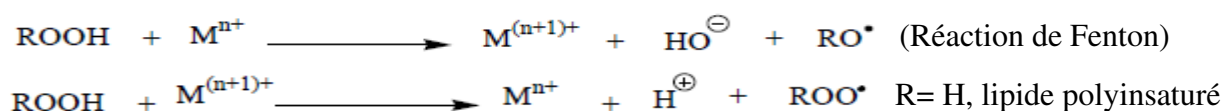
L'ingestion du sulfate de cuivre ou d'autres sels de cuivre est une cause d'empoisonnement aigu. Une conséquence caractéristique de cette surcharge de cuivre est la nécrose hépatique. Le cuivre, comme le fer joue un rôle de catalyseur ou d'initiateur dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que dans la peroxydation des lipides polyinsaturés des membranes et des lipoprotéines. Il est aussi considéré comme un agent mutagène potentiel [6].

- **Aluminium**

C'est un élément omniprésent dans les sols. L'acidification de ces derniers, due aux pluies acides, augmente la quantité de ce métal sous la forme libre (Al^{3+}) toxique dans l'environnement [7, 8]. Dans ce cas, c'est toute la chaîne alimentaire aboutissant à l'homme qui risque d'être contaminée. Pour l'organisme humain, l'apport journalier d'aluminium provient à 95% de l'alimentation et de l'eau. La disponibilité de l'aluminium dépend du pH intestinal, des formes ingérées, de la présence d'agents complexants (comme l'acide citrique très présent dans l'alimentation) [9]. L'ingestion d'aluminium est corrélée à une augmentation des taux urinaires mais le métal peut aussi atteindre le cerveau et dans certain cas occasionner des fibroses pulmonaires. De nombreuses études [10, 11] ont montré le potentiel neurotoxique important du métal: dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les cellules du cerveau des patients atteints contiennent de 10 à 30 fois plus d'aluminium que la normale [12].

III.1.3. Interaction des polyphénols par des métaux de transition (Fe, Cu)

Le fer et le cuivre sont des métaux d'importance biologique impliqués dans de nombreux phénomènes de transport (dioxygène) et de transfert d'électron. En général fortement complexés à des protéines de transport ou de stockage (transferrine, ferritine, hémosidérine) et à des enzymes (cytochromes, peroxydases, superoxyde dismutase, catalases, ...), ils pourraient exister sous forme « libre » (faiblement complexée) à l'état de traces et participer alors au « stress oxydant », par production des radicaux oxygénés toxiques [13-15].



L'interaction des polyphénols avec les métaux de transition joue un rôle important dans les propriétés antioxydantes des polyphénols [16]. En effet, une voie majeure de production des EOR consiste en la réduction du dioxygène par Fe^{II} ou Cu^{I} (complexe labiles en faible concentration) avec la formation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène et en la production de radicaux oxyde par coupure réductrice d'hydroperoxydes par ces mêmes ions (réaction de 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. En comparaison de l'activité antioxydante par capture des EOR, il serait mineur dans l'inhibition de la peroxydation lipidique mais dominant dans l'inhibition de coupures oxydantes de brins d'ADN.

Dans l'organisme, on ne connaît pas de mécanismes susceptibles d'éliminer directement un excès de fer ou de cuivre. La seule méthode pour prévenir une surcharge excessive de fer ou de cuivre dans l'organisme est de mettre en place une thérapie de complexation des métaux de transition. A titre d'exemple, on peut citer l'acide phytique qui est un fort complexant naturel du fer qu'on retrouve notamment dans les céréales et le pain complet. Pour ces raisons, il peut être intéressant de disposer de complexants spécifiques des métaux de transition d'où l'importance de la consommation des aliments riches en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes.

Sur le plan nutritionnel, il est à noter que 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.

Enfin, l'interaction des ions métalliques et des polyphénols (anthocyanes présentant une substitution 1,2-dihydroxy sur le cycle B) est un mécanisme de variation des couleurs naturelles. La substitution des deux protons du noyau catéchol par l'ion métallique intervient à $\text{pH} > 3$ et induit de forts déplacements bathochromes de la bande d'absorption du pigment dans le domaine visible. La présence d'un ion de métal de transition peut être nécessaire pour l'expression de la couleur bleue du fait d'un transfert de charge depuis l'anthocyane vers les orbitales d partiellement occupées du centre métallique.

III.1.3.1. Complexation des polyphénols avec du fer et du cuivre

L'environnement des ions Fe^{II} et Fe^{III} dans les complexes est en général octaédrique (nombre de coordination = 6) tandis que les complexes du cuivre présentent un nombre de coordination de quatre dans un environnement tétraédrique (Cu^{I}) ou plan carré (Cu^{II}) (**Fig. III.1a**).

Les groupements catéchol et pyrogallol (ex. résidus galloylés des tannins) sont bien connus pour leur capacité à chélater les ions des métaux de transition, notamment le fer. Ainsi, les polyphénols possédant l'un ou l'autre groupe peuvent se lier au fer avec un rapport molaire maximal métal-phénol de 1:3 (**Fig. III.1b**). Cependant, selon le pH et la structure des composés phénoliques, les modes de coordination sont variés [17].

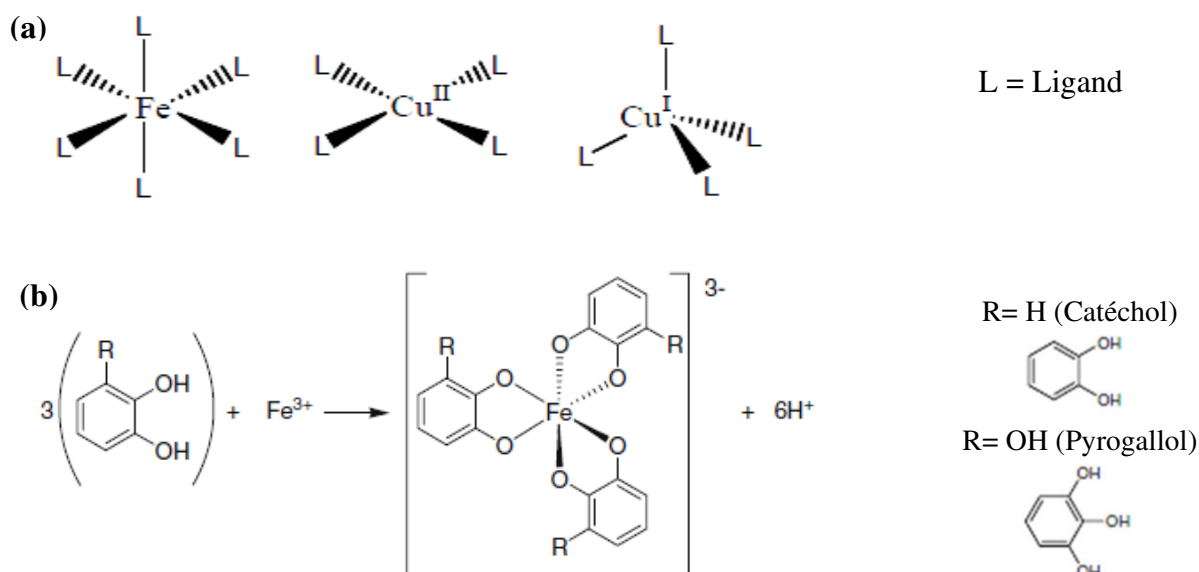
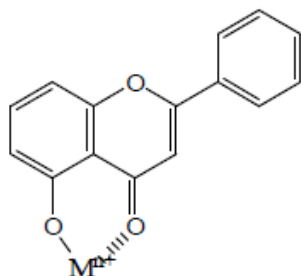


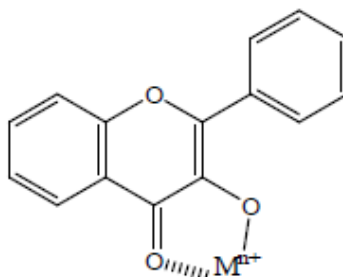
Figure III.1: Géométrie de coordination des ions métalliques dans les complexes (a), coordination octaédrique possible des complexes polyphénols-fer en général (b) [17]

D'un point de vue structural, les flavonoïdes ont plusieurs sites potentiels de complexation métallique :

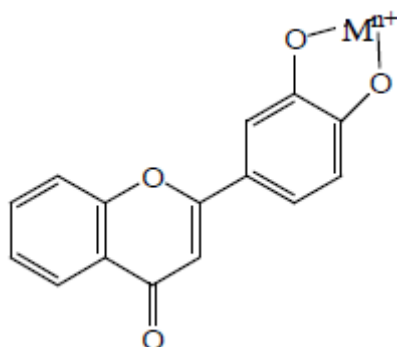
- Les 5-hydroxyflavones peuvent chélater les ions métalliques grâce au groupement 5-hydroxy-4-oxo pour donner un chélate à six centres.



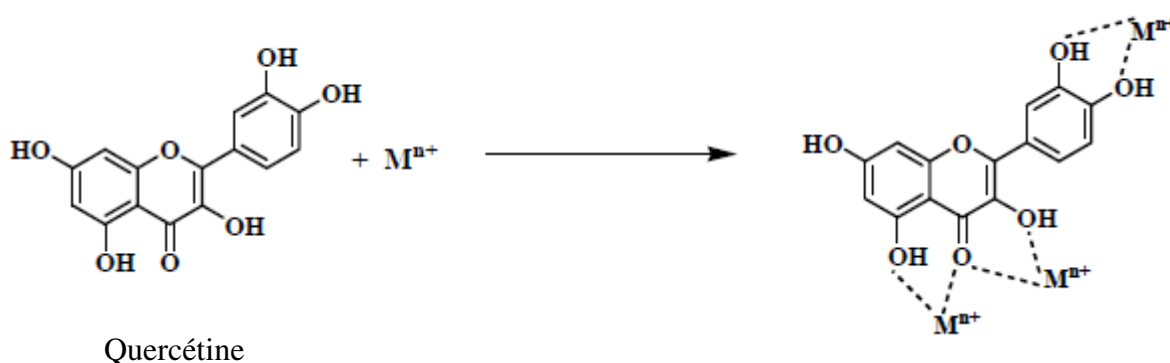
- Les 3-hydroxyflavones forment avec les ions métalliques un complexe à cinq centres grâce au groupement 3-hydroxy-4-oxo.



- Les 3',4'-dihydroxyflavones chélatent les ions métalliques par l'intermédiaire de leur groupement *ortho*-dihydroxybenzène (catéchol) présent sur le cycle B.



Dans le cas plus compliqué d'un flavonoïde possédant plusieurs sites de complexation, tel que la quercétine, la structure et la stœchiométrie des complexes varient en fonction des conditions d'acidité et de solvant.



Plusieurs travaux ont mis en évidence que les propriétés réductrices des polyphénols et leur capacité à former des complexes stables avec les métaux de transition, notamment le fer et le cuivre, peuvent moduler divers processus d'importance biologique faisant intervenir l'état redox de l'ion métallique. Les interactions des ions du cuivre et du fer avec les polyphénols, et plus particulièrement avec les flavonoïdes, sont souvent proposées comme l'un des mécanismes d'action antioxydante de ces produits naturels [18-24].

Par exemple, les flavonoïdes inhibent la peroxydation lipidique amorcée par Cu^{II} . Certaines études ont démontré que les complexes métalliques des flavonoïdes ont une activité antioxydante plus puissante que les flavonoïdes sous forme libre, en particulier pour la capture du radical-anion superoxyde [25-27]. Cependant la complexation du cuivre ou du fer par les polyphénols entraîne l'inhibition de la peroxydation lipidique seulement si :

- Les complexes de Fe^{II} et Cu^{I} sont inactifs dans la réaction de Fenton;
- Les complexes de Fe^{III} et Cu^{II} sont assez stables pour prévenir une réduction ultérieure en Fe^{II} et Cu^{I} susceptible de conduire à la réaction de Fenton.

Afnas'ev *et al.* [28] ont montré que le complexe Cu^{II} -rutine présente une bonne capacité à piéger les radicaux libres *in vivo* et *in vitro*. Son activité antioxydante est 2 à 30 fois plus importante que celle de la rutine non complexée. Ces auteurs attribuent ce résultat à l'acquisition par le complexe formé d'un centre de dismutation de superoxyde. De Souza *et al.* [29] proposent la même interprétation.

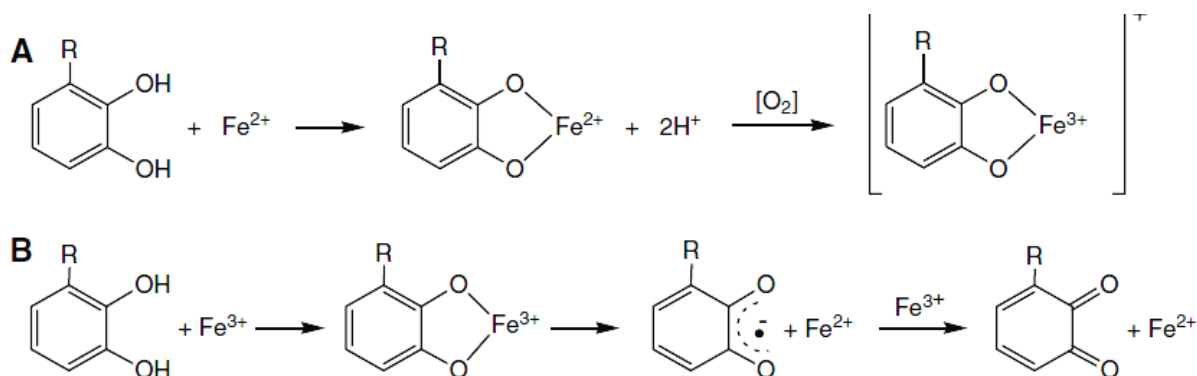


Figure III.2: Coordination de Fe^{2+} avec un polyphénol et transfert d'électron en présence d'oxygène générant le complexe Fe^{3+} -polyphénols (A). Coordination de Fe^{3+} avec un polyphénol, réduction de l'ion et formation de la semiquinone avec réduction de Fe^{3+} (B). R= H, OH (B) [17]

Néanmoins, la complexation métallique des polyphénols et leur activité antioxydante ne vont pas nécessairement de pair. Certains effets pro-oxydants (production d'ERO) peuvent se manifester en lien avec a) l'autoxydation des complexes de Fe^{II} et Cu^{I} (production de H_2O_2) et b) la réduction par les phénols de Fe^{III} et Cu^{II} en Fe^{II} et Cu^{I} (impliqués dans la réaction de Fenton) (**Fig. III.2**) [26, 30-32].

La complexation métallique des flavonoïdes peut être étudiée par spectroscopie UV-visible. Les flavones et flavonols ont typiquement deux longueurs d'onde d'absorption maximale dans le domaine UV-visible. La première, dans l'intervalle 240-285 nm, est attribuée à la bande I du cycle A. La deuxième, dans l'intervalle 300-400 nm, est la bande II du cycle B. La bande I est due à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du noyau A, tandis que la bande II est attribuée à un transfert de charge du noyau B vers le noyau C. La complexation des flavonoïdes par des ions métalliques provoque des déplacements bathochromes des deux bandes d'absorption. Il semble que ce comportement soit observé quel que soit le site de complexation (5-hydroxy-4-oxo, 3-hydroxy-4-oxo ou catéchol).

Etablir les mécanismes de la complexation des ions métalliques par les polyphénols permet de mieux comprendre la complexité de leurs propriétés pro- et antioxydantes. Par conséquent, de nombreux complexes métal-flavonoïde ont été synthétisés et caractérisés. Une grande variété de techniques analytiques (analyse élémentaire, potentiométrie, spectroscopies UV-visible et infrarouge, spectrométrie de masse, RMN de ^1H et ^{13}C) a permis d'étudier les interactions des flavonoïdes avec les ions métalliques, les sites de complexation, la stabilité et la stœchiométrie des complexes formés, etc...

Les ions métalliques les plus étudiés sont Al^{III} , Fe^{III} , Fe^{II} , Zn^{II} et Cu^{II} . Toutefois, les données sur la structure et la stœchiométrie des complexes sont parfois incomplètes et contradictoires. En outre, les résultats dépendent étroitement des conditions expérimentales.

Une étude sur la complexation de la rutine et de la quercétine par différents ions métalliques dont Fe^{III} et Cu^{II} a été réalisée par potentiométrie et spectroscopie UV-visible en solution aqueuse [33]. Les constantes de stabilité et stœchiométries des complexes ont été déduites. Les résultats montrent que la complexation de Fe^{III} par la quercétine et la rutine est plus forte que celle de Cu^{II} . Pour Fe^{III} , la complexation est de stœchiométrie 1:1 voire 1:2 et concerne quasi-exclusivement le noyau catéchol (cycle B). D'une manière générale, les catéchols sont bien connus pour leur forte affinité pour Fe^{III} . Dans le cas de Cu^{II} , la complexation métallique est de stœchiométrie 1:1 voire 1:2. Comme pour Fe^{III} , il y a participation du noyau catéchol.

De Souza *et al.* [34] ont démontré que la complexation de la rutine et son aglycone quercétine avec le fer (II) dans le méthanol est de stœchiométrie 3:2 et 2:1, respectivement. Les stœchiométries des complexes ont été confirmées par les analyses élémentaires et la RMN du proton montrant ainsi la fixation du fer au niveau du noyau catéchol (cycle B) et du groupement 3-hydroxy-4-oxo (cycle C) pour la quercétine. Par ailleurs, la rutine a révélé un autre site de liaison en plus: le groupement 7-OH du cycle A :

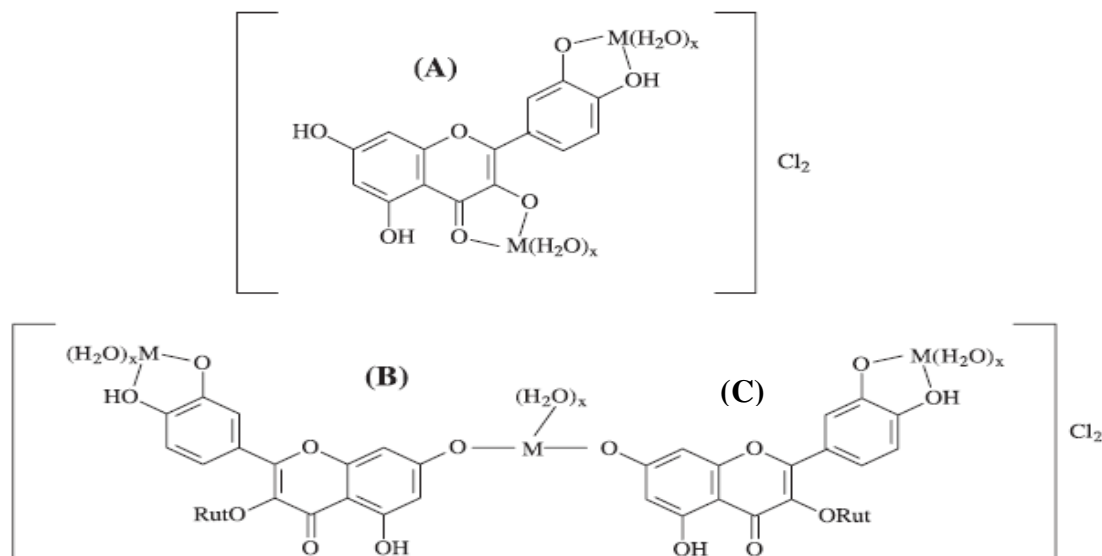


Figure III.3: Structures des complexes fer-quercétine (A) et fer-rutine (B) dans MeOH (Rut = rutinose = L-Rha- α -1,6-D-Glc- β). M = Fe(II), x = 4 [34]

Mira et al. ont effectué une étude détaillée par spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse de la capacité de chélation des flavonoïdes par les ions du cuivre et du fer en fonction du pH [35]. En outre, la capacité de réduction par les flavonoïdes de Fe^{III} et Cu^{II} respectivement en Fe^{II} et Cu^I a également été étudiée. Les flavonoïdes sélectionnés pour cette étude sont: des flavones et flavonols (apigénine, lutéoline, kaempférol, quercétine, myricétine et rutine), des isoflavones (génistéine et daidzéine), des flavanones (taxifoline, naringénine et naringine) et un flavanol (catéchine). Tous ces flavonoïdes présentent une plus grande capacité à réduire Cu^{II} que Fe^{III}. Les résultats montrent que les flavonoïdes possédant à la fois des groupements catéchol (cycle B) et 3-hydroxyle, ainsi qu'une double liaison (C2, C3), réduisent mieux Fe^{III} en Fe^{II}. Il semble que la réduction du cuivre par les flavonoïdes dépende essentiellement du nombre de groupements hydroxyles. Seuls les flavones, les flavonols et la catéchine peuvent former des complexes avec les ions du fer et du cuivre dans le tampon acétate à pH 5.5 et le tampon phosphate à pH 7.4. Cependant, pour un pH compris entre 5,5 et 7,4, tous les flavonoïdes présentant un groupement 5-hydroxy-4-oxo forment des complexes avec le cuivre en ce site. A pH 7,4, la complexation de la quercétine, de la myricétine et de la catéchine par Cu^{II} implique le groupement catéchol du cycle B. De plus, la quercétine et la myricétine sont les seuls flavonoïdes qui peuvent interagir fortement avec Fe^{III} à pH 5,5. La complexation a lieu sur le site du groupement 5-hydroxy-4-oxo, ce qui pourrait être expliqué par la réduction préalable de Fe^{III} en Fe^{II}.

Sungur et Uzar ont effectué une étude par potentiométrie et spectroscopie UV-visible de la complexation de Fe^{III} et Cu^{II} par l'acide tannique et la myricétine. Ils en ont déduit la stoechiométrie des complexes ainsi que leur constante de stabilité. La myricétine et l'acide tannique ont une plus grande affinité pour Fe^{III} que pour Cu^{II} . La complexation de Fe^{III} par l'acide tannique est de stoechiométrie 1:1 à $\text{pH} < 3$, 2:1 à pH compris entre 3 et 7 et 4:1 à $\text{pH} > 7$. Dans le cas de la myricétine, la complexation de Fe^{III} est de stoechiométrie 1:2 à pH compris entre 4 et 5 et 1:1 à pH 6 [36].

D'autres travaux ont été aussi rapportés sur la complexation métallique des acides phénoliques [37, 38]. Par exemple, la capacité de complexation des ions du fer par les acides phénoliques a été quantifiée par Andjelkovic et *al.* [39] dans le tampon tris à pH 7,4. Dans ces conditions, les acides vanillique, syringique et férulique ne complexent pas Fe^{III} en raison de l'absence de groupement catéchol ou pyrogallol. En revanche, l'acide chlorogénique a une grande capacité à chélater Fe^{III} .

Diverses études montrent que les flavonoïdes peuvent subir une oxydation en présence de Cu^{II} ou Fe^{III} [26, 28, 29, 40, 41]. C'est notamment le cas des flavonols (**Fig. III.4**). Par ailleurs, les ions Cu^{I} ou Fe^{II} peuvent induire des réactions d'oxydation par O_2 (autoxydation).

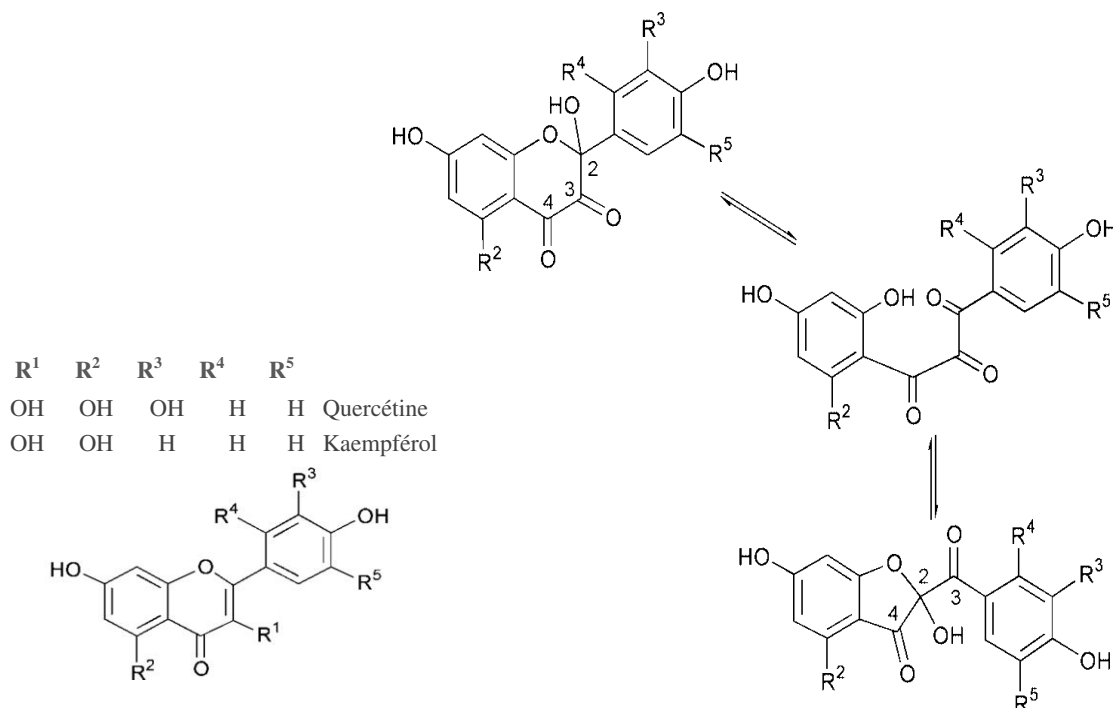


Figure III.4: produits de la réaction d'oxydation des flavonols induite par les ions du fer et du cuivre. Le produit d'oxydation à 2 électrons initialement formé (2-(hydroxyphényl)-2-hydroxybenzopyran-3,4 dione) s'isomérise en 2-(hydroxybenzoyl)-2-hydroxybenzofuran-3(2H)-one [42].

L'oxydation des flavonoïdes au sein des complexes est fortement liée aux conditions expérimentales: nature de l'ion métallique, valeur du pH, nature du tampon, potentiel redox du ligand phénolique, coligands. Actuellement, il est difficile de quantifier complexation et oxydation dans les matrices alimentaires (ex.: thé vert) et dans les échantillons biologiques (plasma). Cependant, il est possible de mettre en évidence à la fois la complexation et l'autoxydation des flavonoïdes en présence des ions métalliques par CLHP couplée à la spectrométrie de masse.

L'oxydation de la quercétine et du flavonol (3-hydroxyflavone) en présence de Cu^{II} en solution alcoolique avec ou sans dioxygène a été rapportée [40]. Les produits d'oxydation proviennent de l'addition d'une molécule d'alcool en C2 d'un intermédiaire de type méthylènequinone correspondant au transfert de 2 électrons et 2 protons. **Brown et al.** ont examiné les interactions des flavonoïdes avec Cu^{II} dans différents tampons [20].

En milieu fortement acide, la complexation de Fe^{III} par les flavonoïdes n'a pas lieu en raison de la compétition défavorable avec les protons pour les sites oxygénés des ligands. Cependant, dans ces conditions, Fe^{III} est sous forme d'ion Fe^{3+} libre, ce qui maximise son pouvoir oxydant. Les flavonoïdes sont donc rapidement oxydés malgré l'absence de complexes intermédiaires [43].

Concernant les effets pro-oxydants des polyphénols en présence d'ions de métaux de transition, Il a été montré que certaines catéchines du thé vert, en présence de Cu^{II} dans des conditions aérobies, peuvent induire la dissociation de l'ADN (**Fig. III.5**) et aussi accélérer la peroxydation des acides gras insaturés [44]. **Hiramoto et al.** [45], **Moran et al.** [46] et **Ohashi et al.** [47] ont observé aussi la scission de brins d'ADN *in vitro* en présence de complexes Fe^3 -polyphénols (acide gallique, EGC et EGCG) (**Fig. III.5**). **Puppo** a également démontré l'augmentation de la production du radical HO^{\bullet} via la réaction de Fenton en présence de divers flavonoïdes (myricétine, quercétine et catéchine) [31]. Les effets toxiques et pro-oxydants des polyphénols *in vitro* et *in vivo* ont fait l'objet de revues par **Schweigert et al.** et **Procházková et al.**. Ces effets sont liés essentiellement à la capacité des polyphénols à interagir avec les cations métalliques, notamment ceux du fer et du cuivre [48, 49].

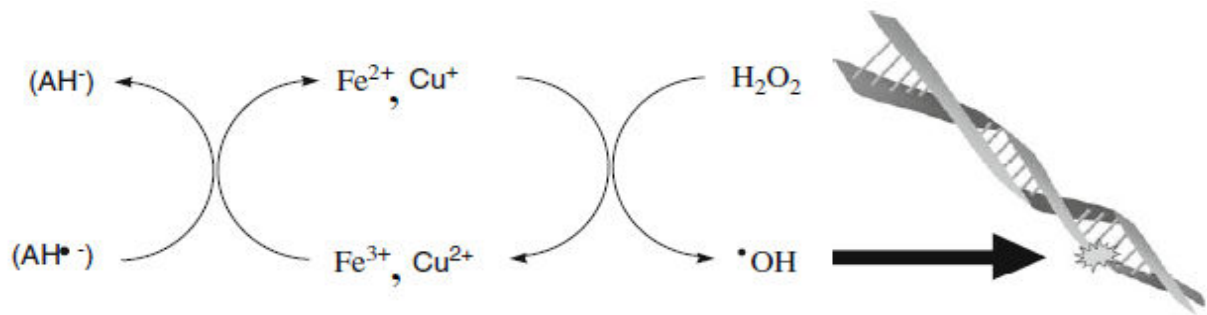


Figure III.5: La réduction des ions Fe^{3+} et Cu^{2+} par un phénol permet de produire les ions de basse valence nécessaires à la réaction de Fenton, conduisant ainsi à des lésions de l'ADN.

Références bibliographiques

- [1] Tokalioglu S., Gurbuz F. (2010). Selective determination of copper and iron in various food samples by the solid phase extraction. *Food Chemistry*. **123**:183–187.
- [2] Miller D.M., Buettner G.R. *et al.* (1990). Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Radical Biology and Medicine*. **8**(1): 95-108.
- [3] Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. **125**: 288-306.
- [4] Afridi H.I., Kazi T.G., Jamali M.K., Kazi G.H., Arain M.B., Jalbani N., Shar G.Q., & Sarfaraz R.A. (2006). Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Toxicology and Industrial Health*. **22**: 381-393.
- [5] Vernay P., Gauthier-Moussard C. *et al.* (2007). Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne L.* *Chemosphere*. **68**(8): 1563-1575.
- [6] Nkhili E. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. Avignon. p. 327.
- [7] Sauvant M.P., Pepin D., Guillot J. (1999). Effect of humic substances and phenolic compounds on the *in vitro* toxicity of aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **44**: 47-55.
- [8] Guo G.W., Liang Y.X. (2001). Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis. *Brain research*. **888** (2): 221-226.
- [9] Stauber J.L., Florence T.M. *et al.* (1999). Bioavailability of Al in alum-treated drinking water. *Journal of the American Water Works Association*. **91**(11): 84-93.
- [10] Miu, A.C. (2006). The silicon link between aluminium and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. **10**(1): 39-42.
- [11] Zatta P., Zambenedetti P. *et al.* (2004). A fatal case of aluminium encephalopathy in a patient with severe chronic renal failure not on dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **19**(11): 2929-2931.
- [12] Harrington C., Wischik C. *et al.* (1994). Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *The Lancet*. **343**(8904): 993-997.
- [13] Halliwell B., Gutteridge J. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters*. **307**(1): 108-112.

- [14] Kaneda I., Kubo F., Sakurai H. (2007). Relationship between trace metal concentration and antioxidative activity of ancient rice bran (red and black rice) and a present-day rice bran (Koshihikari). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **21**(1): 43-51.
- [15] Mancuso J.R., McClements D.J., Decker E.A. (2000). Iron-accelerated cumene hydroperoxide decomposition in hexadecane and trilaurin emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**(2): 213-219.
- [16] Dangles O. (2006). Propriétés chimiques des polyphénols dans les polyphénols en agroalimentaire. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. Lavoisier*. 29-50.
- [17] Perron N.R., Brumaghim J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*. **53**(2): 75-100.
- [18] Van Acker S.A.B.E., Van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van der Vijgh W.J.F., Bast A. (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. **20**: 331-342.
- [19] Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS letters*. **416**(2): 123-129.
- [20] Brown J., Khodr H., Hider R., Rice-Evans C. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*. **330**: 1173-1178.
- [21] Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y. (1998). Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **247**: 60-64.
- [22] Paiva.Martins F., Gordon M.H. (2005). Interactions of ferric ions with olive oil phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**(7): 2704-2709.
- [23] Heim K.E., Tagliaferro A.R. *et al.* (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**(10): 572-584.
- [24] Yoshino M., Murakami K. (1998). Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Analytical Biochemistry*. **257**(1): 40-44.
- [25] Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N., Korkina L.G., Afanas'ev I.B.A. (2001). Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **385**(1): 129-137.

- [26] Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J. (2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*. **34**(2): 243-253.
- [27] Bravo A., Anaconda J.R. (2001). Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties. *Transition Metal Chemistry*. **26**: 20–23.
- [28] Afnas'ev Igor I.B., Elena A., Ostrakhovitch E.A., Mikhal'chik E.V., Ibrahimova G.A., Korkina L.G. (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*. **61**:677-684.
- [29] de Souza R.F., W.F. De Giovanni (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*. **9**(2): 97-104.
- [30] Labieniec M., Gabryelak T. (2006). Study of Interactions between Phenolic Compounds and H₂O₂ or Cu(II) ions in B14 Chinese Hamster Cells. *Cell Biology International*. **30**: 761-768.
- [31] Puppo A. (1992). Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry*. **31**(1): 85-88.
- [32] Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. **177**(1): 67-80.
- [33] Escandar G.M., Sala L.F. (1991). Complexing behavior of rutin and quercetin. *Canadian Journal of Chemistry*. **69**(12): 1994-2001.
- [34] De Souza R.F., Sussuchi E.M et al. (2003). Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry*. **33**(7): 1125-1144.
- [35] Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio M.H., Jennings K.R., (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism of their antioxidant activity. *Free Radical Research*. **36**: 1199–1208.
- [36] Sungur Ş., Uzar A. (2008). Investigation of complexes tannic acid and myricetin with Fe (III). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **69**(1): 225-229.
- [37] Chvátalová K., Slaninova I. et al. (2008). Influence of dietary phenolic acids on redox status of iron: Ferrous iron autoxidation and ferric iron reduction. *Food Chemistry*. **106**(2): 650-660.

- [38] Hynes M.J., O'Coinceanainn M. (2004). The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **98**(8): 1457-1464.
- [39] Andjelkovic M., Van Camp J., De Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., et al. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*. **98**: 23–31.
- [40] Utaka M., Takeda A. (1985). Copper (II)-catalysed oxidation of quercetin and 3-hydroxyflavone. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. **24**: 1824-1826.
- [41] Xu, G., I.n., M.Y., Yuan Y., Lee J., Kim S. (2007). In situ spectroelectrochemical study of quercetin oxidation and complexation with metal ions in acidic solutions. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **28**(5): 889.
- [42] Jungbluth G., Rühling I. et al. (2000). Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. **2**(9): 1946-1952.
- [43] El Hajji H., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. (2006). Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free Radical Research*. **40**(3): 303-320.
- [44] Hayakawa F., Kimura T., Maeda T., Fujita M., Sohmiya H., Fujii M., Ando T. (1997). DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. **1336**(2): 123-131.
- [45] Hiramoto K., Ojima N., Sako K., Kikugawa, K. (1996). Effect of plant phenolics on the formation of spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking of hydroxyl radical. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **19**: 558–563.
- [46] Moran J.F., Klucas R.V., Grayer R.J., Abian J., Becana M. (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*. **22**: 861–870.
- [47] Ohashi Y., Yoshinaga K., Yoshioka H., Yoshioka H. (2002). Kinetic analysis of the effect of (-)-epigallocatechin gallate on the DNA strand scission induced by Fe^(II). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **66**: 770–776.
- [48] Schweigert N., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology*. **3**: 81–91.
- [49] Procházková D. Boušová I. Wilhelmová I. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. **82**: 513–523.

*Interaction des polyphénols avec
les ions métalliques*

(Etude expérimentale)

III.2. Interaction des ions métalliques avec les polyphénols

L'activité antioxydante (capacité à protéger un système biologique contre les effets nocifs des ERO) des polyphénols alimentaires traduit leurs propriétés de piègeurs de radicaux mais aussi leur capacité à complexer les ions de métaux de transition, et plus particulièrement ceux du fer et du cuivre qui sont impliqués dans les processus d'oxydation en biologie.

Au-delà des études thermodynamiques de la complexation métallique des polyphénols [1, 2] assez peu d'études cinétiques ont été entreprises [3-6]. En outre, les études sont souvent conduites dans des conditions fortement acides ($\text{pH} < 3$) pour éviter les problèmes de précipitation et d'autoxydation. Or, dans le corps humain, Fe^{III} et Cu^{II} sont exposés à des pH neutres ou faiblement acides et typiquement solubilisés par association à des protéines spécifiques (hémoglobine, ferritine, transferrine...). Cependant, une fraction de ces ions peut être plus faiblement liée, notamment à des chélateurs de faible poids moléculaire (tels que les ions citrate et phosphate, l'ATP...), et ainsi participer à des mécanismes redox producteurs d'ERO [7].

L'influence des polyphénols de l'alimentation sur ces processus, qu'il s'agisse d'effets pro- ou antioxydants (amplification ou inhibition de la production d'ERO) peut avoir des répercussions en santé humaine. Un site biologique probable pour ces phénomènes est le tractus digestif qui est constamment exposé à diverses formes de fer et cuivre alimentaire et à des concentrations notables de polyphénols sous forme native (si l'alimentation est riche en produits végétaux). En ce site, la complexation métallique des polyphénols est également susceptible de moduler la biodisponibilité des ions métalliques aussi bien que celle des polyphénols, surtout si elle s'accompagne d'une oxydation de ces derniers. Enfin, l'interaction des polyphénols et des ions métalliques peut avoir lieu dans l'aliment lui-même, notamment au cours des procédés technologiques, et constituer la première étape vers des processus d'autoxydation encore mal connus et de nature à abaisser la concentration de polyphénols dans l'aliment.

Il est donc d'un grand intérêt d'étudier les différents aspects physico-chimiques des interactions des ions du fer et du cuivre avec les polyphénols d'importance alimentaire (complexation, oxydation et évolution de l'état redox du métal), tout particulièrement dans des conditions de faible acidité correspondant à la 1^{ère} phase de la digestion gastrique. Pour ce faire, notre étude a été menée en milieu aqueux faiblement acide (tampon acétate 0.1M, pH 5

à 25°C). Au cours de ce travail nous avons sélectionné certains polyphénols représentatifs des différents classes (catéchine, rutine et acide chlorogénique), qui d'une part sont abondants dans les aliments, et d'autre part possèdent un groupement catéchol garantissant une interaction avec les ions de métaux de transition. L'ion Al^{3+} inerte a également été étudié pour comparaison.

Nous espérons ainsi apporter un éclairage physicochimique sur le comportement de ces antioxydants dans le tractus digestif.

III.2.1. Analyses

L'ensemble des réactifs utilisés lors des expériences est rassemblé dans le tableau XXVIII.

Tableau XXVIII : Liste de réactifs et solvants utilisés

	Réactif	Pureté %	Fournisseur
Polyphénol	- (+)-Rutine hydrate	95	Aldrich (USA)
	- (+) Catéchine hydrate	+96	Fluka (Indonésie)
	- Acide chlorogénique	97	Aldrich (Allemagne)
Ions du cuivre, du fer et d'aluminium	- CuCl	99,9	Aldrich (USA)
	- CuCl ₂ , 2H ₂ O	99,90	Aldrich (USA)
	- FeSO ₄ , 7H ₂ O	99	Aldrich (USA)
	- Fe(NO ₃) ₃ , 6H ₂ O	99,99	Aldrich (USA)
	- Al ₂ (SO ₄) ₃ , 18H ₂ O	95	Panreac
Polysaccharide	- β-cyclodextrine	-	Aldrich
Protéine	- SAB (sérum albumine bovine)	96	Sigma
Indicateur Coloré	- Ferrozine (5,6-diphényl-3-(2-pyridyl)-1,2,4 triazine-4',4''-disulfonate de sodium hydrate)	-	Aldrich (Allemagne)
Tampons phosphate et acétate	- Na ₂ HPO ₄	99	Aldrich (USA)
	- KH ₂ PO ₄	99.5	Fluka (Indonésie)
	- CH ₃ CO ₂ Na, 3H ₂ O	99	Alfa Aesar
	- CH ₃ CO ₂ H	99,8	Prolabo
Autres	- MeOH, MeCN	UV-Vis Analyse	

III.2.2. Complexation

La complexation des ions métalliques par les polyphénols sélectionnés a été suivie par spectroscopie UV-Visible (HP 8453 à barrettes de diodes). La température dans la cellule a été maintenue à 25°C au moyen d'un bain thermostaté. Les solutions d'ion métallique ont été préparées dans MeOH (Al^{III}, Fe^{III}, Cu^{II}), MeOH/H₂SO₄ 0,2 M (96/4) (Fe^{II}) et MeCN/HCl 0,2M (96/4) (Cu^I).

Dans 2 ml d'une solution 50 µM de polyphénol dans le tampon acétate à pH 5 placés dans la cellule du spectrophotomètre sont ajoutés 50 µL d'une solution d'ion métallique (rapport molaire métal/polyphénol ρ = 0.5 à 5). La complexation est suivie dans le temps (mode cinétique).

III.2.3. Dosage de Fe^{II}

Un volume de 0,5 ml d'une solution 10⁻⁴ M de Fe^{II} ou Fe^{III} dans le tampon acétate, en présence ou absence de polyphénol (1 equiv.) est rapidement prélevé, dilué dans 1,5 ml d'une solution 10⁻³ M de ferrozine (FZ) dans le tampon et agité à température ambiante pendant 10 min. Le spectre UV-visible est ensuite enregistré afin de mesurer l'absorbance à 564 nm ($\epsilon(\text{Fe}^{\text{II}}\text{-FZ}) = 27900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [8].

Cette méthode de dosage s'appuie sur la complexation sélective de Fe(II) par la ferrozine (**Fig. III.6**) (Eq 1) pour conduire à un complexe stable de couleur magenta [9, 10]. L'utilisation de ce composé présente plusieurs avantages : sa solubilité dans l'eau, sa haute sélectivité, sa sensibilité et son faible coût [9, 11].

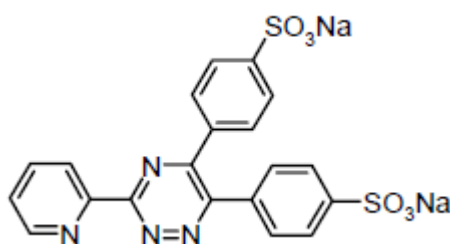
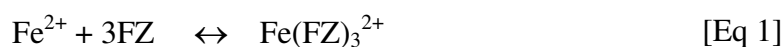


Figure III.6: Structure de la ferrozine [9]



La complexation de Fe(II) par la ferrozine est rapide et conduit à un complexe stable pour un pH compris entre 4 et 8 [12, 13].

III.2.4. Procédures d'ajustement de courbes (*curve fitting*)

Le traitement des courbes exprimant la variation de l'absorbance en fonction du temps (détermination de constantes de vitesse) ou de la concentration d'ion métallique (détermination de constantes thermodynamiques de complexation) a été réalisé sur un PC à l'aide du programme *Scientis* (MicroMath, Salt Lake City, USA) après implémentation dans les modèles des équations adéquates déduites de la loi de Beer-Lambert, de la loi d'action de masse et des lois de conservation de la matière (constantes de complexation) ou des lois de la cinétique chimique (constantes de vitesse). Dans ce dernier cas, il s'agit donc d'un ensemble d'équations différentielles dont les conditions initiales sur les concentrations sont précisées. Les courbes théoriques sont ajustées aux courbes expérimentales par régression non-linéaire selon la méthode des moindres carrés. Les écarts-types sur les paramètres à optimiser (constantes de vitesse, coefficients d'absorption molaires voire stœchiométrie) sont aussi rapportés.

III.2.5. Analyses en Chromatographie Liquide Ultra Performance (CLUP)

L'analyse des produits d'oxydation éventuels a été effectuée sur une CLUP Waters AcquityTM équipée d'un détecteur à barrettes de diodes Waters et couplée à un spectromètre de masse ultra piège ionique Bruker-daltonics HCT. La séparation est réalisée sur une colonne RP-18 Waters AcquityTM de type BEH (2.1 × 50 mm, 1.7µm). Le solvant d'élution (débit = 0.28 mL/min) est un mélange d'une solution aqueuse à 0,05% d'acide formique (A) et d'acétonitrile (B). La solution à injectée est de 2 µL. La détection est effectuée à 280 nm. Les spectres masse ont été enregistrés en mode electrospray négatif.

Tableau XXIX : Gradient d'élution pour l'analyse CLHP-SM

Temps	A%	B%
0	95	5
5	65	35
8.5	0	100
8.6	95	5
10	95	5

III.2.6. Interaction des ions métalliques avec la rutine

La rutine est un 3-O-glycoside de la quercétine (**Fig. III.7a**). La partie glycosidique de la rutine est le disaccharide rutinose (L-Rha- α -1,6-D-Glc β). La rutine est présente dans de nombreuses plantes, fruits et légumes. Le thé noir, les pommes et les agrumes en sont particulièrement riches. Au cours de la digestion, la rutine est métabolisée en son aglycone par la microflore intestinale.

La rutine est un inhibiteur de la peroxydation lipidique initiée par les ions de métaux de transition [14-17]. **Negre-Salvayre et al.** ont montré que la rutine inhibe l'effet pro-oxydant d' α -tocophérol et l'acide ascorbique contre le stress induit par l'oxydation des lipoprotéines [18]. Des activités antimutagène et anti-inflammatoire ont aussi été mises en évidence [19].

L'efficacité antioxydante de la rutine est typiquement plus faible que celle de son aglycone quercétine [20, 21]. Malheureusement, la valeur thérapeutique potentielle de la quercétine est restreinte en raison de son activité cytotoxique et mutagène qui pourrait être liée à sa capacité à produire des EOR par autoxydation [18]. Par conséquent des travaux ont été entrepris pour améliorer l'activité antioxydante de la rutine. Ainsi, les complexes de la rutine et des ions de métaux de transition se sont révélés plus efficaces que la rutine en raison de leur activité de type superoxyde dismutase [17, 18].

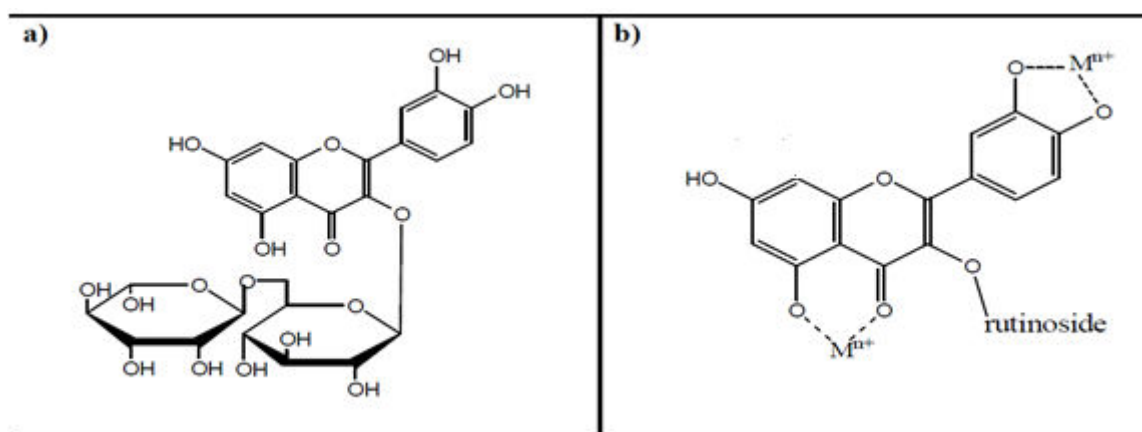


Figure III.7 : a) Structure chimique de la rutine, b) Sites éventuelles de complexation métallique de la rutine.

Des travaux sur la complexation métallique de la rutine ont été rapportés [2, 22-25]: La rutine est capable de complexer les ions métalliques *via* deux sites de complexation: le groupement 5-hydroxy-4-carbonyle et le groupement *ortho*-dihydroxybenzène (catéchol) (Fig. II.7b). Par ailleurs l'étude de **De Souza *et al.*** a montré que la rutine possède un site de liaison en plus: 7-OH du cycle A entre deux molécules de rutine et le fer ferreux [26] (Fig. II.7b). Ainsi la rutine est capable de chélater à la fois trois ions métalliques.

Les complexes métalliques ont aussi été caractérisés par spectrométrie de masse [27]. Dans le cas de la complexation de la rutine par Cu^{II} , quatre complexes de différentes stœchiométries pourraient être produits, tandis que la complexation de Fe^{II} par la rutine donnent seulement deux complexes de stœchiométrie 1:1 et 1:2. Cependant l'analyse par la spectroscopie RMN ^1H , a donné une stœchiométrie de type 2:1 pour le complexe Fe^{II} - rutine, dans du méthanol [26]. L'oxydation de la rutine en présence de ces ions dans un tampon phosphate (pH 8, 97°C) a été étudiée par spectroscopie UV-visible et CLHP [28].

La partie glycosidique de la rutine est responsable de la forte stabilité de la rutine. Le tableau XXX montre bien l'influence du sucre sur l'acidité et surtout sur le caractère réducteur de l'aglycone. En particulier, à pH neutre, la rutine est un mélange de forme neutre et de alors que la quercétine est un mélange de monoanion et dianion. La rutine est donc moins réductrice ou moins oxydable que la quercétine d'où une bien moins grande sensibilité à l'autoxydation en l'absence d'ion métallique ajouté.

Tableau XXX: pKa et potentiel redox de la rutine et la quercétine

	Quercétine	Rutine
pKa a)	5.54, 6.95, 8.21, 9.77 (11.0)	6.95, 8.30, 10.04 (10.9)
E^0 (pH 3) b)	-	1.02
E^0 (pH 7)	0.33	0.60

a) Référence [29]: 20°C, force ionique = 0.1 M. b) E^0 : potentiel standard apparent du couple $\text{ArOH}/\text{ArO}^\bullet$, en V à 20°C (réf. = électrode normale à H_2) [30].

Peu d'études cinétiques sur la complexation de la rutine avec les ions métalliques et l'évolution éventuelle des complexes ont été réalisées dans un milieu faiblement acide. La majorité des travaux a été réalisé à pH neutre.

III.2.6.1. Interaction de la rutine avec Al^{III}

Après ajout d'aluminium (III) à une solution de rutine à pH 5, nous avons obtenu les spectres représentés sur la figure III.8.

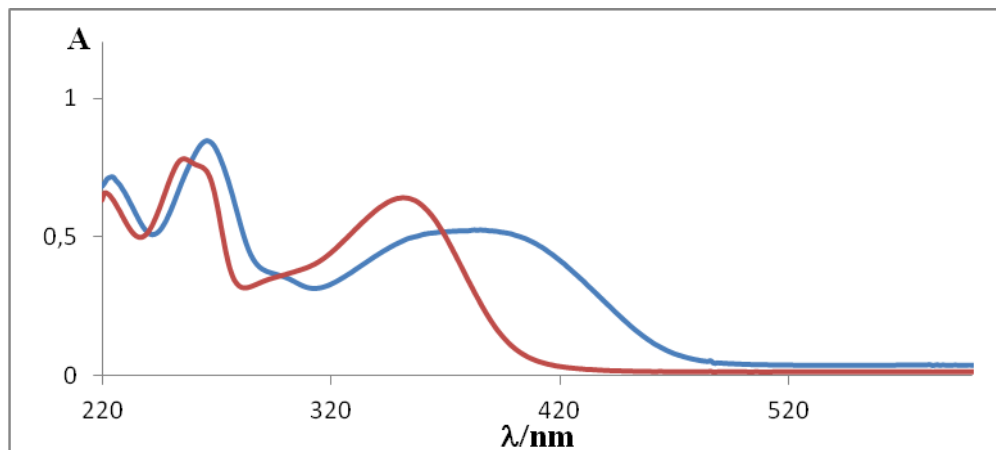


Figure III.8: Complexation de la rutine (50 μ M) par Al^{III} (5 équiv.) dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C). — Rutine, — Rutine- Al^{3+}

Le spectre de la rutine est caractérisé par deux bandes à 255 (bande I) et 350 (bande II) nm. L'intensité de la bande II (rutine libre) diminue graduellement, en parallèle, une nouvelle bande apparaît à une longueur d'onde 382 nm reflétant la formation d'un complexe Al^{III} -rutine.

Le suivi cinétique de la complexation rutine - Al^{III} montre que la formation d'un complexe stable en quelques minutes et présente un phénomène du 1^{er} ordre apparent (**Fig. III.9**).

Le graphe obtenu (**Fig. III.9**) en traçant l'absorbance aux maxima d'absorption du complexe formé avec le métal en fonction du rapport Al^{III} /rutine, suggère une complexation réversible qui requiert un excès de Al^{III} pour atteindre la complexation totale de la rutine. Ainsi la formation de ce complexe peut être estimée dans l'hypothèse d'une stœchiométrie 1:1.

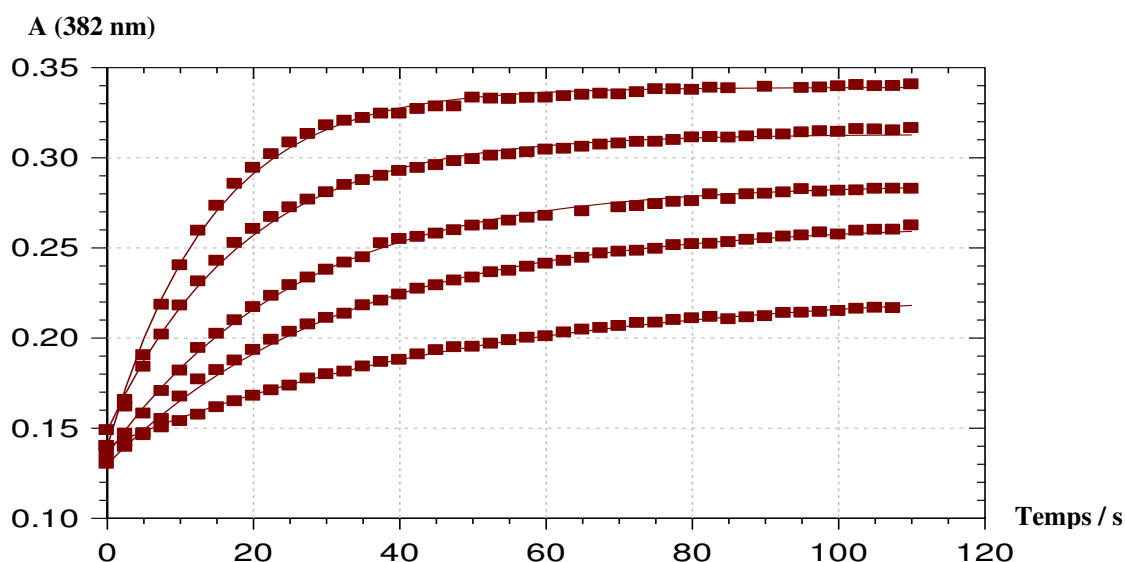


Figure III.9: Tracé des variations de $A(382 \text{ nm})$ après ajout de Al^{3+} (1, 1.5, 2, 3 et 5 équiv.). Concentration de rutine = $50 \mu\text{M}$, tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C . Les courbes en trait plein sont le résultat de l'analyse cinétique du 1^{er} ordre selon: $A = A_f - (A_f - A_0)\exp(-k_{\text{obs}}t)$

Les résultats de la constante cinétique apparente de formation du complexe (k_{obs}) de la rutine avec Al^{III} , sont rapportés dans le tableau ci-après.

Tableau XXXI: Complexation de la rutine par Al^{III} (tampon acétate, pH 5, 25°C). Suivi cinétique à 382 nm durant 2 min. Concentration de rutine = $50 \mu\text{M}$

M_t/L_t	A_0 (382 nm)	A_f (382 nm)	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
1	0.140	0.228	0.020
1.5	0.130	0.264	0.031
2	0.136	0.286	0.038
3	0.149	0.313	0.054
4	0.143	0.309	0.062
5	0.140	0.339	0.071

L'amplitude $\Delta A = A_f - A_0$ est ensuite tracée en fonction de la concentration totale de métal (M_t) (**Fig. III.10**) puis analysée à l'aide du logiciel *Scientist* à partir des équations ci-après (dédites d'une combinaison de la loi de Beer-Lambert, de la loi d'action de masse pour le complexe ML et des lois de conservation du ligand L et du métal M) :

$$[L] = L_t / (1 + K[M])$$

$$[M] = M_t / (1 + K[L])$$

$$\Delta A = \Delta \epsilon K[M][L]$$

L: concentration de ligand (rutine) libre, L_t : concentration totale de ligand

M: concentration de métal (Al^{3+}) libre, M_t : concentration totale de métal

K : constante de stabilité du complexe, $K = [ML]/([M][L])$

$$\Delta \epsilon = \epsilon_{ML} - \epsilon_L$$

- La procédure d'ajustement de courbe donne:

$$K = 28 (\pm 11) \times 10^3 \text{ M}^{-1}, \Delta \epsilon = 4400 (\pm 400) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ à } 382 \text{ nm}, r = 0.96$$

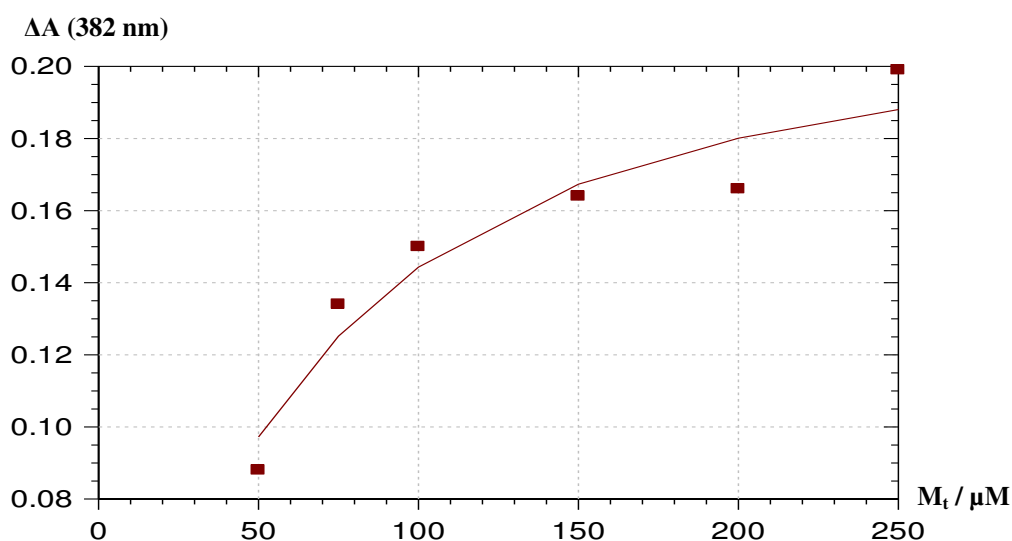


Figure III.10: Tracé des variations de $\Delta A(382 \text{ nm})$ en fonction de la concentration totale de métal. Concentration de rutine = $50 \mu\text{M}$, tampon acétate 0.1 M , pH 5, 25°C . La courbe en trait plein est le résultat de la procédure d'ajustement de courbe (voir texte).

Nous en déduisons: $\epsilon(\text{rutine}) = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 382 nm , $\epsilon(\text{complexe}) = 7200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 382 nm .

Enfin, nous pouvons écrire: $k_{\text{obs}} \approx k_1 M_t + k_{-1}$

k_1 : constante cinétique de formation du complexe, k_{-1} : constante cinétique de dissociation du complexe.

Le tracé de la constante cinétique apparente de formation du complexe k_{obs} en fonction de M_t (**Fig. III.11**) conduit effectivement à une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine donnent accès à k_1 et k_{-1} respectivement: $k_1 = 250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-1} = 0.012 \text{ s}^{-1}$, $r = 0.986$

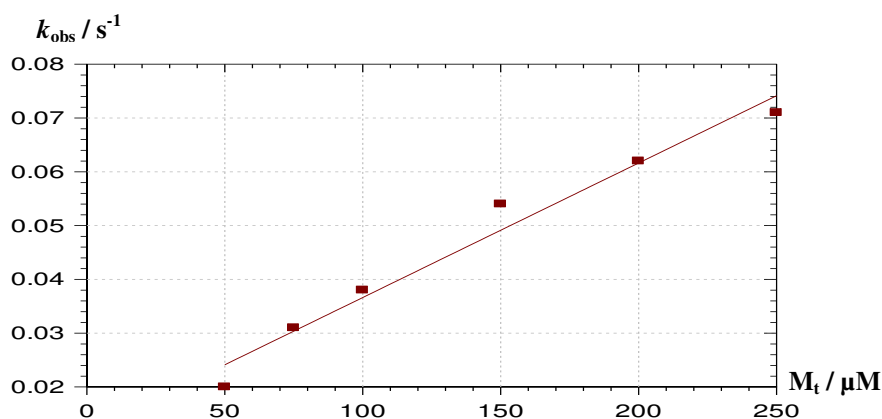


Figure III.11: Tracé de la constante cinétique apparente de formation du complexe k_{obs} en fonction de M_t

Nous en déduisons: $K = k_1 / k_{-1} \approx 21 \times 10^3 M^{-1}$. Cette valeur de K est en accord raisonnable avec celle déduite de l'analyse de ΔA en fonction de M_t .

III.2.6.2. Interaction de la rutine avec les ions de Fer

III.2.6.2.1. Complexation rutine - Fe^{3+}

En absence d'ion métallique et dans le tampon acétate, la rutine est caractérisée par deux bandes d'absorption avec des maxima à 255 nm et 350 nm qui correspondent respectivement aux cycles A et B. L'addition de Fe^{3+} en concentration croissante à la solution de la rutine provoque l'apparition d'une nouvelle bande vers 400 nm caractéristique du complexe (**Fig. III.12**).

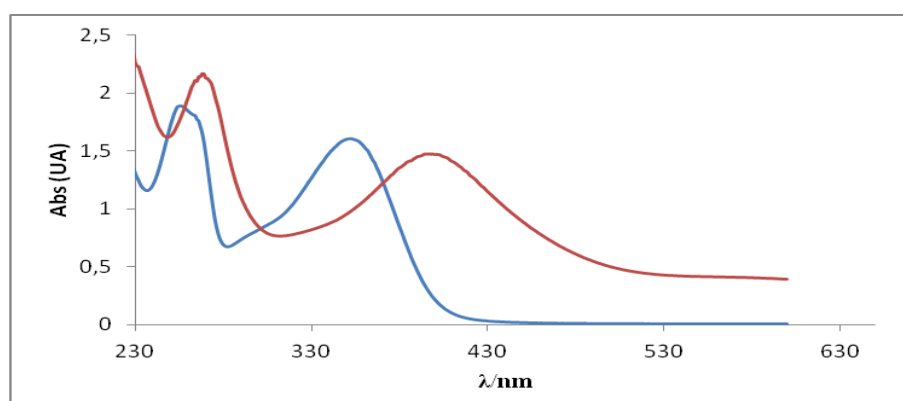


Figure III.12: Complexation de la rutine (50 μM) par 1 equiv. de Fe^{3+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). — Rutine, — Rutine - Fe^{3+}

L'absorbance finale à 400 nm augmente linéairement avec la concentration totale de Fe^{III} (Fig. III.13). Pour un rapport molaire $\text{Fe}^{\text{III}} / \text{rutine} > 1$, $A_{\text{final}}(400 \text{ nm})$ atteint sa valeur maximale. Ces variations sont caractéristiques d'une complexation quasi-irréversible de stoechiométrie 1:1.

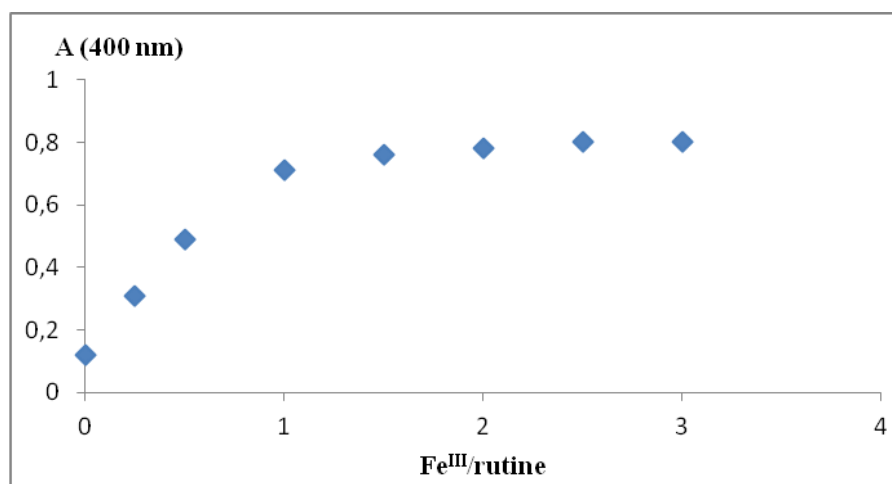


Figure III.13: Variation de l'absorbance finale à 400 nm en fonction de la concentration totale de Fe^{III} . Concentration de rutine = 50 μM (tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C).

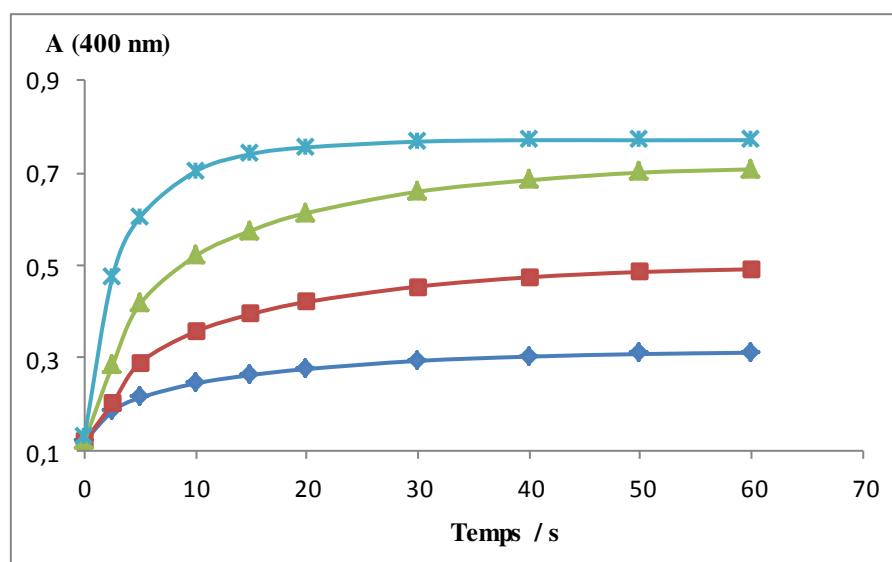


Figure III.14: Suivi cinétique de la complexation rutine - Fe^{III} (tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C). ◆ $\text{Fe}^{\text{III}} / \text{rutine} = 0,25$, ■ $\text{Fe}^{\text{III}} / \text{rutine} = 0,5$, ▲ $\text{Fe}^{\text{III}} / \text{rutine} = 1$, x $\text{Fe}^{\text{III}} / \text{rutine} = 2$. Concentration de rutine = 50 μM .

La complexation de Fe^{III} par la rutine est rapide qui conduit à un complexe stable en quelques secondes. Cependant, deux étapes peuvent être mises en évidence (Fig. III.14 et

III.15): une première très rapide qui pourrait correspondre à la formation d'un complexe labile (Rutine - Fe^{III})₁ qui évolue dans la deuxième étape en un complexe plus stable (Rutine - Fe^{III})₂. On peut donc schématiser la complexation rutine-Fe^{III} par deux réactions successives et quasi-irréversibles:

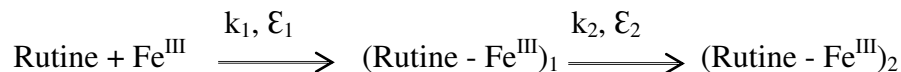


Tableau XXXII: Complexation de la rutine par Fe^{III} (tampon acétate, pH 5, 25°C). Suivi cinétique à 400 nm durant 1 min. Concentration de rutine = 50 µM

Rapport molaire Fe ^{III} / Rutine	$k_1 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^{-3} k_2 / \text{s}^{-1}$	$\epsilon_1 (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\epsilon_2 (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
0,5	5256 (± 114)	59 (± 6)	5719 (± 32)	9975 (± 11)
1	5506 (± 208)	84 (± 5)	12878 (± 78)	14793 (± 14)
1,5	8822 (± 316)	82 (± 2)	10470 (± 144)	14861 (± 15)
2	4431 (± 120)	108 (± 2)	14005 (± 195)	15418 (± 9)
3	4452 (± 376)	180 (± 34)	14773 (± 644)	16676 (± 19)

Les valeurs de k_1 ne présentent pas de dépendance significative en fonction de la concentration totale de Fe^{III}. En revanche, k_2 tend à augmenter quand la concentration totale de Fe^{III} augmente. Il est possible que le réarrangement du 1^{er} complexe en le second soit assisté par la faible coordination d'un 2^e ion Fe^{III}.

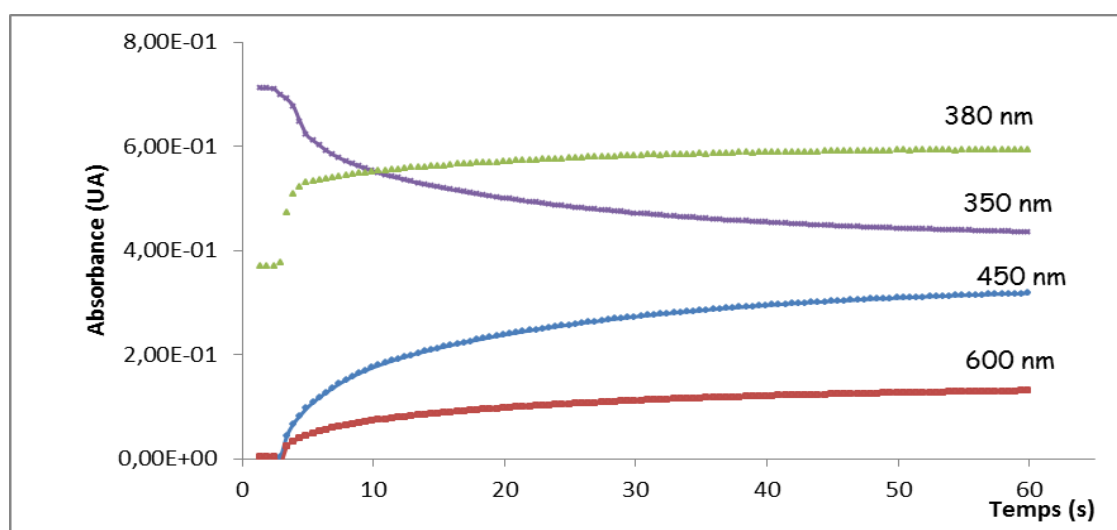


Figure III.15: Suivi cinétique à plusieurs longueurs d'onde de la complexation de la rutine (50 µM) par 1 equiv. de Fe³⁺ (tampon acétate pH=5, 25°C).

L'analyse cinétique peut être conduite à différentes longueurs d'onde d'absorption du complexe (380, 450, 600 nm) ou à la longueur d'onde d'absorption maximale de la rutine libre (350 nm). Elle a été réalisée sur 60 secondes pour cerner au mieux le phénomène rapide de complexation et pour mieux mettre en évidence l'évolution éventuelle des complexes (**Fig. III.15**). Ainsi l'analyse cinétique à 380 nm permet de mieux visualiser les étapes rapide et lente.

A partir des constantes de vitesse obtenues par l'analyse des variations d'absorbance à 400 ou 450 nm, un graphe de distribution des espèces en fonction du temps peut être tracé (**Fig. III.16**).

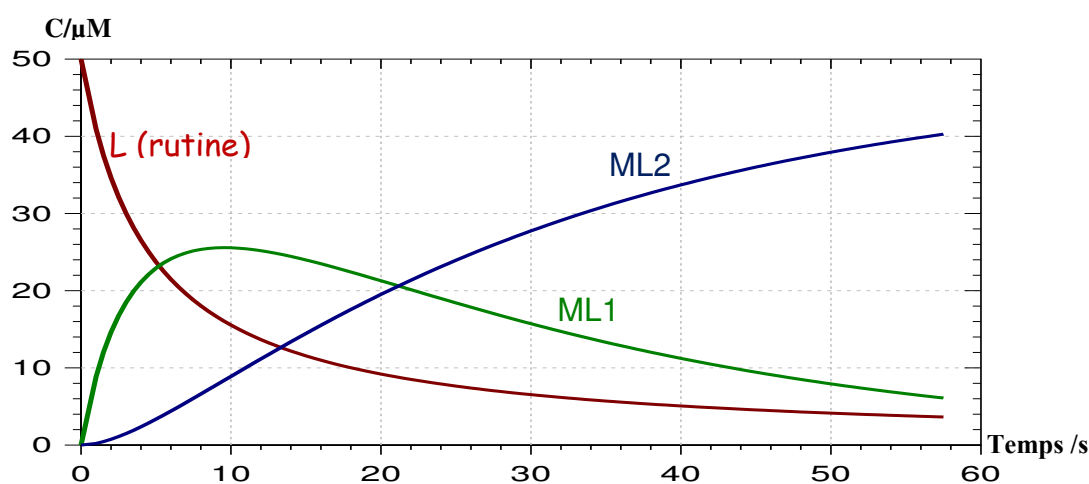


Figure III.16: Distribution des espèces lors de la complexation de la rutine (50 μM) par 1 equiv. de Fe^{3+} (tampon acétate, pH, 25°C). Analyse à 450 nm: $k_1 = 44.4 (\pm 0.9) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 44.6 (\pm 1.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

La figure II.16 confirme la formation d'un premier complexe (ML1, produit cinétique) qui ne s'accumule qu'à hauteur de 50%, puis évolue rapidement en un second complexe (ML2, produit thermodynamique).



Dans leur étude par LCHP-SM, Mira et *al.* ont rapporté la même stœchiométrie (1:1) pour le complexe observé, soit $[\text{Fe}^{\text{III}} + (\text{Rutine-2H})^+]$ [32].

Ces résultats sont en bon accord avec les données de la littérature [32, 33] sur la complexation rutine- Fe^{III} en milieu faiblement acide (pH 5.5), dans le tampon acétate ($\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$) et dans le tampon phosphate 10 mM ($\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$) respectivement. Cependant l'effet

bathochrome obtenu ici est de 40 nm. Ce qui dénote l'importance majeure du pH et de la nature du tampon utilisé, présence d'ions phosphate, sur l'interaction des ions Fe^{3+} avec la rutine.

Le site probable de complexation de la rutine par les ions des métaux de transition à pH 4-5 est le groupement 5-hydroxy-4-oxo. En effet, la capacité de complexation du noyau catéchol de la rutine diminue fortement quand le pH du tampon diminue car la formation du complexe nécessite la dissociation des 2 groupements 3'-OH et 4'-OH, ce qui est rendu difficile par la forte concentration de protons. En revanche, la complexation via le groupement 5-hydroxy-4-oxo ne nécessite le déplacement que d'un seul proton. Notons par ailleurs que le profil de dissociation des groupements OH (ordre d'acidité décroissante) est le suivant : 7-OH > 4'-OH > 5-OH > 3'-OH [32].

a. Influence de la rutine sur la stabilité de Fe^{III}

Après avoir démontré la complexation de la rutine avec les ions Fe^{III} , notre second objectif est de vérifier si ce phénomène de complexation s'accompagne ou non de l'oxydation partielle du phénol, et donc de la réduction partielle de Fe^{3+} en Fe^{2+} . Pour ce faire, nous avons utilisé le test ferrozine pour doser les ions Fe^{2+} éventuels (**Fig. II.17**) et l'analyse CLUP-SM.

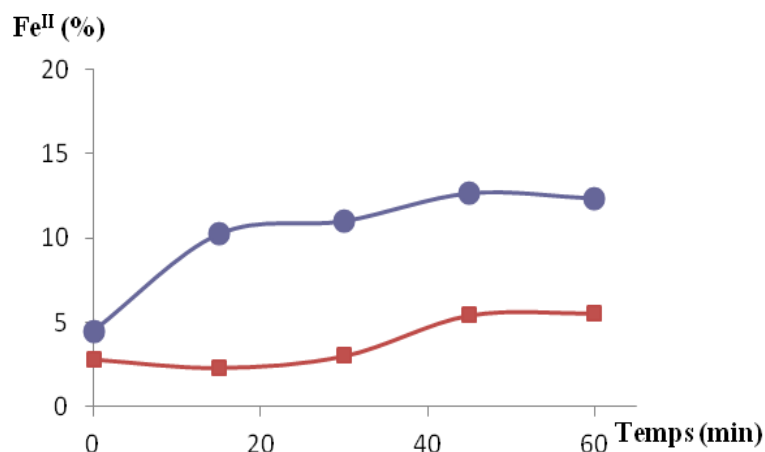


Figure III.17: Dosage de Fe^{2+} dans des solutions de Fe^{3+} (100 μM) en absence ou en présence de rutine (1 equiv.), tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C —●— $\text{Fe}^{\text{III}} / \text{rutine}$, —■— Fe^{III}

D'après ce résultat, nous constatons une réduction marginale ($\approx 7\%$) des ions Fe^{3+} par la rutine, ce qui suggère que la rutine n'est pas significativement oxydée dans ces conditions.

- Acidification des solutions du complexe rutine-Fe^{III}

La solution du complexe rutine - Fe³⁺ (mélange équimolaire) dans le tampon acétate à pH 5 est acidifiée par addition d'un petit volume de HCl concentré (pH final = 2 ou 0.6). Les spectres enregistrés sont présentés dans la figure qui suit:

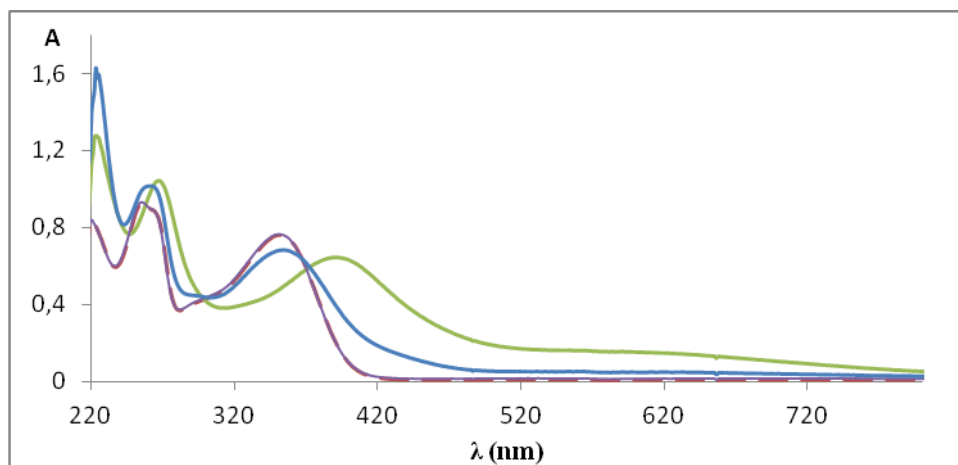


Figure III.18: Spectres UV-vis de solutions Rutine (50 µM) + 1 equiv. Fe³⁺ à différents pH (25°C). — Rutine (R, pH 5), R/Fe³⁺ (pH 5) —, R/Fe³⁺ (pH 2) —, R/Fe³⁺ (pH 0.6) — —

A pH 0.6, le complexe rutine - Fe³⁺ est complètement dissocié et un spectre identique à celui de la rutine libre est obtenu. L'oxydation de la rutine semble bien négligeable.

Ces données ont été confirmées par l'analyse LCUP-MS (Annexe 2), qui montre que la rutine n'est effectivement pas oxydée en présence de Fe³⁺.

c. Interaction de la rutine avec Fe^{III} en présence de la SAB

L'addition de 3 équivalents de la protéine SAB a engendré l'inhibition de la complexation rutine-Fe^{III} (**Fig. II.19**) dans le tampon acétate à pH 5. Par ailleurs, divers auteurs ont montré que les flavonoïdes manifestent une affinité modérée pour l'albumine avec des constantes d'association K variant de 1 à $15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [34, 35]. Pour le couple rutine - SAB, on a; $K = 2 - 11 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ à pH 7,4 [34, 36]. Même si une interaction faible Fe^{III} - SAB n'est pas exclue [37], il est probable que c'est l'interaction de la SAB avec la rutine qui a rendu inaccessibles à Fe^{III} les sites de liaison du flavonol. Ainsi, dans le tractus digestif, les interactions Fe^{III} – polyphénol sont susceptibles d'être fortement inhibées par la présence de protéines capables d'interagir avec les polyphénols.

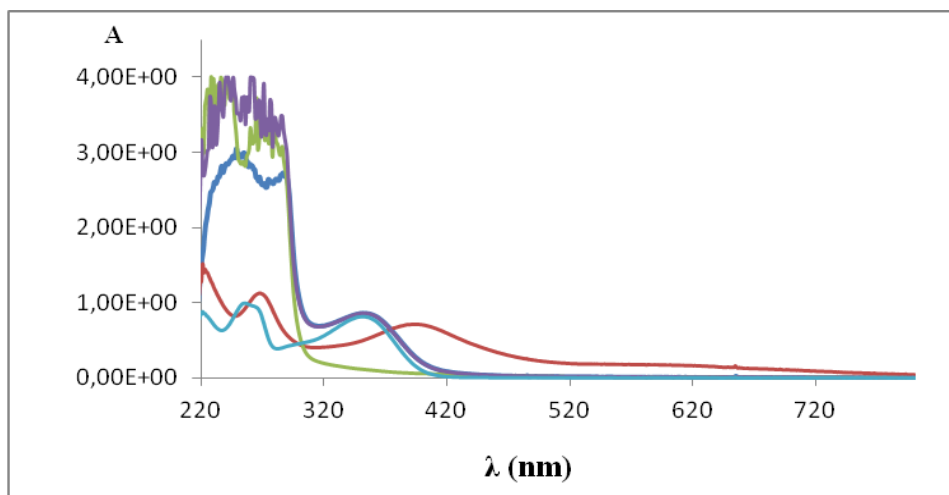


Figure III.19: Interaction de la rutine (50 µM) avec Fe³⁺ (1 equiv.) en présence et en absence de la protéine SAB (3 equiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). — Rutine, — SAB (250 µM), — Rutine - Fe³⁺, — Rutine - SAB - Fe³⁺

III.2.6.2.2. Complexation rutine - Fe²⁺

L'ajout de Fe^{II} à la solution de rutine provoque une variation significative du spectre de la rutine après 3h avec un déplacement bathochrome $\Delta\lambda = 360 - 320 = 40$ nm pour la bande principale (Fig. III.20). En revanche, au cours des premières minutes, les modifications spectrales sont négligeables.

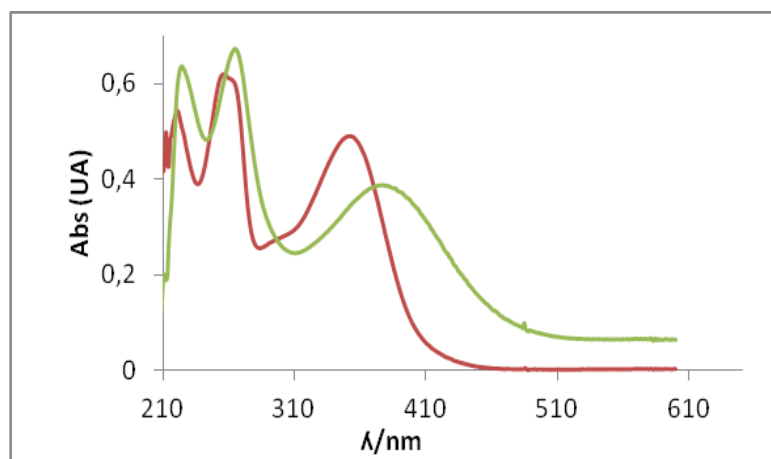
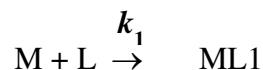


Figure III.20: Interaction de la rutine (50 µM) avec Fe²⁺ (1 equiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C) après 3h. — Rutine, — Rutine - Fe²⁺

Une analyse cinétique de l'interaction Fe^{II} - rutine a été réalisée à différentes longueurs d'onde (350, 380, 450 et 600 nm) pour comparaison avec la complexation Fe^{III} - rutine. Elle a été effectuée sur une durée de 3 heures, pour mettre en évidence l'apparition et l'évolution éventuelles des complexes (**Fig. III.21**). Ainsi, l'analyse cinétique à 450 nm a permis de déterminer la constante de vitesse de complexation k_1 et le coefficient d'absorption molaire ϵ_1 du complexe:



$\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Rutine}$	$k_1 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$\epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	r
1 équiv. Fe^{II}	1.25 (± 0.02)	6639 (± 80)	0.999

La complexation de la rutine avec les ions ferreux est donc très lente en milieu aqueux faiblement acide (plus lente qu'avec Fe^{III} par un facteur $3\text{-}4 \times 10^3$).

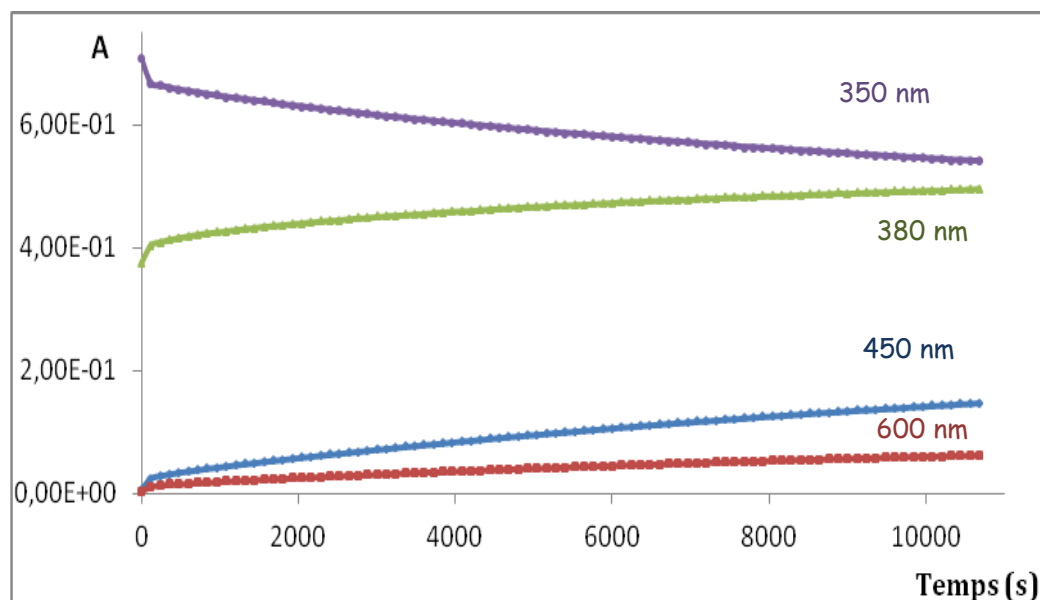


Figure III.21: Suivi cinétique de l'interaction de la rutine (50 μM) avec Fe^{2+} (1 equiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C).

Le dosage de Fe^{II} par le test à la ferrozine indique que l'autoxydation de Fe^{II} en Fe^{III} est négligeable au cours des premières heures (**Fig. III.22**). En revanche, après 24 h, alors que Fe^{II} reste parfaitement stable en l'absence de rutine, la quantité de Fe^{II} en présence de rutine a diminué de moitié, ce qui suggère que la plus forte affinité de la rutine pour Fe^{III} que pour Fe^{II} finit par déstabiliser Fe^{II} au profit de Fe^{III} .

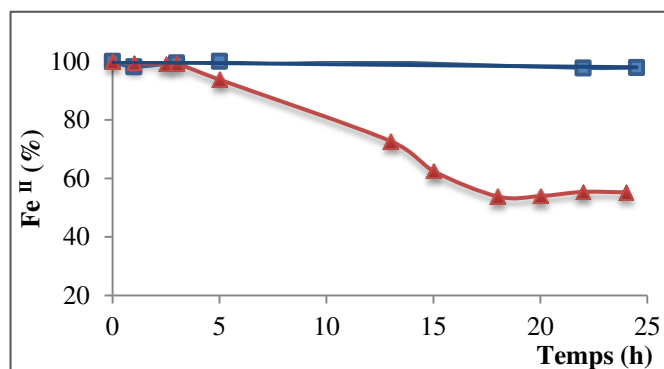


Figure III.22: Dosage de Fe^{2+} (100 μM) en absence ou en présence de rutine (1 équiv.), tampon acétate (pH 5, 25°C). ▲ Rutine- Fe^{2+} , ■ Fe^{2+}

Dans des publications antérieures [38, 39], il a été montré que le fer (II) ne modifie pas les caractéristiques spectrales des flavonoïdes en milieu aqueux (eau/acide acétique 30/70, V/V et pH 2.5) et dans le tampon hexamine / HCl (pH 5) en présence d'une solution aqueuse de tetraméthylemurexide. Cependant, après quelques heures d'agitation de la solution flavonoïde- Fe^{II} (1/1), le spectre du complexe flavonoïde- Fe^{III} est obtenu en raison de l'autoxydation de Fe^{II} . Dans nos conditions, la complexation rutine- Fe^{II} est très lente mais ne s'accompagne d'aucune autoxydation de Fe^{II} sur les premières heures. En outre, l'analyse LCUP-MS (Annexe 3) n'a montré aucune oxydation de la rutine.

III.2.7. Interaction des ions métalliques avec l'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique (acide 5-O-caféoylquinique) est un acide phénolique (**Fig. III.23**), qui est présent dans des légumes courants (pomme de terre) et dans les fruits (tomate, pommes, olive). Cependant, c'est l'acide hydroxycinnamique le plus abondant du café (graines et boisson). La quantité totale de polyphénols dans une tasse de café varie de 200 à 550 mg et la quantité d'acide chlorogénique varie de 70 à 325 mg [40]. L'analyse du plasma de sujets ayant ingéré du café a révélé la présence majoritaire de formes natives, de l'acide chlorogénique, soulignant ainsi la possibilité d'une absorption de ces composés chez l'Homme dès l'estomac et l'intestin grêle [41]. Cheng *et al.* ont démontré que l'acide chlorogénique est un inhibiteur de la peroxydation lipidique initié par les métaux de transition et l'étude de la relation structure-activité à révéler que le groupement catéchol est responsable de l'activité antioxydante [42].

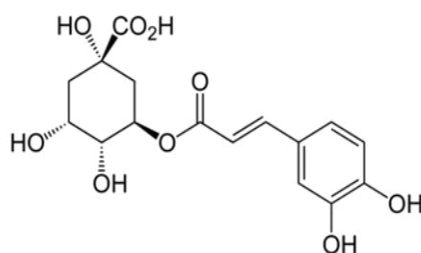


Figure III.23: Structure chimique de l'acide chlorogénique

La complexation des ions d'aluminium et du fer par l'acide chlorogénique a été étudiée par spectroscopie UV-visible en mode cinétique pour différentes concentrations d'ion métallique.

III.2.7.1. Interaction de l'acide chlorogénique avec Al^{III}

Dans le tampon acétate à pH 5, le spectre UV-visible de l'acide chlorogénique est caractérisé par une bande intense avec un maximum d'absorption à 323 nm et un épaulement à 295 nm (**Fig. III.24**). L'ajout de Al^{3+} provoque l'apparition d'une nouvelle bande située à 350 nm caractéristique du complexe Al^{3+} - acide chlorogénique.

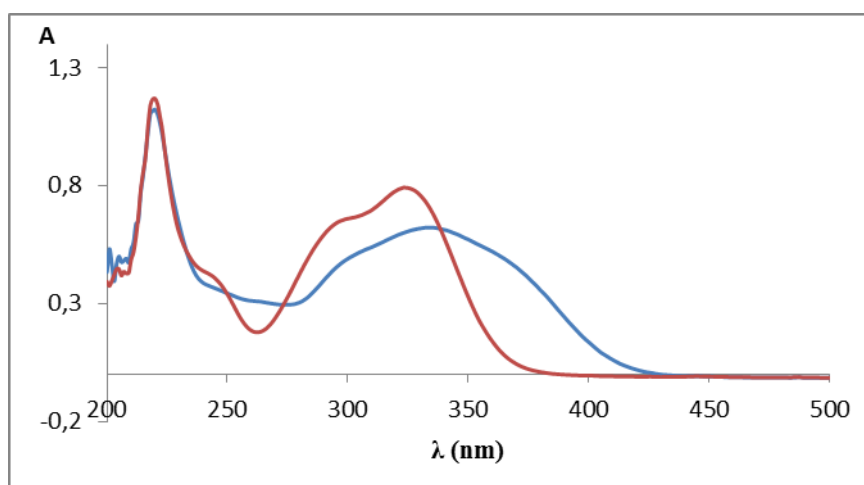


Figure III.24: Complexation de l'acide chlorogénique (50 μ M) par 5 équiv. de Al^{III} dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C). — Acide chlorogénique, — Acide chlorogénique - Al^{3+}

La variation de l'absorbance finale à 350 nm en fonction de la concentration de Al^{III} peut s'interpréter par la formation réversible d'un complexe acide chlorogénique - Al^{III} de stoechiométrie 1:1 (**Fig. III.25**).

La complexation, qui apparaît plus rapide qu'avec la rutine, est typiquement terminée en 20 à 30 s.

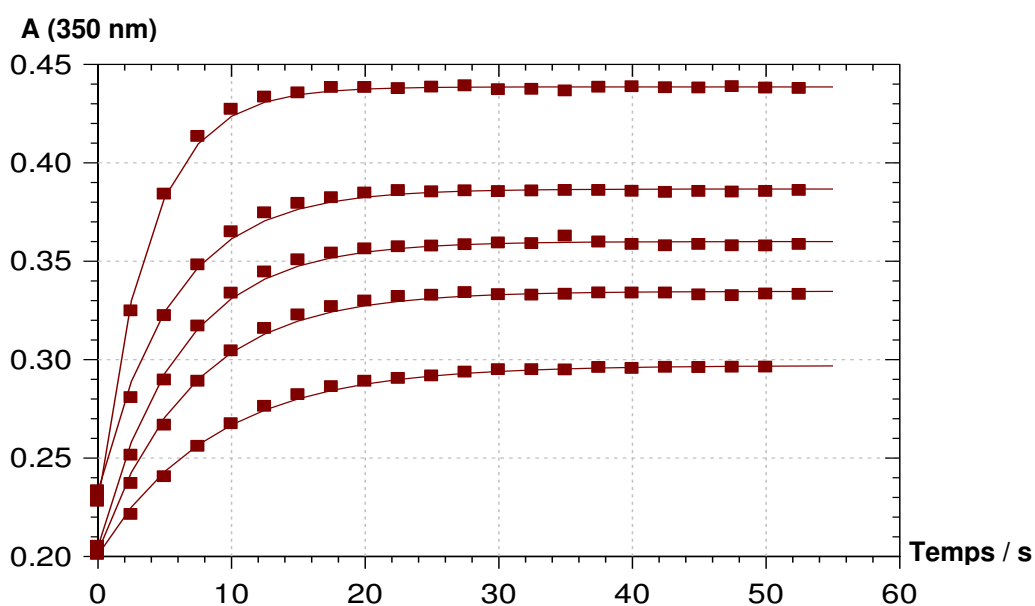


Figure III.25: Tracé des variations de A(350 nm) après ajout de Al³⁺ (2, 3, 4, 5 et 10 équiv.). Concentration d'acide chlorogénique = 50 μM, tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C. Les courbes en trait plein sont le résultat de l'analyse cinétique du 1^{er} ordre.

Les valeurs de la constante de vitesse k_{obs} , correspondante au phénomène du 1^{er} ordre apparent, sont rapportées dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXXIII: Complexation de l'acide chlorogénique par Al^{III} (tampon acétate, pH 5, 25°C). Suivi cinétique à 382 nm durant 1 min. Concentration d'acide chlorogénique = 50 μM

M_t/L_t	A_0 (350 nm)	A_f (350 nm)	$10^4 k_{obs} / s^{-1}$
1	0,176	0,24	832
2	0,1925 (± 0,01)	0,296 (±0,07)	1125 (±51)
3	0,214 (± 0,02)	0,345 (±0,01)	1450 (±1)
4	0,223 (±0,04)	0,375 (±0,03)	1563± (118)
5	0,230 (±0,01)	0,384 (±0,01)	1794 (±14)
7	0,201	0,381	2114
9	0,223 (±0,01)	0,400 (±0,01)	2402 (±16)
10	0,230 (±0,01)	0,425 (±0,01)	2666 (±24)

L'amplitude $\Delta A = A(t \approx 1 \text{ min}) - A_0$ est tracée en fonction de la concentration totale de métal (M_t) (**Fig. III.26**) puis analysée à l'aide du logiciel *Scientist*. La procédure d'ajustement de courbe donne:

$$K = 7.9 (\pm 0.9) \times 10^3 \text{ M}^{-1}, \Delta\varepsilon = 6070 (\pm 230) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ à } 350 \text{ nm}, r = 0.99$$

Bien que la complexation soit plus rapide qu'avec la rutine, le complexe Al^{3+} - acide chlorogénique se révèle moins stable que le complexe Al^{3+} - rutine.

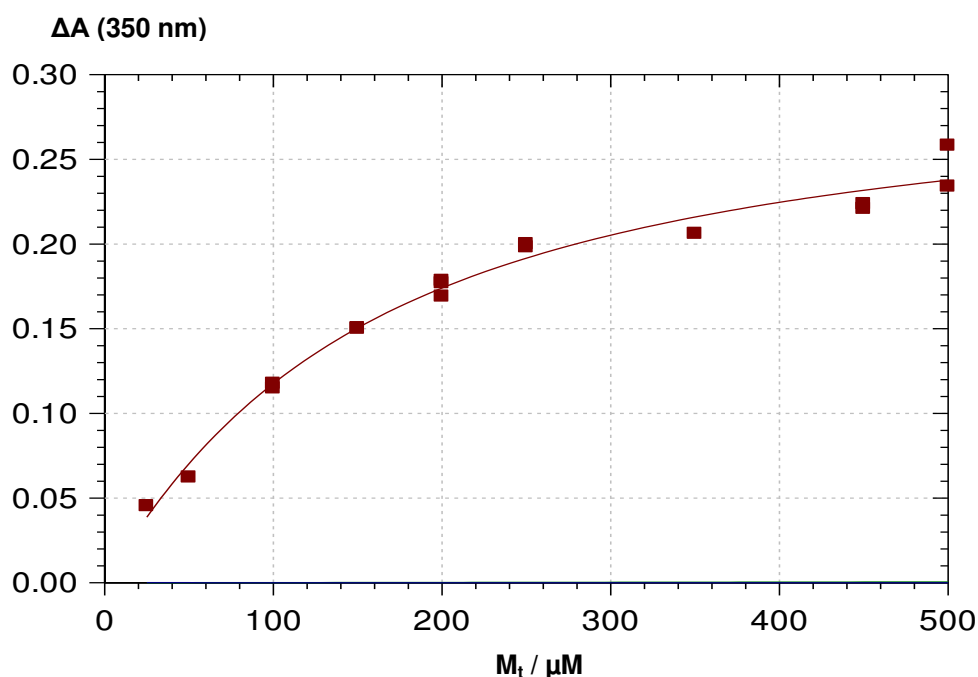


Figure III.26: Tracé des variations de $\Delta A(350 \text{ nm})$ en fonction de la concentration totale de métal. Concentration d'acide chlorogénique = $50 \mu\text{M}$, tampon acétate 0.1 M , pH 5, 25°C . La courbe en trait plein est le résultat de la procédure d'ajustement de courbe

$$k_{\text{obs}} \approx k_1 M_t + k_{-1}$$

Le tracé de la constante cinétique apparente de formation du complexe k_{obs} en fonction de M_t (**Fig. III.27**) donne: $k_1 = 372 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-1} = 0.08 \text{ s}^{-1}$, $r = 0.99$

Nous en déduisons: $K = k_1 / k_{-1} \approx 4650 \text{ M}^{-1}$

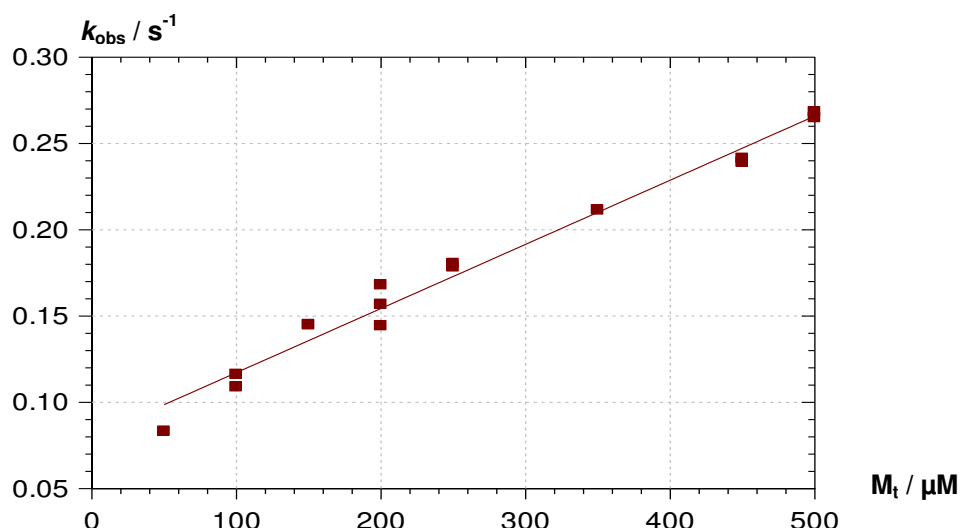


Figure III.27: Tracé de la constante cinétique apparente de formation du complexe k_{obs} en fonction de M_t

L'analyse cinétique quantitative confirme donc que la formation du complexe Al^{3+} - acide chlorogénique est plus rapide que celle du complexe Al^{3+} - rutine, mais que le complexe avec acide chlorogénique est moins stable en raison d'une dissociation également plus rapide.

L'effet bathochrome engendré par la complexation acide chlorogénique - Al^{III} et la stœchiométrie observée concordent avec des études par RMN qui ont permis de conclure que le noyau catéchol de l'acide chlorogénique est le site de liaison de Al^{3+} [43-45]. Même en milieu acide, Al^{3+} est capable de déprotoner le noyau catéchol lors du processus de chélation [46].

Dans des travaux antérieurs [47-49], les propriétés complexantes de l'aluminium étaient utilisées comme test colorimétrique pour identifier les flavonoïdes. Pour autant, la méthode est peu sélective et les acides hydroxycinnamiques sont également capables de réagir à ce test.

III.2.7.2. Complexation Acide chlorogénique- Fe^{+3}

En présence d'ions Fe^{III} , le spectre de l'acide chlorogénique est modifié avec déplacement bathochrome de la bande de faible énergie dans le domaine 280-370 nm (**Fig. III.28**). Cet effet indique que l'acide chlorogénique forme un complexe avec les ions ferriques.

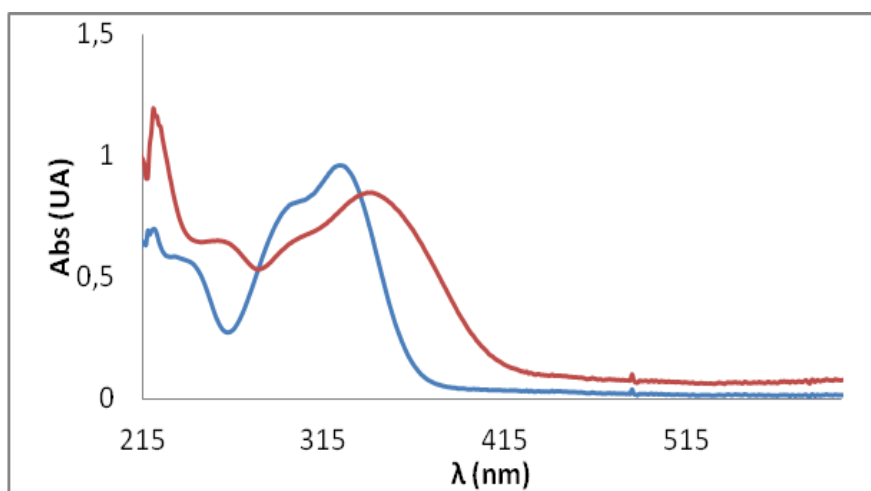


Figure III.28: Complexation de l'acide chlorogénique (50 μM) par 1 équiv. de Fe^{III} dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C). — Acide chlorogénique, — Acide chlorogénique - Fe^{3+}

Le tracé de l'absorbance finale à 360 nm en fonction de la concentration métallique suggère la formation quasi-irréversible d'un complexe de stœchiométrie 1:1 (**Fig. III.29**). En effet, l'absorbance est constante au-delà d'un rapport molaire métal-phénol de 1.

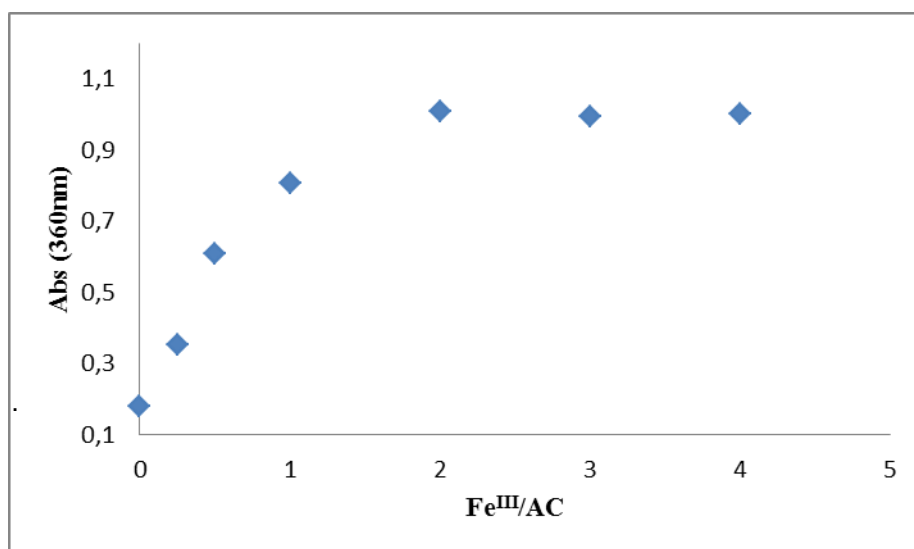


Figure III.29: Complexation de l'acide chlorogénique par Fe^{III} dans le tampon acétate (0.1 M, pH 5, 25°C). Concentration d'acide chlorogénique = 50 μM .

La complexation de Fe^{III} par l'acide chlorogénique est suivie par spectroscopie UV-visible au maximum d'absorption du complexe (360 nm) en mode cinétique (**Fig. III.30**).

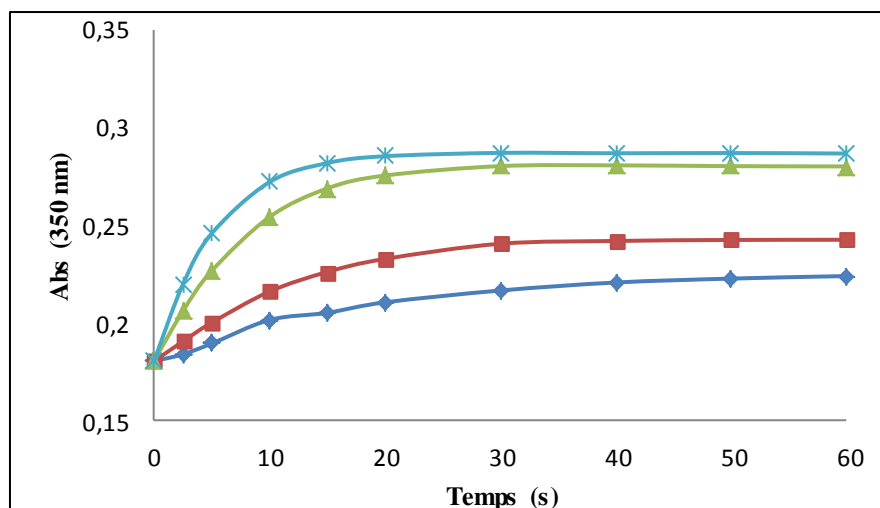


Figure III.30: Suivi cinétique de la complexation acide chlorogénique-Fe^{III} (tampon acétate 0.1 M, pH 5, 25°C). ◆ Fe^{III} / AC = 0.25, ■ Fe^{III} / AC = 0.5, ▲ Fe^{III} / AC = 1, ✱ Fe^{III} / AC = 2. Concentration d'acide chlorogénique = 50 μM.

A partir d'un équivalent d'ion métallique (**Fig. III.30**), un palier est rapidement atteint (au bout de 10 à 20 secondes). Une analyse cinétique à 400 nm, longueur d'onde d'absorption sélective du complexe, et à 325 nm, longueur d'onde d'absorption maximale du phénol libre, confirme la complexation rapide (**Fig. III.31**).

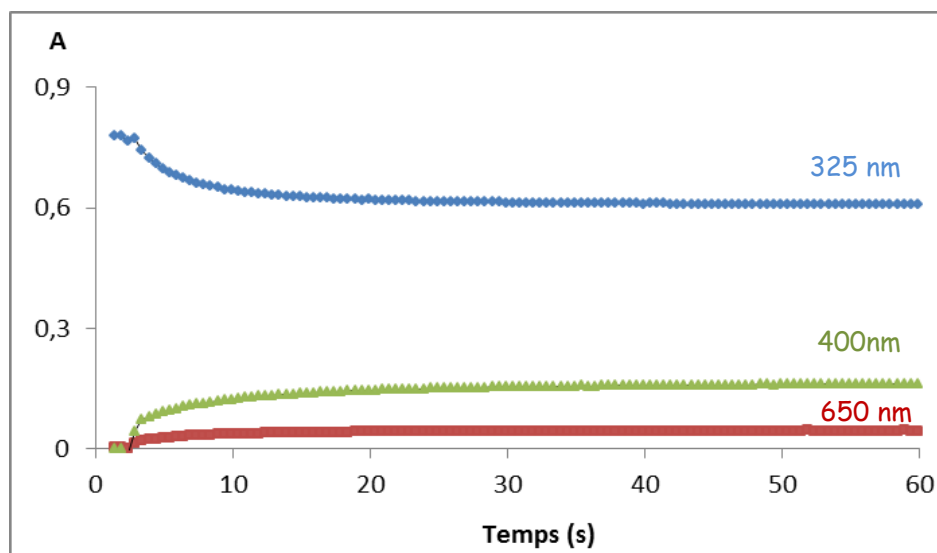


Figure III.31: Suivi cinétique de la complexation de l'acide chlorogénique (50 μM) par 1 équiv. de Fe³⁺ dans le tampon acétate (pH 5, 25°C).

L'analyse cinétique dans l'hypothèse de la formation irréversible d'un complexe 1:1 permet de déterminer les valeurs de la constante de vitesse k_1 de formation du complexe et de son coefficient d'absorption molaire (**Tab. XXXIV**).

Tableau XXXIV: Complexation de l'acide chlorogénique (50 μM) par Fe^{III} dans un tampon acétate à 25°C et pH 5. Suivi cinétique à 400 nm durant 1 min

$\text{Fe}^{\text{III}} / \text{AC}$ (équiv.)	k_1 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	R
0.5	3228 (± 61)	25463 (± 85)	0.994
1	12237(± 253)	17325 (± 27)	0.995
1.5	6160 (± 60)	17760 (± 20)	0.997
2	5631(± 56)	19972 (± 14)	0.998
2.5	3593 (± 40)	19668 (± 20)	0.998
4	3853 (± 75)	21742 (± 26)	0.995
5	3036 (± 21)	22835 (± 10)	0.999

Nous constatons que k_1 dépend de la concentration des ions du fer et décroît nettement en excès de Fe^{III} .

L'étude de la chélation de Fe^{III} par l'acide chlorogénique a mis en évidence un complexe de stoechiométrie 1:1 [4] avec liaison de Fe^{III} par le noyau catéchol [50].

a. Influence de l'acide chlorogénique sur l'état redox de Fe^{III}

Quel est l'impact de la complexation acide chlorogénique- Fe^{III} sur l'état redox du fer? Afin de répondre à cette question, nous avons quantifié les ions Fe^{2+} présents dans un mélange équimolaire de Fe^{III} et d'acide 5-O-caféoylquinique (Fig. III.32).

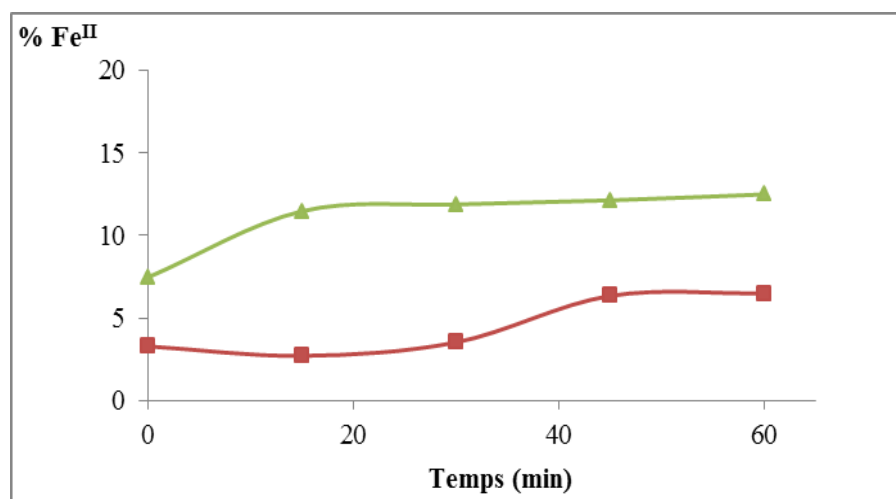


Figure III.32: Dosage de Fe^{2+} dans une solution de Fe^{3+} (100 μM) en absence ou en présence d'acide chlorogénique (1 équiv.), tampon acétate (pH 5, 25°C) ■ Fe^{III} , ▲ $\text{Fe}^{\text{III}} - \text{AC}$

La figure III.32 indique une réduction marginale des ions Fe^{3+} par l'acide chlorogénique, ce qui est en accord avec l'analyse LCUP-SM qui n'a pas permis de détecter des produits d'oxydation du phénol (Annexe 4).

- Acidification de la solution du complexe acide chlorogénique- Fe^{III}

La solution du complexe acide chlorogénique- Fe^{3+} (1 équiv.) dans le tampon acétate à pH 5 a été acidifiée par HCl concentré jusqu'à un pH final de 2 ou 0.6. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure qui suit :

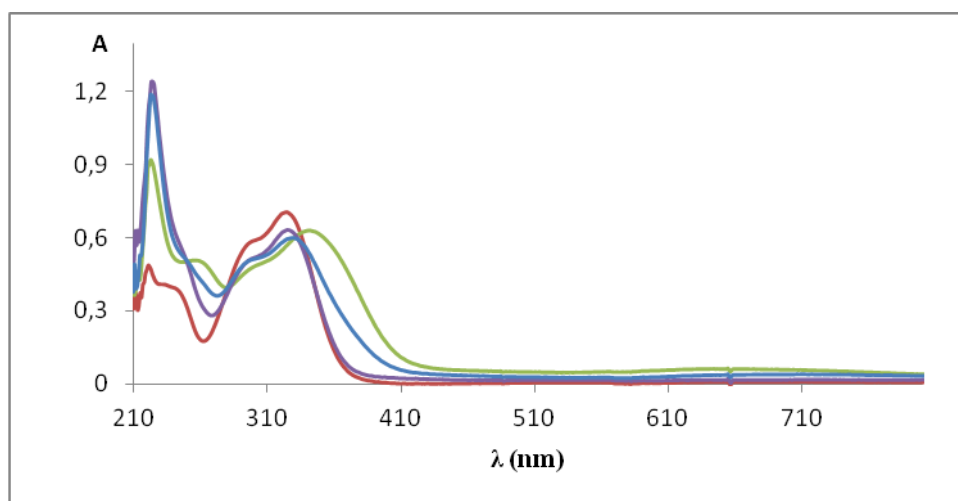


Figure III.33: Spectres UV-visible du mélange acide chlorogénique (AC, 50 μM) + 1 équiv. Fe^{3+}
 — AC (pH 5), — AC- Fe^{3+} (pH 5), — AC- Fe^{3+} (pH 2), — AC- Fe^{3+} (pH 0.6)

Ces spectres montrent une dissociation du complexe AC- Fe^{III} à un pH très acide (0.6) avec régénération de l'acide chlorogénique libre apparemment non oxydé.

b. Interaction de l'acide chlorogénique avec Fe^{III} en présence de la SAB

L'interaction de l'acide 5-caféoylquinique avec le fer ferrique en présence de la protéine SAB est suivie par spectroscopie UV-visible (**Fig. III.34**). En présence de SAB, la bande caractéristique de l'acide phénolique à 323 nm n'est pas déplacée après ajout de Fe^{III} , ce qui indique l'absence de complexation.

Rawel *et al.* & Prigent *et al.* [35, 51] ont estimé la constante de liaison de l'acide chlorogénique à la SAB à pH neutre : $K = 5 \text{ à } 16 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Cette complexation entraîne probablement un phénomène de «masquage» du noyau catéchol qui n'est plus accessible pour lier Fe^{III} .

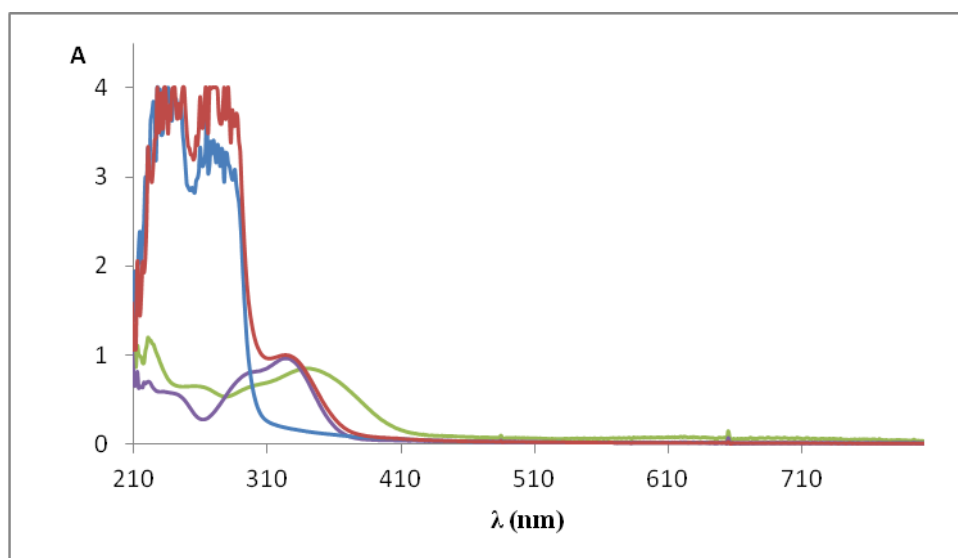


Figure III.34: Interaction de l'acide chlorogénique (AC) avec Fe^{3+} (1 équiv.) en présence et en absence de la protéine SAB (3 équiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C).

— AC (50 μM), — SAB (250 μM), — AC- Fe^{III} , — AC-SAB- Fe^{III}

III.2.7.3. Complexation Acide chlorogénique- Fe^{2+}

La complexation du fer (II) par l'acide chlorogénique à pH 5 provoque peu de changements du spectre UV-visible du phénol après une minute (**Fig. III.35**). En revanche, le spectre est fortement modifié (effet bathochrome avec déplacement du λ_{max} à 340 nm) après 3 heures. Cet effet a été suivi en mode cinétique à différentes longueurs d'onde (325, 400 et 650 nm) (**Fig. II.36**).

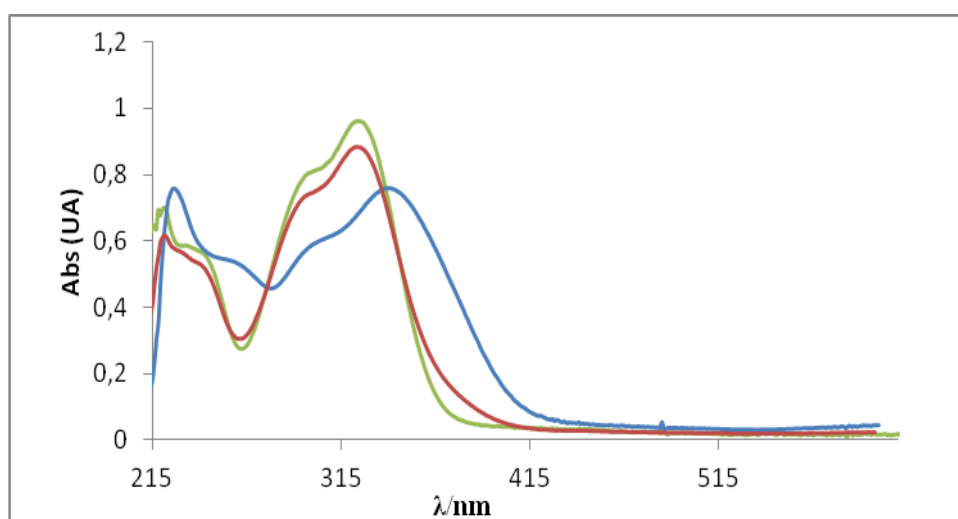


Figure III.35: Complexation de l'acide chlorogénique par 5 équiv. Fe^{II} dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C). Concentration d'acide chlorogénique (AC) = 50 μM . — AC, — AC- Fe^{II} (1 min), — AC- Fe^{II} (3h).

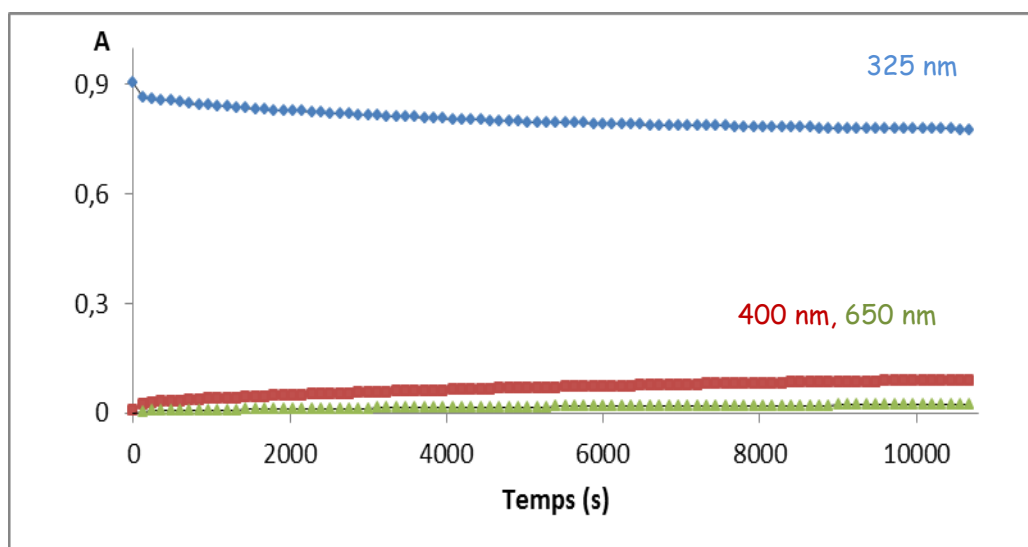


Figure III.36 : Suivi cinétique sur 3h de la complexation de l'acide chlorogénique (50 µM) par 1 équiv. de Fe²⁺ dans le tampon acétate (pH 5, 25°C).

Ces résultats montrent que la complexation de Fe^{II} par l'acide chlorogénique est très lente. Par ailleurs, le dosage à la ferrozine indique que la complexation déstabilise Fe^{II}. En effet, son autoxydation en Fe^{III} devient notable après 3h (≈ 20%) et après 24h (≈70%), alors qu'en l'absence d'AC, Fe^{II} reste stable sur 24h (**Fig. III.37**).

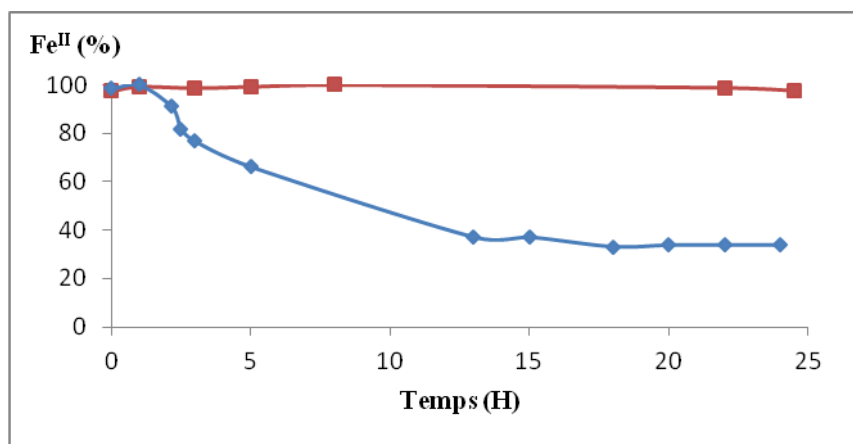


Figure III.37: Dosage Fe²⁺ (100µM) en absence ou en présence de l'acide chlorogénique (1eq), tampon acétate (pH=5 et T=25°C). ■ Fe^{II}, ◆ Fe^{II}-acide chlorogénique

Les données citées dans la bibliographie confirment les résultats obtenus: Chvatalova *et al.* rapportent que dans le tampon Hepes les acides phénoliques ayant un groupement catéchol ne forment pas de complexes avec le fer ferreux même à pH neutre [48]. Toutefois, l'étude de Karamac & Pegg suggère que la similitude des spectres UV-Vis des

acides phénoliques à noyau catéchol après ajout des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} est due à l'oxydation rapide de Fe^{2+} par O_2 [37].

III.2.8. Interaction de catéchine avec les ions métalliques

Les catéchines composent la majorité des flavonoïdes contenus dans le thé vert, le raisin, le vin rouge et le cacao [52, 53]. Diverses études biologiques et épidémiologiques ont montré des effets bénéfiques pour la santé [54-58]. Les effets antioxydants des catéchines incluent la neutralisation directe des ERO et la chélation des ions de métaux de transitions [54, 59]. En effet, il a été démontré que le groupement catéchol des catéchines est le site de complexation des ions métalliques (Fig. III.38) [59, 60]. Toutefois, cette interaction peut réduire la biodisponibilité des ions du fer. En effet, les composés phénoliques de l'alimentation tels que ceux du thé vert inhibent l'absorption du fer au travers de la paroi intestinale [61].

Vraisemblablement, les complexes fer-phénol formés dans le tractus digestif ne sont pas capables de franchir la barrière des cellules intestinales [62].

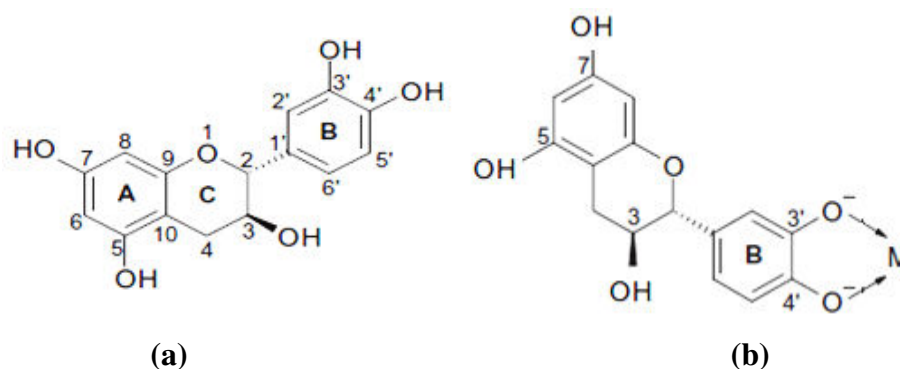


Figure III.38 : Structure chimique de la (+)-catéchine (a) et de son complexe métallique (b) [63]

Dans ce présent travail, nous avons testé la capacité de complexation, éventuelle, des ions d'aluminium, du fer (II, III) et du cuivre avec la catéchine, dans le tampon acétate à pH5.

L'interaction du groupement catéchol de la catéchine par les ions Al^{3+} et du fer dans le tampon acétate à pH 5 a été étudiée par spectroscopie UV-visible (Fig. III.39, 40, 41) :

- Les changements spectraux intervenant après addition d'une concentration croissante de Fe^{3+} à une solution de catéchine sont faibles. On constate un élargissement de la bande d'absorption à 280 nm et une augmentation faible de l'absorbance dans l'intervalle 330-360 nm, qui peut s'expliquer par la formation, probable, de produits d'oxydation.

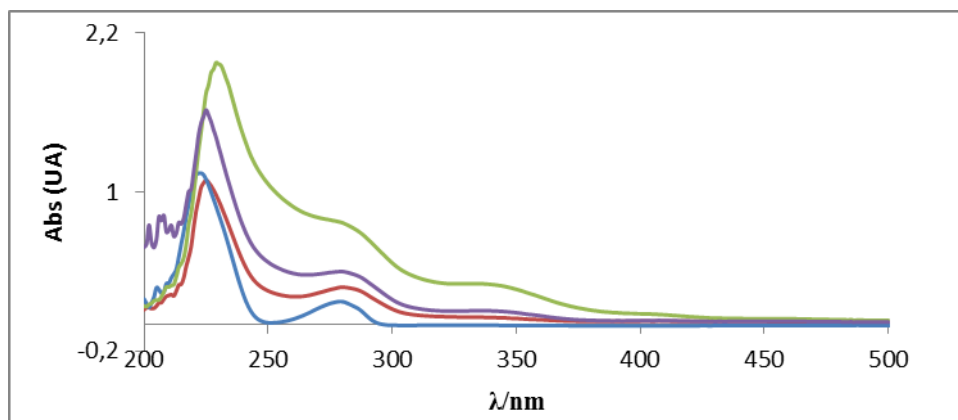


Figure III.39. Interaction de la catéchine avec 1, 3 et 5 équiv. de Fe^{III} dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C). Concentration de la catéchine (Cat) = 50 μM . Spectres enregistrés 3 min après mélange. — Cat, — Cat- Fe^{III} (1 équiv.), — Cat- Fe^{III} (3 équiv.), — Cat- Fe^{III} (5 équiv.)

En effet, Elhabiri *et al.* ont rapporté que l'interaction du fer (III) avec la catéchine, en milieu acide, est suivie par une réaction redox avec apparition du fer (II) et des produits d'oxydation de la catéchine [64]. La complexation de Fe^{III} par la catéchine n'a pas lieu en raison de la compétition défavorable avec les protons pour les sites oxygénés des ligands. Cependant, dans ces conditions, Fe^{III} est sous forme d'ion libre, ce qui maximise son pouvoir oxydant. Le flavanol est donc rapidement oxydé sans formation de complexes intermédiaires [65].

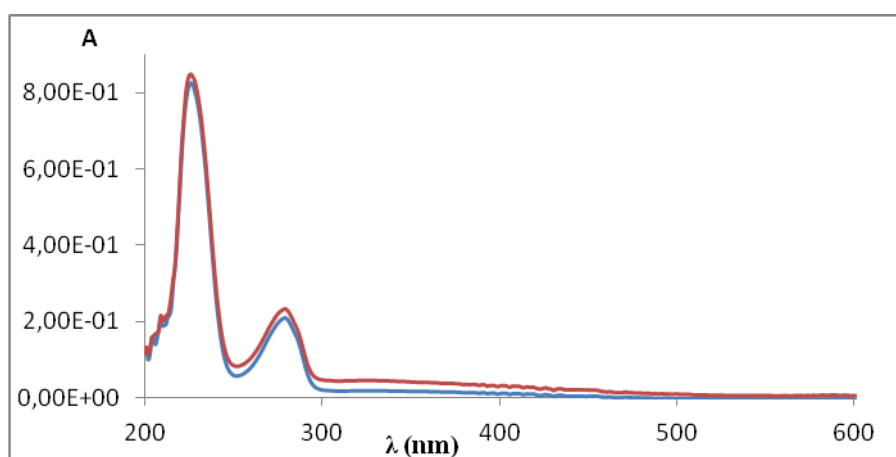


Figure III.40 : Interaction de la catéchine avec 3 équiv. Fe^{II} dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C). Concentration de la catéchine (Cat) = 50 μM . — Cat, — Cat- Fe^{II} (3 eq)

- Lors de l'ajout de fer (II) et de Al (III) à la solution de la catéchine à pH 5, aucune modification n'est observée sur le spectre UV-visible de la catéchine (**Fig. III.40**), ce qui probablement atteste la non complexation du flavanol avec ces ions dans ces conditions. Cette hypothèse a été vérifiée dans le cas de Al^{III} en utilisant le complexe rutine-Al^{III} comme indicateur (**Fig. III.41**).

Les spectres Cat et Cat-Fe^{II}, représentés dans la figure ci-dessus, coïncident parfaitement avec le résultat obtenu par Moridani *et al.* [33].

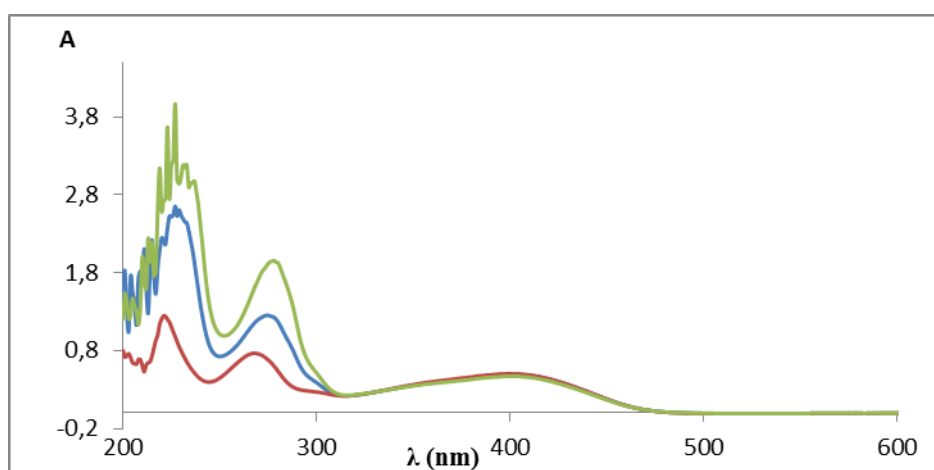


Figure III.41. Evolution du spectre UV-visible du complexe rutine-Al^{III} (5 équiv. Al^{III}) dans le tampon acétate (0.1M, pH 5, 25°C) en présence de la catéchine. — Rutine-Al^{III}, — Rutine-Al^{III} + Cat (3 équiv.), — Rutine-Al^{III} + Cat (5 équiv.)

Le spectre UV-visible du complexe préformé rutine-Al^{III} n'a pas été modifié par la présence de catéchine, ce qui confirme que la complexation catéchine-Al^{III} est négligeable dans ces conditions.

La complexation des ions du fer et du cuivre avec la catéchine a été mise en évidence par Mira *et al.* [32] dans le tampon acétate à pH 5.5, ce qui ne concorde pas avec nos résultats en milieu à peine plus acide. Ainsi, la complexation métallique des flavonoïdes est fortement dépendante du pH mais aussi de la nature et de la concentration du tampon.

III.2.9. Interaction des ions du cuivre et des polyphénols

L'interaction des polyphénols sélectionnés avec les ions du cuivre (Cu²⁺/Cu⁺), dans le tampon acétate à pH acide, a été examinée par spectroscopie UV-visible (**Fig. III.42**).

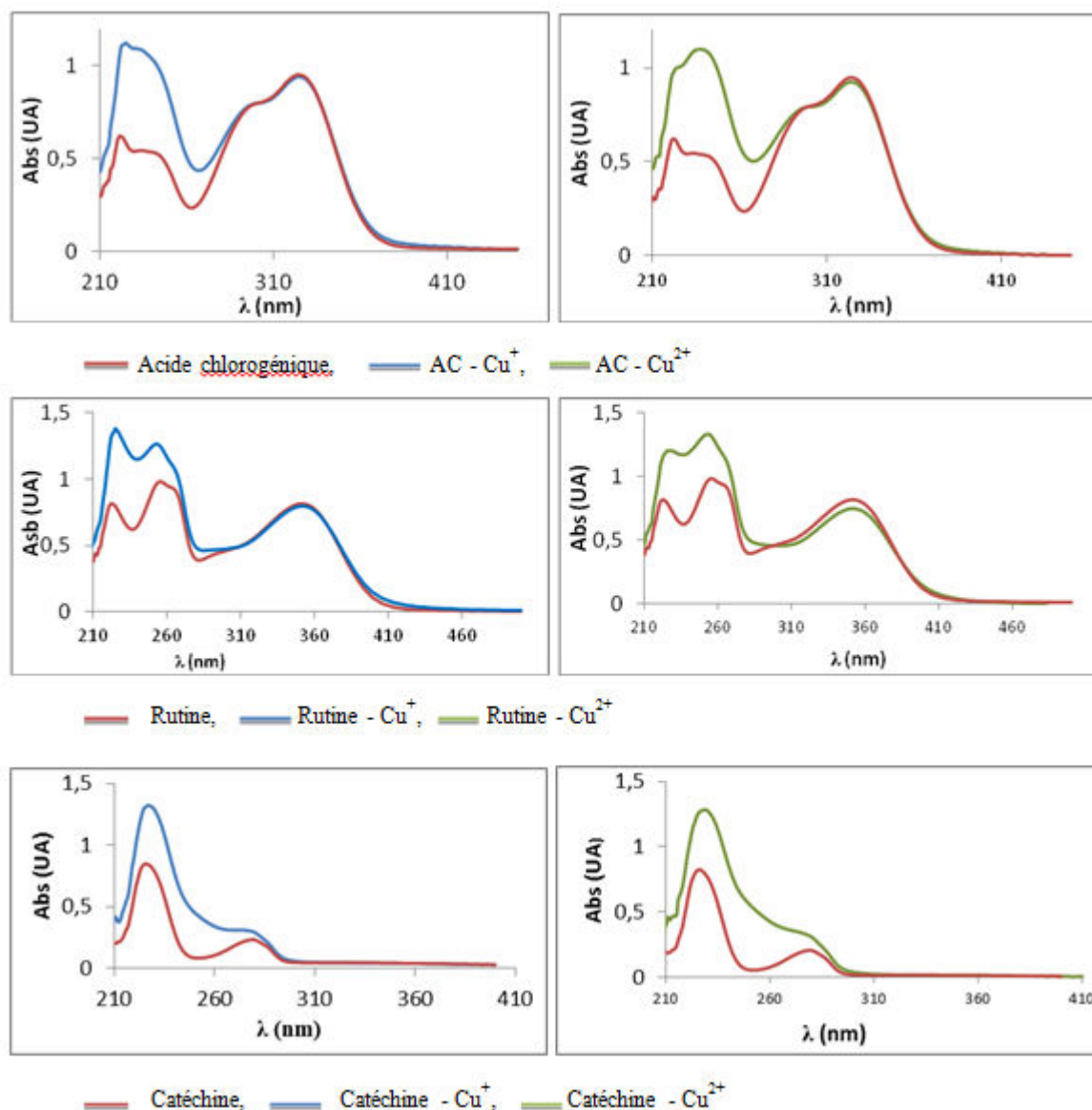


Figure III.42 : Interaction de différents polyphénols (50 μM) avec Cu^+ et Cu^{2+} (5 équiv.) dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). Spectres enregistrés 3 min après mélange

D'une manière générale, les modifications spectrales intervenant après addition des ions du cuivre aux solutions de polyphénols sont très faibles, ce qui indique l'absence de complexation. D'après Mira *et al.* [32] les complexes flavonoïde-cuivre sont effectivement très labiles en milieu acide.

Il a été récemment montré par résonance paramagnétique électronique qu'à pH acide les flavonoïdes et les acides phénoliques forment avec les ions de cuivre (II) des complexes polymériques insolubles. La formation de chélates solubles ne se manifeste qu'à pH neutre [66 - 68].

III.2.10. Polyphénols et autoxydation de Fe^{II}

Nous avons vu que, si Fe^{II} est stable dans le tampon acétate à pH 5, la présence de polyphénols ayant une plus forte affinité pour Fe^{III} que pour Fe^{II} est susceptible de favoriser son autoxydation en Fe^{III}. Or, ce phénomène est extrêmement dépendant du pH et du tampon. Une brève étude a donc été conduite sur l'effet du pH et des ions phosphate sur la réactivité du fer ferreux. Il est à noter que les ions phosphate ont une plus forte affinité pour les ions du fer que l'ion acétate et que ces ions sont susceptibles d'être présents dans l'aliment et les milieux biologiques sous formes libres ou combinées (protéines phosphorylées, phospholipides, acides nucléiques). Nous avons étudié la stabilité de Fe^{II} dans le tampon acétate (TA) de pH 5 à 6 et en présence de concentrations variables d'ions phosphate (P). Le dosage de Fe^{II} par la méthode à la ferrozine a donné les résultats présentés dans la figure ci-dessous :

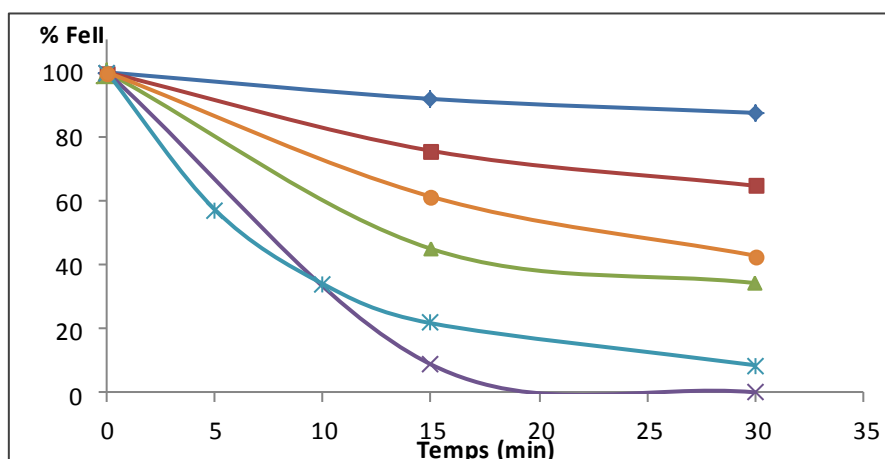


Figure III.43: Autoxydation du Fe²⁺ (concentration initiale = 100 μM), dans le tampon acétate de pH 5-6, en présence d'ions phosphates, 25°C. ✕ TA-TP (1/1) pH 5.56, ✕ TA-TP (1/1) pH 5.4, ▲ TA-TP (1/1) pH 5.2, ◆ TA + 5 mM phosphate, pH 6, ■ TA + 15 mM phosphate, pH 5.23, ◆ TA + 5 mM phosphate, pH 5.05

Ces données indiquent nettement que la présence des ions phosphate dans le TA engendre une forte déstabilisation de Fe^{II}, quand le pH et/ou la concentration de phosphate augmentent.

D'une part, l'état redox du fer est fortement dépendant du pH: dans les mélanges TA-TP (1/1) à pH 5.4 et 5.56, 91% à 99,8% de Fe²⁺ a été oxydé, respectivement après 30 min. Nos résultats sont en accord avec des études cinétiques qui proposent pour l'autoxydation de Fe^{II} une loi de vitesse du type $V = [Fe^{II}] [O_2] [OH^-]^2$ [8, 69, 70]. D'autre part, Fe³⁺ a une plus

forte affinité pour les ions phosphate que Fe^{2+} [70, 71]. Ainsi, les ions phosphate, de même que les polyphénols, accélèrent l'oxydation de Fe^{II} [8, 70, 72].

Il nous a semblé pertinent de réexaminer brièvement les interactions fer – polyphénol en présence des ions phosphate pour voir l'impact de ces derniers sur la complexation et la stabilité de Fe^{II} . Nous avons effectué plusieurs études spectroscopiques avec la rutine et l'acide chlorogénique, avec ou sans SAB, et pour différentes concentrations d'ions phosphate. De l'ensemble des résultats, qui ne sont pas présentés ici, nous avons retenu les données obtenues avec la rutine dans le tampon acétate 0.1 M à pH 6 et contenant 5 mM d'ions phosphate. Ce choix est basé sur la formation du complexe Fe^{II} -rutine dans ces conditions mais aussi sur l'observation que ce milieu est bien adapté (autoxydation de Fe^{II} ni trop lente, ni trop rapide) pour étudier l'influence des phénols sur l'état redox des ions du fer.

III.2.10.1. Complexation rutine - Fe^{2+} en présence d'ions phosphate

L'addition d'une quantité croissante de Fe^{2+} à la solution de rutine (tampon acétate 0.1 M + 5 mM phosphate, pH 6) induit une diminution de l'intensité de la bande à 350 nm relative au phénol libre et l'apparition d'une nouvelle bande vers 400 nm (Fig. III.44), caractéristique du complexe métallique.

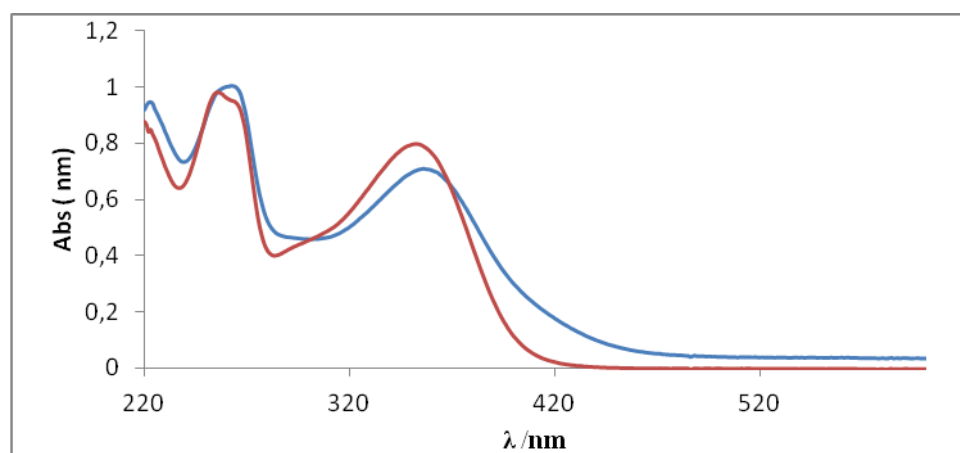


Figure III.44 : Complexation de la rutine (50 μM) par Fe^{II} (2.5 équiv.) dans le tampon acétate (0.1 M, pH6, 5 mM phosphate, 25°C). 3 min après mélange. — Rutine, — Rutine – Fe^{2+}

La complexation des polyphénols avec les ions métalliques dans le milieu gastrique est susceptible d'être modulée par leurs interactions avec les protéines. Nous avons testé l'influence de la protéine SAB (Fig. III.45).

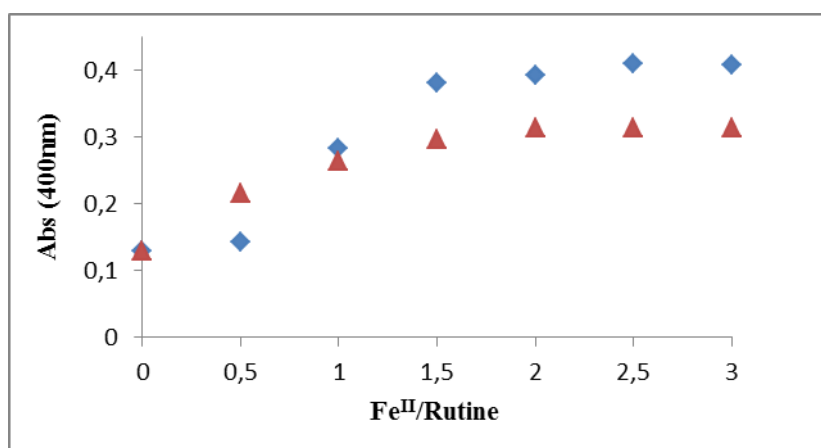


Figure III.45 : Complexation de la rutine (50 μM) par Fe^{II} dans le tampon acétate (0.1 M, pH 6, 5 mM phosphate, 25°C), en présence et en absence de SAB (3 équiv.), 3 min après mélange. ▲ Fe^{II} /Rutine, ◆ Fe^{II} /Rutine-BSA

L'examen des résultats montre que la SAB n'inhibe la complexation fer – rutine qu'à faible concentration de Fe^{II} , ce qui suggère la liaison d'un 1^{er} équiv. de Fe^{II} à la SAB. Cependant, en présence d'un excès de fer, l'association rutine – SAB n'inhibe pas la formation du complexe fer – rutine dans ces conditions. Le palier rapidement atteint au-delà de 1 équiv. de Fe^{II} suggère une stœchiométrie de type 1:1.

Les variations de $A(400 \text{ nm})$ en fonction du temps et pour différentes concentrations de Fe^{II} sont analysées selon un modèle simple de liaison irréversible, qui permet l'estimation de la constante de vitesse apparente de complexation k_1 et du coefficient d'absorption molaire du complexe (Tab. XXXV, Fig. III.46).

Tableau XXXV: Complexation de la rutine (50 μM) par Fe^{II} dans un tampon acétate contenant 5 mM de phosphate, 25°C, pH 6. Suivi cinétique à 400 nm durant 3 min.

Fe^{II} /Rutine (équiv.)	k_1 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	r
1	109 ± 3	8373 ± 112	0.999
1 + SAB	189 ± 12	6643 ± 124	0.997
2.5	178 ± 2	6767 ± 17	0.999
2.5 + SAB	127 ± 1	8880 ± 18	0.999

La SAB n'influence que faiblement la cinétique de complexation fer - rutine.

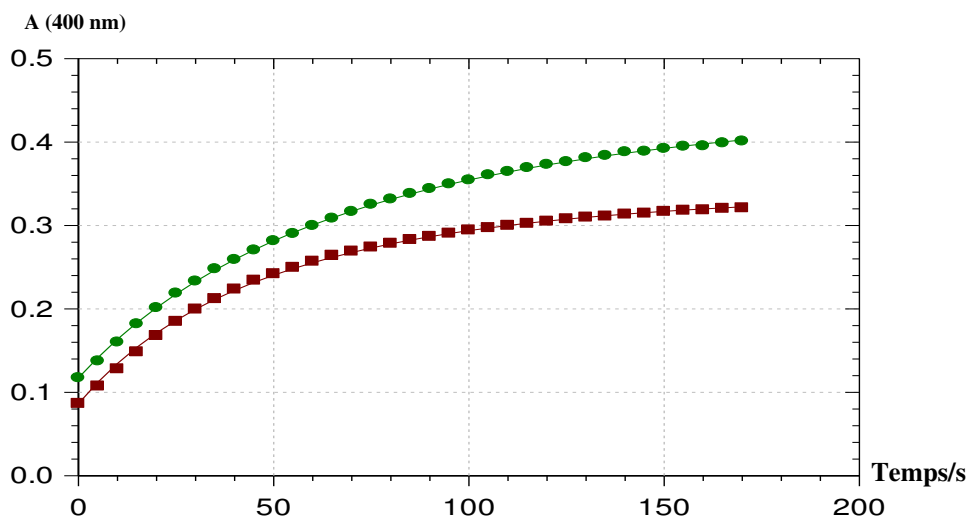


Figure III.46 : Liaison de Fe^{II}-rutine (tampon acétate + 5 mM phosphate, pH 6, 25°C). Rutine (50 μM), 3 équiv. SAB et 2.5 équiv. Fe^{II}. ●— Fe^{II}-rutine-SAB, ■— Fe^{II}-rutine.

L'albumine a une capacité de liaison d'une grande variété de ligands différents, notamment les ions métalliques (fer et cuivre) qui est liée à son activité antioxydante [73, 74]. La séquence des quatre premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la HSA (Asp-Ala-His-Lys) est impliquée dans la liaison d'ions métalliques divalents (**Fig. III.47**) [74]. Cette caractéristique peut expliquer la fixation du fer (II) en faible concentration à la SAB.

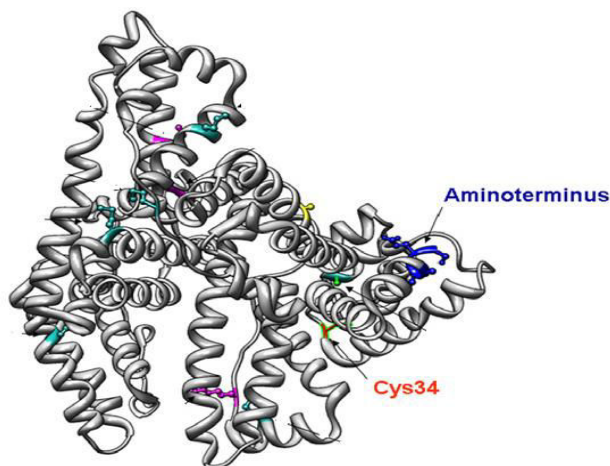


Figure III.47: Les principaux sites de l'albumine impliqués dans son activité antioxydante : la séquence de quatre acides aminés Asp-Ala-His-Lys de l'extrémité N-terminale et le résidu cystéine libre (Cys 34) [74, 75].

Fukuzawa *et al.* ont démontré l'effet inhibiteur de la SAB sur la peroxydation des lipides membranaires induite par les chélates de fer et le superoxyde: la SAB, en interaction avec le chélate de fer et/ou la membrane empêche l'interaction du métal avec la surface membranaire [37].

L'influence de la rutine et de la protéine SAB sur la stabilité du fer (II) est mise en évidence dans la figure ci-dessous:

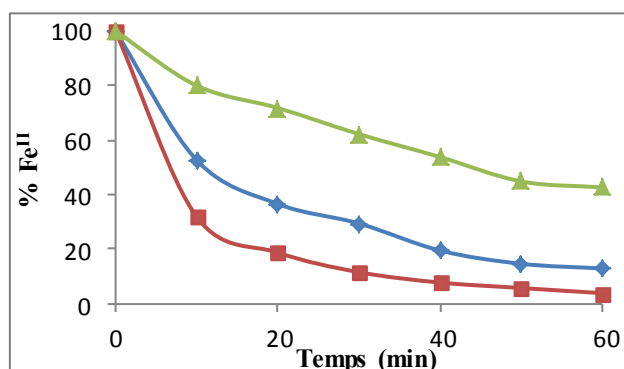


Figure III.48 : Autoxydation de Fe^{2+} (concentration initiale = $100 \mu\text{M}$) en absence ou en présence de rutine (1 équiv.) et de SAB (1 équiv.) dans le tampon acétate (pH 6, 5 mM phosphate, 25°C). ■ Fe^{II} - SAB, ◆ Fe^{II} - rutine, ▲ Fe^{II}

Ainsi, la complexation de Fe^{II} par la rutine ou la SAB tend à déstabiliser ce métal de transition. La diminution du taux de Fe^{2+} après 1h est de l'ordre de 96 % et 70 % pour la protéine SAB et la rutine, respectivement. Malgré ses ligands azotés (térapeptide N-terminal) susceptibles de stabiliser Fe^{2+} et ainsi le protéger de l'autoxydation, la SAB s'est révélée au moins aussi efficace que la rutine à accélérer l'autoxydation de Fe^{2+} dans ce milieu.

- L'acidification du mélange équimolaire rutine- Fe^{II} a entraîné une dissociation du complexe et la régénération du spectre de la rutine libre (**Fig. III.49**). Au cours de l'autoxydation de Fe^{II} , la rutine n'est donc pas oxydée.

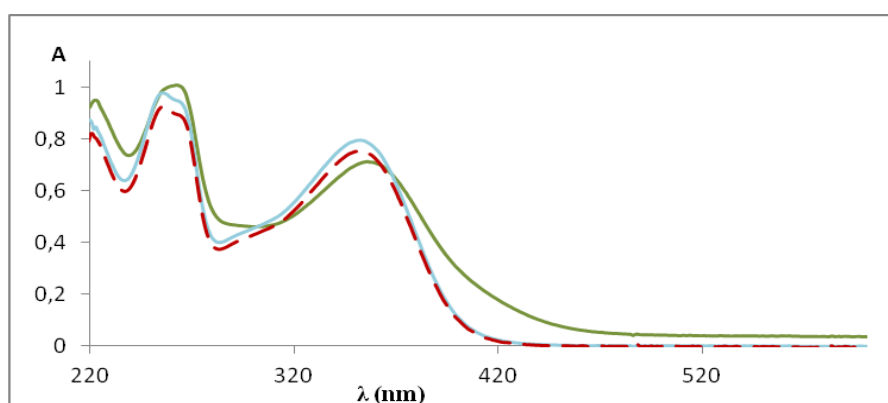


Figure III.49 : Rutine ($50 \mu\text{M}$) + 2.5 équiv. Fe^{2+} dans le tampon acétate (pH 6, 5 mM phosphate, 25°C) — Rutine, - - Rutine/ Fe^{2+} (pH 2), — Rutine/ Fe^{2+} (pH 0.6)

Discussion et conclusion

Différents composés polyphénoliques abondants dans l'alimentation et représentatifs des différentes classes de polyphénols ont été sélectionnés pour ce travail: le flavonol, le plus commun, la rutine, l'acide chlorogénique (acide hydroxycinnamique) et le flavanol catéchine. Tous ces polyphénols présentent un noyau catéchol (1,2-dihydroxybenzène), principal déterminant structural de l'activité antioxydante et complexante d'ions métalliques. Cependant, ces interactions et les processus rédox qui peuvent en découler dépendent fortement de la nature de l'ion métallique et du polyphénol, de la température et du pH ainsi que de la nature du tampon utilisé.

Dans cette présente étude, nous avons analysé la complexation des polyphénols sélectionnés en absence et en présence des ions de métaux de transition, fer et cuivre, mais aussi de l'aluminium comme métal inerte de référence. Ces différentes expériences ont été conduites dans un tampon acétate à pH 5 à 25°C. La complexation des polyphénols avec les ions métalliques dans le milieu gastrique, est susceptible d'être modulé par leurs interactions avec les protéines. En conséquence, l'influence de la protéine SAB sur la complexation métallique des polyphénols a été aussi testée.

L'autoxydation de Fe^{II} en Fe^{III} est susceptible de produire des espèces réactives de l'oxygène ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet}) et d'entraîner l'oxydation du phénol lui-même. Or, ce phénomène est particulièrement sensible au pH et à la présence d'agents complexants. Nous avons brièvement étudié l'effet du pH et des ions phosphate sur l'autoxydation de Fe^{II} . Ainsi, l'influence de la rutine et de la protéine SAB sur la stabilité du fer (II) a été mise en évidence à pH 6 dans un tampon acétate contenant une concentration 5 mM d'ions phosphate.

- Un récapitulatif des informations déduites des études spectroscopiques et des analyses cinétiques dans le tampon acétate à pH 5 est représenté dans le tableau XXXVI.
- Pour tous les ions métalliques étudiés, la complexation des polyphénols se traduit par des déplacements bathochromes de 30 à 40 nm de la bande d'absorption principale.

Tableau XXXVI: Récapitulatif des résultats sur la complexation métallique des polyphénols sélectionnés (tampon acétate, pH 5, 25°C).

Métal-phénol	N	$\Delta\lambda$ (nm)	k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	k_2 (s^{-1}) $\times 10^{-3}$	Site de liaison	Fe ^{II} (%)	Phéno ls	+ Protéine SAB
Fe ³⁺ -R	1:1	40 (60 s)	4-9 $\times 10^3$	40-200	5-OH- 4- oxo	7 ^(a)	Non oxydé	Absence de complexation
Fe ²⁺ -R	1:1	38 (3h)	1-2	—	—	100 ^(b)	Non oxydé	—
Fe ³⁺ -AC	1:1	37 (60 s)	3-12 $\times 10^3$	—	catéchol	6 ^(a)	Non oxydé	Absence de complexation
Fe ²⁺ -AC	—	35 (3h)	—	—	—	77 ^(b)	Non oxydé	—
Fe ³⁺ -Cat	Absence de complexation, oxydation probable du flavanol							
Fe ³⁺ -Cat Cu ²⁺ , Cu ⁺ + R, AC, Cat	Absence de complexation et d'oxydation des phénols							

R: rutine, AC: acide chlorogénique, Cat: catéchine ; n: stœchiométrie ;

^(a), ^(b): Concentration de Fe^{II} déterminée après 1 h et 3 h respectivement ;

Concentration de la protéine SAB est de 250 μ M.

Dans la série étudiée, la cinétique de complexation pour la rutine et l'acide 5-O caféoylquinique suit l'ordre suivant: Fe^{III} > Al^{III} > Fe^{II}. Pour un ion donné, les constantes de vitesse de complexation de l'acide chlorogénique et de la rutine sont du même ordre de grandeur.

Les constantes d'acidité de la rutine et de l'acide chlorogénique (**Tab. XXXVII**) montrent qu'à pH 5, les noyaux phénoliques sont tous protonés. La formation de complexes stables implique donc le remplacement d'un ou deux protons par l'ion métallique. Ainsi, à pH fortement acide (< 2-3), la protonation des polyphénols est dominante et la complexation devient négligeable.

Tableau XXXVII: Valeurs de pK_a de l'acide chlorogénique [76, 77], de la rutine [29, 30] et de la catéchine [78].

	Acide chlorogénique	Rutine	Catéchine
pK _a	3.35 (CO ₂ H)	6.95	8.64
	8.25	8.30	9.41
	12.30	10.04	11.26

La complexation du flavonol et de l'acide hydroxycinamique est beaucoup plus rapide en présence d'ions ferriques qu'en présence d'ions ferreux en raison d'interactions électrostatiques plus fortes avec Fe^{III} . La complexation par Fe^{III} est complète en quelques secondes qui suivent l'addition des ions Fe^{3+} à la solution de polyphénol. Au-delà d'un équivalent d'ion métallique, la formation du complexe semble totale, en accord avec une stœchiométrie 1:1 et une réaction quasi-irréversible. L'analyse cinétique de la complexation de Fe^{III} par la rutine a mis en évidence un réarrangement probable d'un 1^{er} complexe en un deuxième complexe plus stable (produit thermodynamique). Par ailleurs, la formation du complexe polyphénol- Fe^{II} est très lente et n'est complète qu'après 3h.

Quel que soit le polyphénol considéré, le dosage de Fe^{II} confirme que cet ion est stable sur 24h dans le tampon acétate à pH 5. En revanche, au bout de quelques heures, les complexes polyphénol- Fe^{II} subissent une lente autoxydation. Au sein des complexes polyphénol- Fe^{III} , la réduction de Fe^{III} en Fe^{II} est marginale et une faible quantité de Fe^{2+} (6-7%) est accumulée durant une heure dans les mélanges polyphénols + Fe^{III} (1 équiv.). L'oxydation de la rutine et de l'acide chlorogénique en présence des ions $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ n'est pas détectée.

La catéchine n'interagit pas avec les ions Al^{3+} , Fe^{3+} et Fe^{2+} dans le tampon acétate à pH 5, ce qui est sans doute dû à la plus faible acidité des OH phénoliques du catéchol (**Tab. XXXVII**) qui rend la compétition entre protonation et complexation moins favorable à la complexation.

Les 3 phénols étudiés, rutine, acide chlorogénique et catéchine, ne réagissent pas avec les ions du cuivre ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$) dans le tampon acétate à pH 5. Ni complexation, ni oxydation n'a été observée.

L'interaction de la rutine et de l'acide chlorogénique avec les ions Fe^{3+} en présence de la protéine SAB a révélé un phénomène de «masquage» des sites de la complexation métallique, ce qui en accord avec l'affinité de liaison de la SAB avec ces deux polyphénols.

L'étude de l'effet du pH et des ions phosphate sur la stabilité du fer ferreux a montré la grande sensibilité de Fe^{2+} aux conditions du milieu. Dans le domaine de pH 5-6, la présence de ligands oxygénés présentant une affinité plus forte pour Fe^{3+} que pour Fe^{2+} est susceptible d'accélérer l'autoxydation selon la réaction: $4\text{Fe}^{\text{II}} + \text{O}_2 + 4\text{H}^{+} \rightarrow 4\text{Fe}^{\text{III}} + 2\text{H}_2\text{O}$.

De manière plus inattendue, la SAB, malgré son affinité a priori plus forte pour Fe^{2+} que pour Fe^{3+} , ne permet pas d'inverser la tendance.

Globalement, nos résultats suggèrent que les flavonols et acides hydroxycinnamiques présentant un noyau catéchol sont susceptibles de complexer Fe^{III} dès le compartiment gastrique quand le pH est faiblement acide (1-2 h après le repas). Par contre, l'interaction avec Fe^{II} et les ions du cuivre est probablement négligeable. L'interaction Fe^{III} – polyphénol conduit à des complexes stables (sans oxydation notable du polyphénol) mais peut être inhibée par les interactions polyphénol - protéine.

On peut supposer que les flavanols et tannins condensés n'interagissent avec Fe^{III} qu'après neutralisation du milieu à l'entrée du petit intestin.

Références bibliographiques

- [1] Torreggiani A., Tamba M., Trincherò A., Bonora S. (2005). Copper(II)–Quercetin complexes in aqueous solutions : spectroscopic and kinetic properties. *Journal of Molecular Structure*. 744–747.(SPEC. ISS.) 759-766.
- [2] Esparza I., Salinas I., Santamaría C., García-Mina J.M., Fernández J.M. (2005). Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenol. *Analytica Chimica Acta*. **543**: 267–274.
- [3] Hynes M.J., O’Coinceanainn M. (2001). The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **85**: 131–142.
- [4] Hynes M.J., O’Coinceanainn M. (2004). The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **98**: 1457–1464.
- [5] Hynes M.J., O’Coinceanainn M. (2001). The kinetics and mechanisms of the reactions of aluminium(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and adrenaline. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **84**:1-12.
- [6] Mochizuki M., Yamazaki S.I., Kano K., Ikeda T. (2001). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim.Biophys. Acta -General Subjects*. **1569**: 35-44.
- [7] Kakhlon O., Cabantchik Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes I. *Free Radical Biology & Medicine*. **33**(8): 1037–1046.
- [8] Welch K.D., Davis T. Z., Aust S.D. (2002). Iron Autoxidation and Free Radical Generation: Effects of Buffers, Ligands, and Chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **397**(02): 360–369.
- [9] Stookey L. L. (1970). Ferrozine- A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*. **42**(7): 779-781.
- [10] Viollier E., Inglett P.W., Hunter K., Roychoudhury A.N., Van Cappellen P. (2000). The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry*. **15**: 785±790.
- [11] Thompsen J. C., et Mottola H. A. (1984). Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. *Analytical Chemistry* . **56**(4): 755-757.

- [12] Gibbs C.R. (1976). Characterization and application of ferrozine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Analytical Chemistry*. **48**(8): 1197-1201.
- [13] Pascual-Reguera M.I., Ortega-Carmona I., Molina-Díaz A. (1997). Spectrophotometric determination of iron with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta*. **44**(10): 1793-1801
- [14] Afanas'ev I.B., Dcrozshko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*. **38**(11):1763-1769.
- [15] Murota K., Mitsukuni Y., Ichikawa M., Tsushida T., Miyamoto S., et Terao J. (2004). Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**(7): 1907-1912.
- [16] Chung, J. H., Lee, C. S., Shin, Y. K., Lee, K. S. (1991). Inhibitory actions of quercetin and rutin on Fe 2+-induced lipid peroxidation. *Korean J. Pharmacol*. **27**: 69-80.
- [17] Afanas'eva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A., Korkina, L.G. (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*. **61**(6): 677-684.
- [18] Negre-Salvayre A., Affany A., Hariton C., Salvayre R. (1991). Additional antilipoperoxidant activities of alpha-tocopherol and ascorbic acid on membrane-like systems are potentiated by rutin. *Pharmacology*. **42**(5): 262-272.
- [19] De Souza R.f., W.F., De Giovani. (2004). Antioxidant Properties of Complexes of Flavonoids with metal ions. *Redox Report*. **9**(2): 97-104.
- [20] Korkina L.G., Afanas'ev I.B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol*. **38**: 151-163.
- [21] Simić A., Manojlović D., Šegan D., et Todorović M. (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*. **12**(10): 2327-2340.
- [22] Malešev D., Kuntić V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*. **72**(10): 921-939.
- [23] Kostyuk, V.A., Potapovich A.I., Kostyuk T.V., Cherian M.G. (2007). Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress *in vivo*. *Cell. Mol. Biol*. **53**: 62-69.

- [24] Kang, J., Su, B., Lu, X. (2005). Synthesis and characterization of coordination compounds of Cd (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) with rutin. *Indian journal of chemistry. Sect. A: Inorganic, physical, theoretical & analytical.* **44**(10), 2010-2014.
- [25] Guo M., Perez C., Wei Y., Rapoza E., Su G., Bou-Abdallah F., et Chasteen ND. (2007). Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions.* **43**: 4951–4961.
- [26] De Souza, R.F., Sussuchi E.M., et al. (2003). Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry.* **33**(7): 1125-1144.
- [27] Bai Y., Song F., Chen M., Xing J., Liu Z., Liu S. (2004). Characterization of the rutin-metal complex by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences.* **20**: 1147–1151.
- [28] Makris D.P., Rossiter J.T. (2000). Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **48**(9), 3830-3838.
- [29] Escandar GM., Sala L.F. (1991). Complexing behavior of rutin and quercetin. *Can. J. Chem.* **69**: 1994-2001.
- [30] Jovanovic S.V., Steenken S., Hara Y., Simic M.G. (1996). Reduction potentials of flavonoids and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for anti-oxidant activity? *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions,* **2**: 2497-2504.
- [31] Miller D.M., Buettner G.R., et Aust S.D. (1990). Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med.* **8**: 95-108.
- [32] Mira L., Tereza Fernandez M., Santos M., Rocha R., Florencio H.M., et Jennings K.R. (2002). Interaction of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Res.* **36**: 1199-1208.
- [33] Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J. (2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine.* **34**(2): 243-253.
- [34] Dufour C., Dangles O. (2005). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects.* **1721**:164-173.

- [35] Rawel H.M., Frey S.K., Meidtnr K., Kroll J., Schweigert FJ. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular Nutrition & Food Research*. **50**: 705-713.
- [36] Lu Q.h., Ba C.d., Chen D.Y. (2008). Investigating noncovalent interactions of rutin - serum albumin by capillary electrophoresis - frontal analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **47**: 888-891
- [37] Fukuzawa K., Saitoh Y., Akai K., Kogure K., Ueno S., Tokumura A., Otagiri M., Shibata A. (2005). Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. **1668**(1): 145-155.
- [38] Jungbluth G., Rühling I. et al. (2000). Oxidation of flavonols with Cu (II), Fe (II) and Fe (III) in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. **2**(9): 1946-1952.
- [39] Karamać M., Pegg R.B. (2009). Limitations of the tetramethylmurexide assay for investigating the Fe (II) chelation activity of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**(14): 6425-6431.
- [40] Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. **79**: 727-747.
- [41] Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. (2007). Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *Journal of Nutrition*. **137**: 2196-2201
- [42] Cheng J-C., Bo Zhou F-D., Yang L., Liu Z.L. (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*. **104**: 132-139
- [43] Monties B., Marine-Font A., Douillard, R. (1969). Propriétés spectroscopiques des polyphénols. *Ann Physiol Vég.* **11**(4): 313-339.
- [44] Nagata T., Hayatsu M., Kosuge N. (1992). Identification of aluminium forms in tea leaves by Al NMR. *Phytochemistry*. **31**(4), 1215-1218.
- [45] Danglettere L. (2007). Apport des spectroscopies moléculaires à l'étude des mécanismes de fixation des ions métalliques polluants par les substances humiques. Complexation de Al(III), Pb(II) et Zn(II) par des systèmes modèles. *Thèse de Doctorat*. Lille. p. 316

- [46] Sikora F.J., McBride M.B. (1990). Aluminium complexation by protocatechuic and caffeic acids as determined by UV spectrophotometry. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**: 78-86.
- [47] Ribéreau-gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Edition : Dunod.* Paris. P. 225.
- [48] Linard A., QUEMIN J., PARIS R. (1976). Plantes Malgaches No XXI sur les flavonoïdes du *Xyris Semfuscata* (xyridacées). *Plantes Rtiédicinales et Phytothérapie Torne X.* **11**(4) : 267-275.
- [49] Bahrurun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin A M., Cazin J.C., Pinkas M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phénolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch Drug Research.* **46**: 1086-1108.
- [50] Chvátalová, K., Slaninova, I., Březinová, L., & Slanina, J. (2008). Influence of dietary phenolic acids on redox status of iron: Ferrous iron autoxidation and ferric iron reduction. *Food Chemistry*, **106**(2), 650-660.
- [51] Prigent SVE, Gruppen H, Visser A, van Koningsveld GA, de Jong GAH, Voragen AGJ. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **51**: 5088-5095.
- [52] Ross J.A., Kasum C.M. (2002). Dietary flavonoids : Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu. Rev. Nutr.* **22**: 19–34.
- [53] Mandel S., M.B. Youdim. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine.* **37**(3): 304-317.
- [54] Zuo Y., Chen H., Deng Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta.* **57**(2): 307-316.
- [55] XQ Xu H. Huang. (2004). The latest development on EGCG anticancer mechanism. *Journal of Tea.* **30**: 141–142.
- [56] Fujiki H. (2005). Green tea: Health benefits as cancer preventive for humans. *The Chemical Record.* **5**(3): 119-132.
- [57] Yilmaz Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology.* **17**(2): 64-71.

- [58] Ghosh D., Scheepens A. (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*. **53**(3): 322-331.
- [59] Khokhar S., Apenten R. K. O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. *Food Chemistry*. **81**:133–140.
- [60] Moran J.F., Klucas R.V., Grayer R.J., Abian J., Becana M. (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*. **22**: 861–870.
- [61] Argyri K., Proestos, C., Komaitis, M., Kapsokefalou, M. (2005). Phenolic compounds in red wine digested in vitro in the presence of iron and other dietary factors. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **56**(3): 213-222.
- [62] Kapsokefalou M., Zhu L., Miller D.D. (2006). Adding iron to green tea may decrease its antioxidant capacity in rats after an oral dose of the mixture. *Nutrition Research*. **26**(9): 480-485.
- [63] Yasarawan N., Thipyapong K. et al. (2013). Fundamental Insights into Conformational Stability and Orbital Interactions of Antioxidant (+)-Catechin Species and Complexation of (+)-Catechin with Zinc (II) and Oxovanadium (IV). *Journal of Molecular Structure*. **1047**: 344–357
- [64] Elhabiri M., Carrër C., Marmolle F., Traboulsi H. (2007). Complexation of iron (III) by catecholate-type polyphenols. *Inorganica Chimica Acta*. **360**(1): 353-359.
- [65] Hajji H.E., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. (2006). Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free radical research*. **40**(3): 303-320.
- [66] Severino J.F., Goodman B.A., Reichenauer T.G., Pirker K.F. (2011). Is there a redox reaction between Cu (II) and gallic acid?. *Free Radical Research*. **45**(2): 123-132.
- [67] Goodman B.A., Severino J. F., Pirker, K. F. (2012). Reactions of green and black teas with Cu (II). *Food & Function*. **3**(4): 399-409.
- [68] Pirker K.F., Baratto M.C., Basosi R., Goodman B.A. (2012). Influence of pH on the speciation of copper (II) in reactions with the green tea polyphenols, epigallocatechin gallate and gallic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **112**: 10-16.
- [69] Harris D.C., Aisen P. (1973). Facilitation of Fe (II) autoxidation by Fe (III) complexing agents *Biochim. Biophys. Acta*. **329**: 156–158
- [70] Morgan B., Lahav O. (2007). The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution – *basic principles and a simple heuristic description* *Chemosphere*. **68**(11): 2080-2084.

- [71] Cho Y.J., Alamed J., McClements D.J., Deccker E.A. (2003). Ability of chelators to alter the physical location and prooxidant activity of iron in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry and Toxicology*. **68**: 1952-1957.
- [72] Guzun-Cojocaru T., Cayot P., Loupiac C., Cases E. (2010). Iron chelates and oil-water interfacial stabilized by milk proteins: role of phosphate groups and pH. Prediction of iron transfer from aqueous phase toward fat globule surface by changes of interfacial properties. *Food Hydrocolloids*. **24**: 364-373.
- [73] Peters, T.J. (1996). All About Albumin, Academic Press, San Diego. p. 415.
- [74] Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *Febs Letters*. **582**(13): 1783-1787.
- [75] Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S. (2005) Structural basis of the drug binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*. **353**: 38–52.
- [76] Christensen, B.T. (1992). Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. In *Advances in soil science* Springer New York. pp. 1-90.
- [77] Stengel P., Gelin S. (1998). Sol: interface fragile. INRA Ed *Quae*. p: 222.
- [78] Dangles O. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Tec et Doc Lavoisier*. pp: 29-50.

*Conclusion générale
et
perspectives*

Conclusion générale et perspectives

La famille des polyphénols renferme de nombreux composés d'intérêt nutritionnel et valorisables dans l'industrie alimentaire et la cosmétologie en raison de leurs propriétés réductrices (antioxydantes) et de leur capacité à interagir avec les ions métalliques et une grande variété de protéines.

Ce travail comporte deux parties :

1- Une étude de l'enrichissement de l'huile d'olive en composés phénoliques par transfert direct de ces derniers depuis des feuilles d'olivier, séchées et broyées, à l'huile sous irradiation ultrasonore en comparaison avec une macération conventionnelle. Des différentes analyses pratiquées (optimisation des paramètres d'extraction, suivi cinétique, dosage des phénols totaux et spécifiques de l'olive, analyses par CLHP-SM et mesure de pouvoir antioxydant), il ressort que la macération sous ultrasons à 16 °C est particulièrement appropriée et adéquate pour l'enrichissement rapide de l'huile d'olive en polyphénols à l'échelle du laboratoire (réacteur de 3 litres) et même à l'échelle pilote (réacteur de 30 litres). Ainsi l'EAU permet une amélioration de la stabilité et de la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive.

2- L'étude des propriétés physico-chimiques de composés phénoliques abondants dans l'alimentation (phénols de l'olive, acide chlorogénique, les flavonoïdes quercétine, rutine et catéchine) en relation avec leur activité possible dans le tractus digestif, a permis de mieux comprendre les paramètres qui gouvernent la réactivité de ces polyphénols, pouvoir antioxydant et leurs interactions avec les composants alimentaires lors de la digestion.

L'étude de l'activité antiradicalaire (test DPPH^{*}) des polyphénols sélectionnés en milieu micellaire aqueux confirme la capacité antioxydante de ces composés en présence et en absence de la protéine SAB et d'un modèle d'amidon (β -cyclodextrine).

L'étude de la capacité des composés phénoliques à complexer les ions métalliques, suggère que les flavonols et acides hydroxycinnamiques présentant un noyau catéchol sont susceptibles de complexer Fe^{III} dès le compartiment gastrique quand le pH est faiblement acide (1-2 h après le repas). Par contre, l'interaction avec Fe^{II} et les ions du cuivre est probablement négligeable. L'interaction Fe^{III} – polyphénol conduit à des complexes stables (sans oxydation notable du polyphénol) mais peut être inhibée par les interactions

polyphénol-protéine. On peut supposer que les flavanols et tannins condensés n'interagissent avec Fe^{III} qu'après neutralisation du milieu à l'entrée du petit intestin.

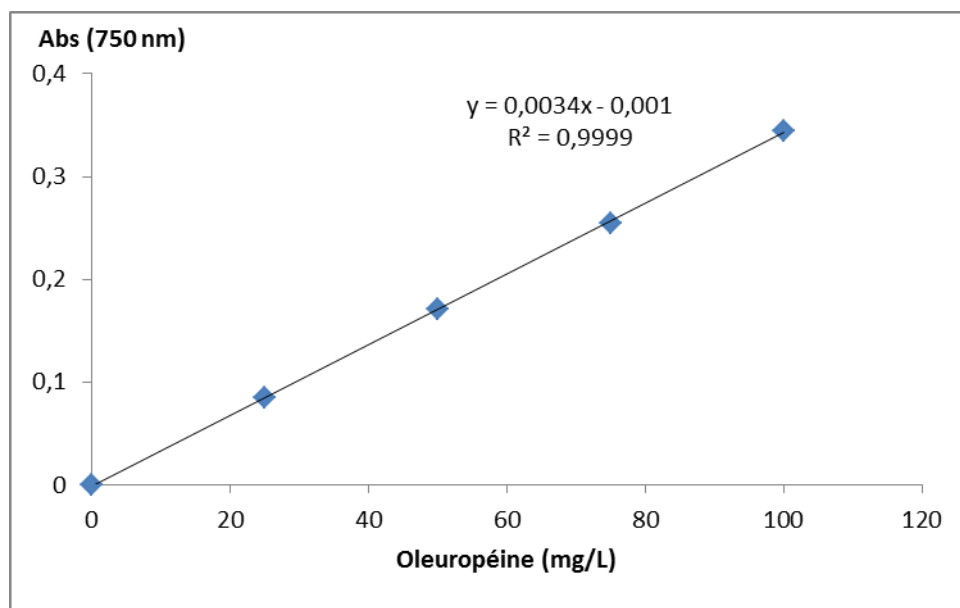
Globalement, les polyphénols sélectionnés dans ce travail, présentent une forte activité antioxydante et sont particulièrement très intéressants pour leurs applications dans le domaine alimentaire (inhibition de l'oxydation des lipides) et pour leur capacité à protéger l'organisme contre le stress oxydant et ce dès le compartiment gastrique. L'ingestion régulière de polyphénols par la consommation de fruits et légumes pourrait permettre à notre organisme de renforcer ses moyens de défense contre les processus d'oxydation qui menacent quotidiennement nos cellules.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude ne constitue qu'une ébauche dans le domaine de recherche des antioxydants naturels, il serait intéressant d'étayer ce travail par :

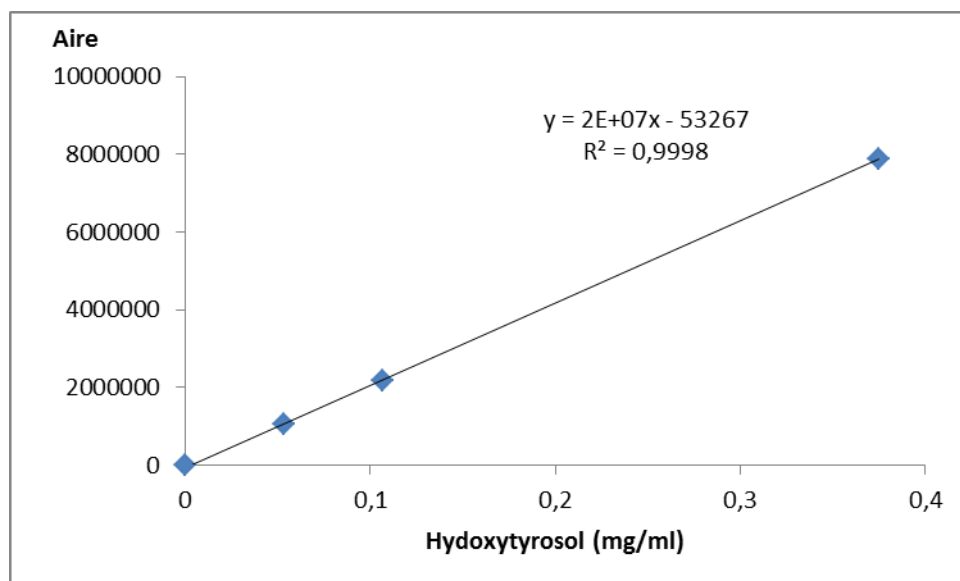
- L'investigation de l'enrichissement de l'huile d'olive par les antioxydants des co-produits de l'industrie oléicole, margines et grignons d'olive ;
- La mise en évidence des potentialités de la technique EAU dans l'enrichissement en antioxydants naturels d'autres huiles alimentaires riches en acides gras polyinsaturés telles que l'huile de tournesol et l'huile de colza.
- La finalisation de l'étude de la capacité des phénols de l'alimentation à réduire le fer hémérique hypervalent (Fe^{IV}) en milieu faiblement acide dans le but de simuler un stress oxydant d'origine alimentaire. La metmyoglobine constitue la principale forme de fer de la viande rouge et un initiateur de peroxydation lipidique particulièrement efficace dans des conditions faiblement acides (pH 4-6) après activation préalable par des hydroperoxydes (H_2O_2 , hydroperoxydes lipidiques). Nos travaux préliminaires (non rapportés dans ce manuscrit) ont montré que tous les phénols sélectionnés dans ce travail sont capables de réduire rapidement la metmyoglobine activée (Fe^{IV}), y compris en présence de SAB.
- L'application du modèle gastrique simplifié (test DPPH en milieu micellaire faiblement acide) à des aliments réels riches en polyphénols (purées de fruits et légumes, jus de fruits, thé, café...).

Annexes

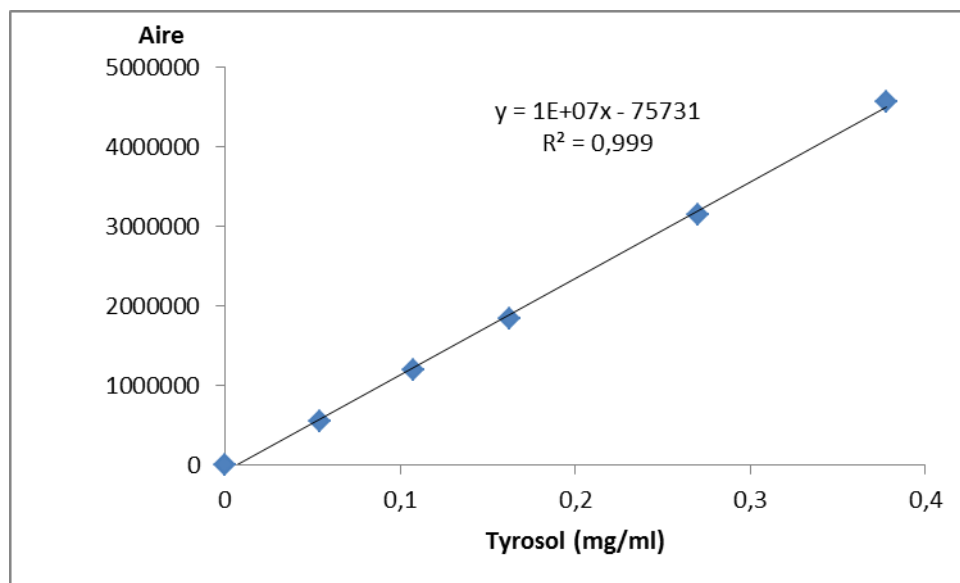
Annexe 1: Courbes étalons



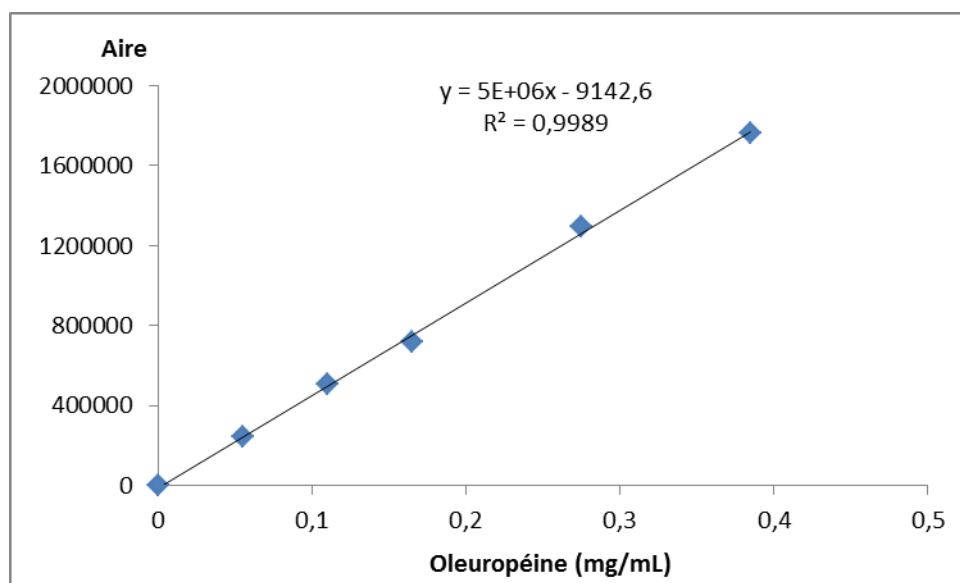
Courbe d'étalonnage de l'oleuropéine



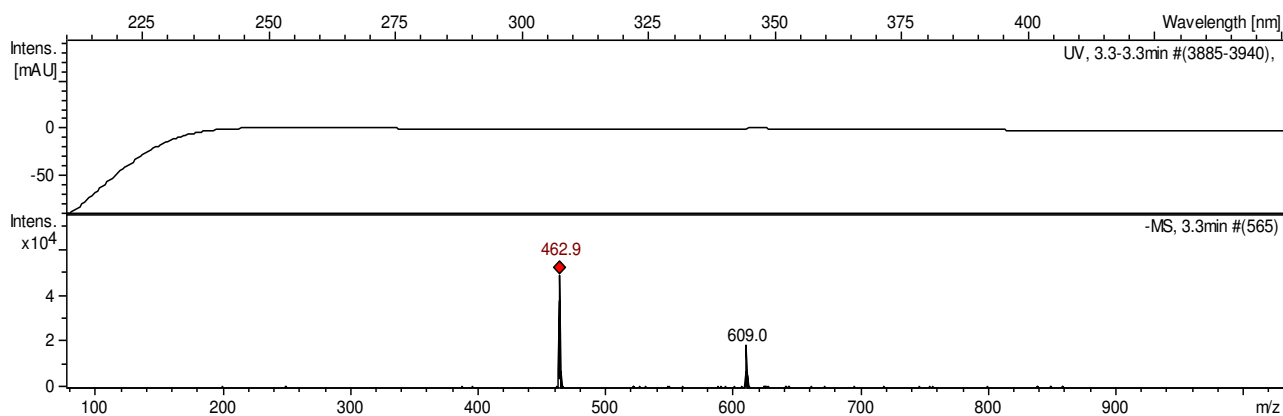
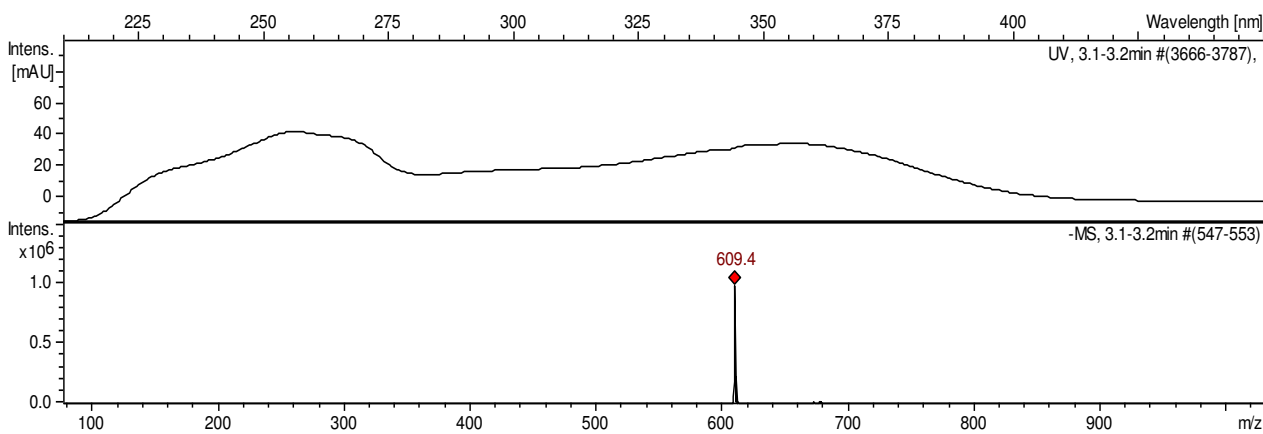
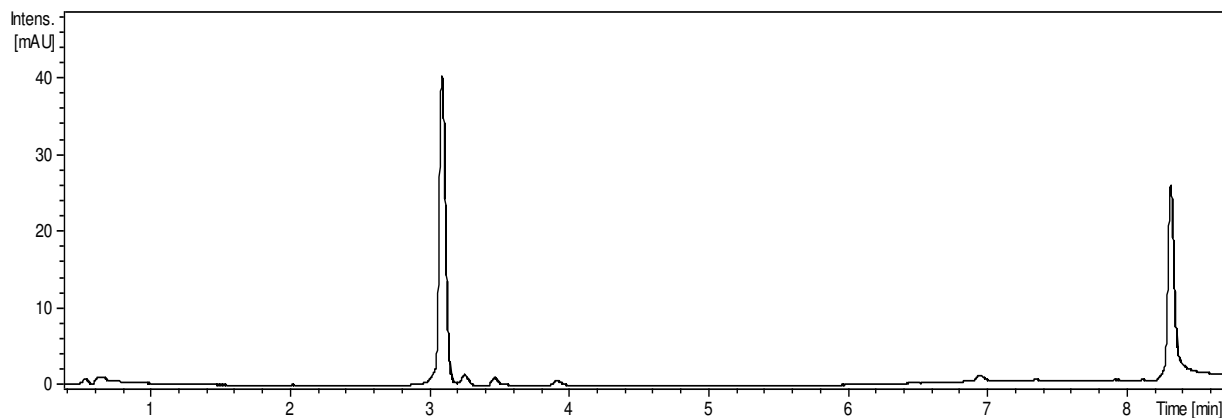
Courbe d'étalonnage de l'hydroxytyrosol

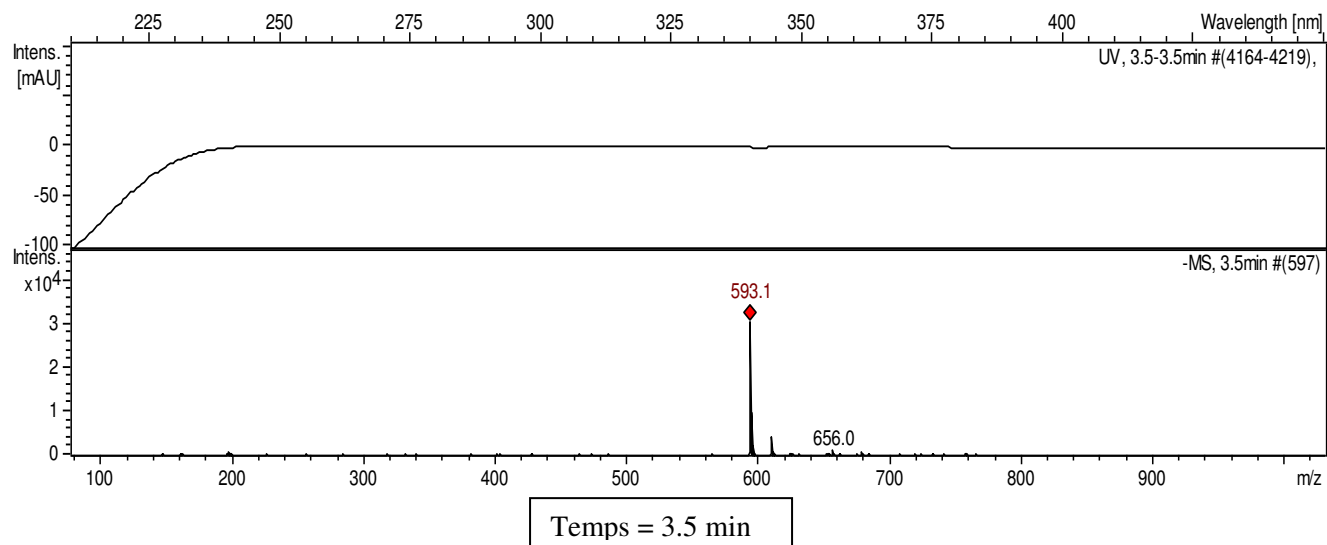


Courbe d'étalonnage de tyrosol



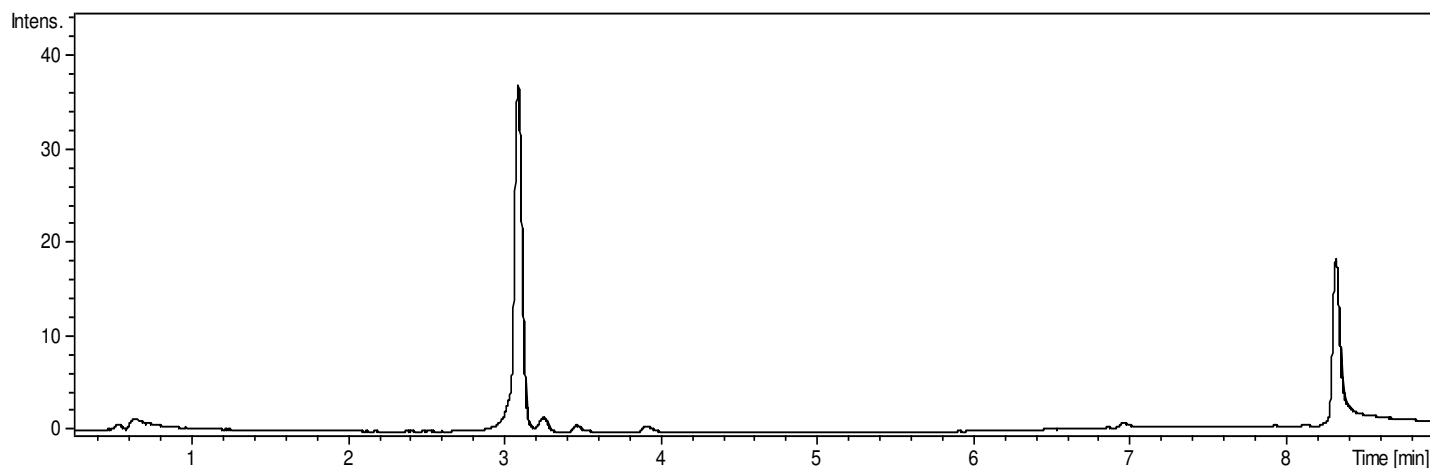
Courbe d'étalonnage de l'oleuropéine

Annexe 2: Analyse CLUP-SM de la complexation rutine – Fer (III)**a- Complexation Rutine - fer (III), après 3 min**

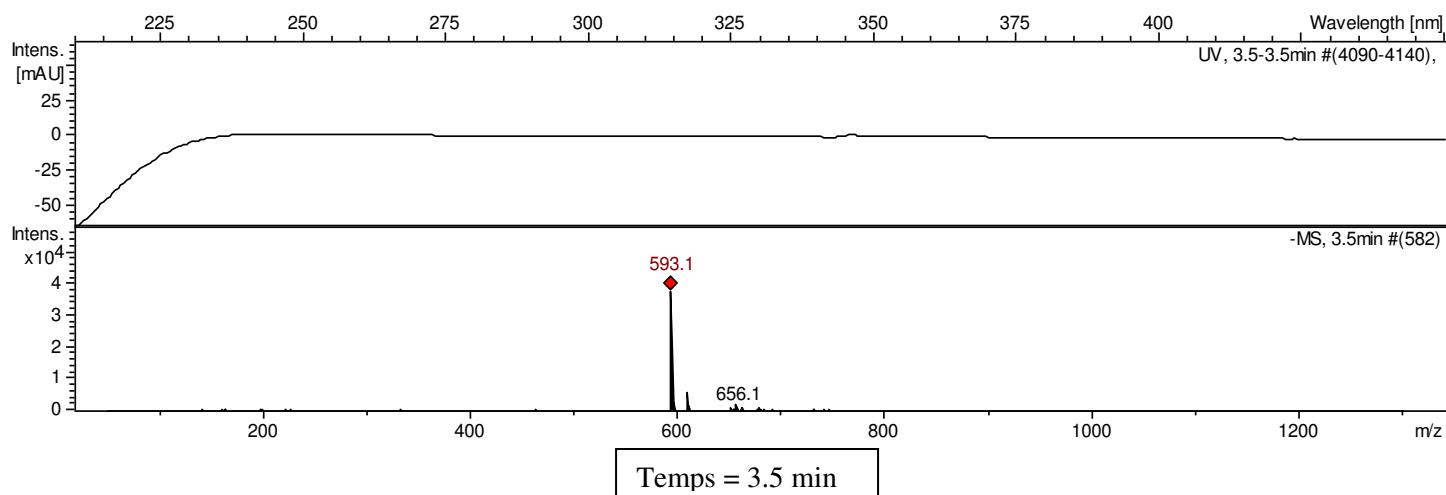
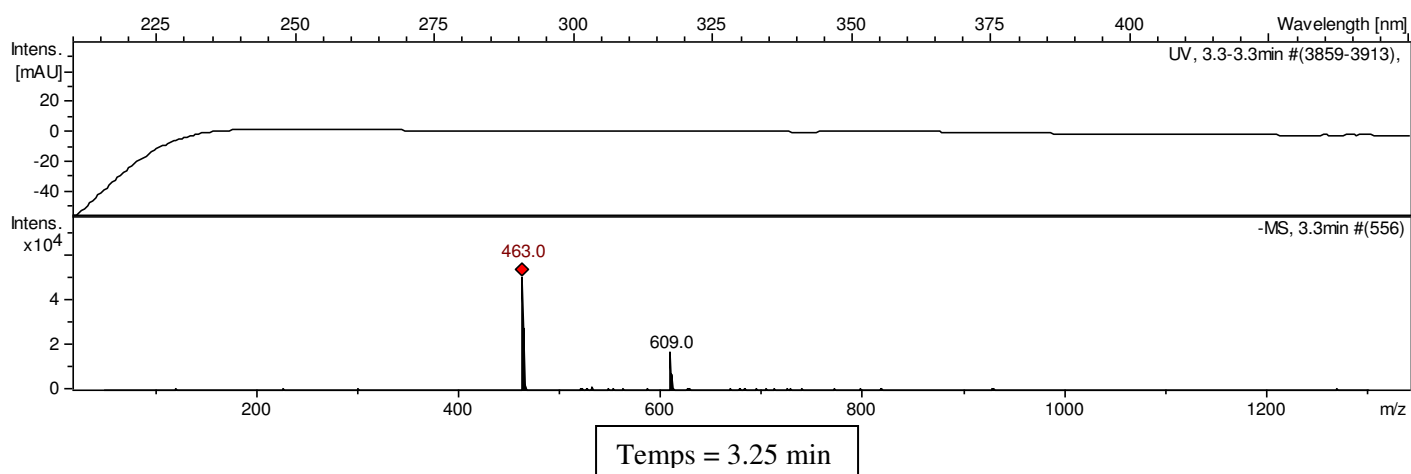
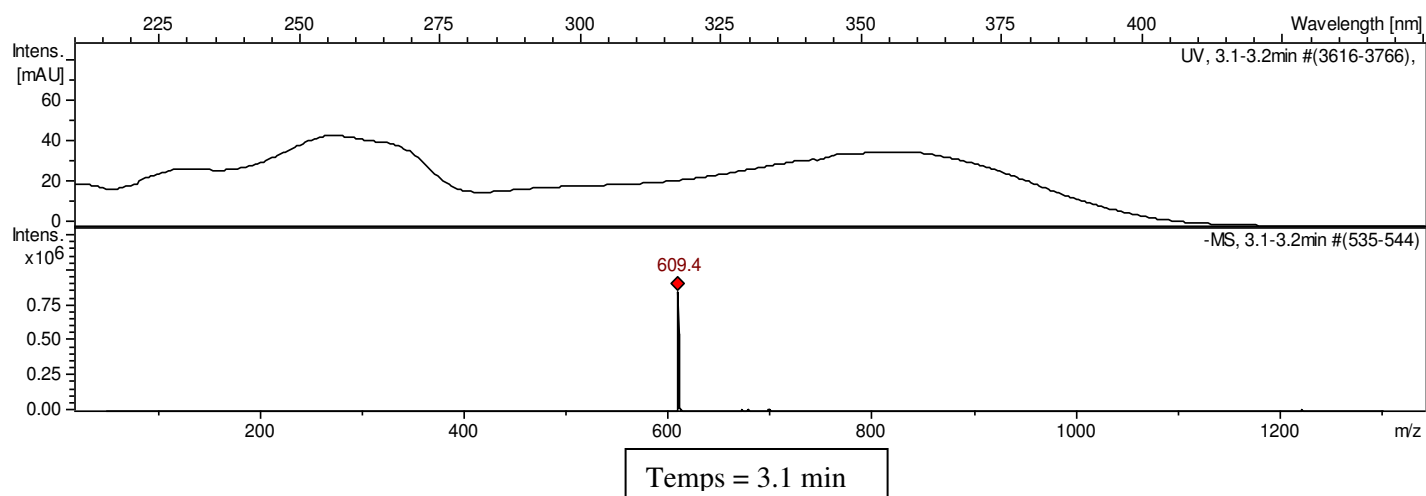


Les spectres masses lors de la complexation rutine (100 μM) par 1 equiv. Fe^{3+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). 3.1 min, 3.3 min et 3.5 min après mélange.

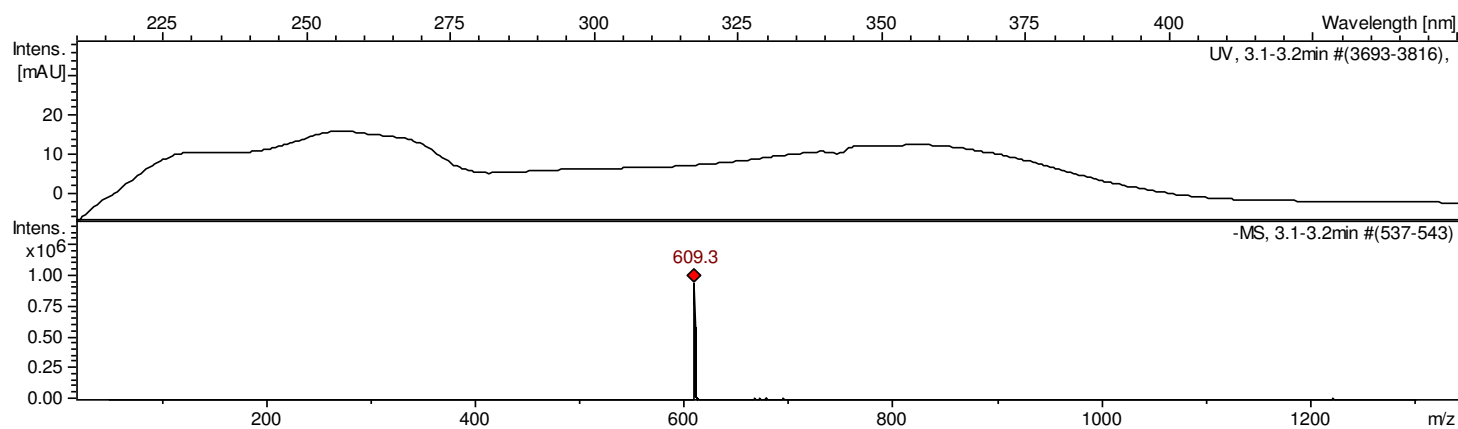
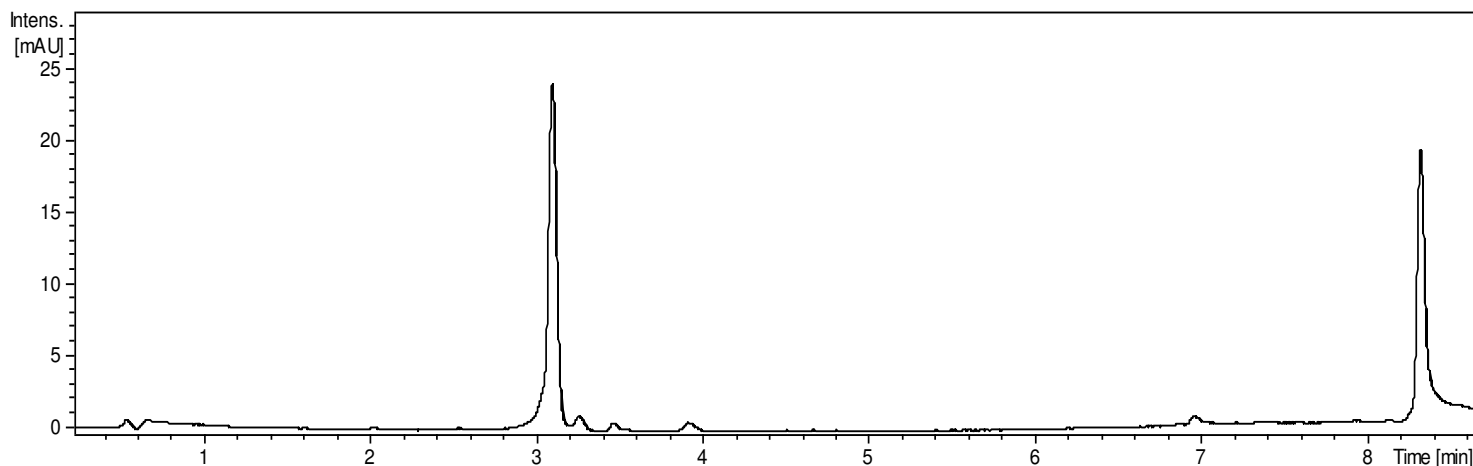
b- Complexation Rutine - fer (III), après 13 min



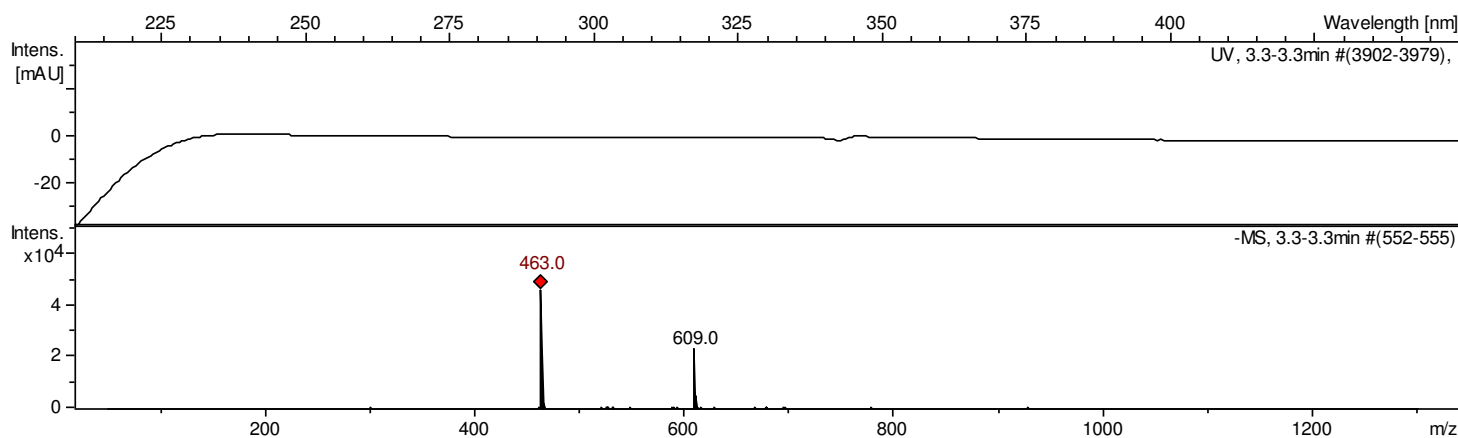
Chromatogramme HPLC-DAD à 280 nm du mélange équimolaire rutine / Fe^{3+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C), après 13 min. Concentration de la rutine et de fer (III) = 100 μM



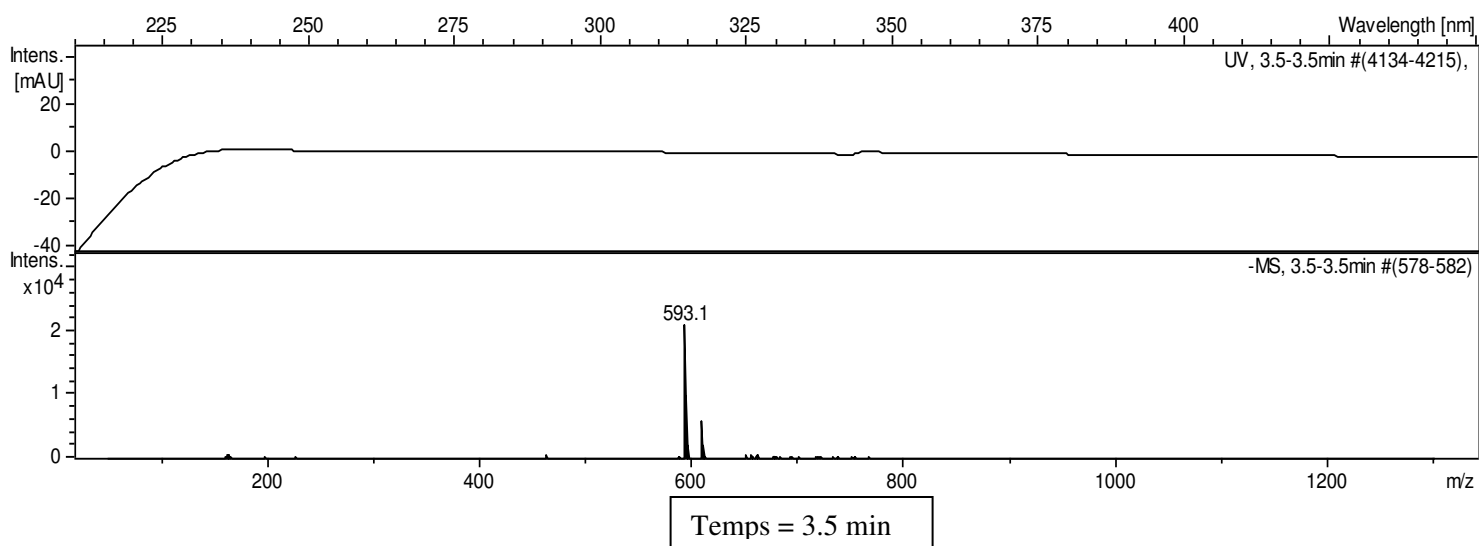
Les spectres de masses lors de la complexation rutine (100 μm) par 1 equiv. Fe^{3+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). 3.1 min, 3.25 min et 3.5 min après mélange

c- Complexation Rutine - fer (III), après 2 h

Temps = 3.1 min



Temps = 3.25 min

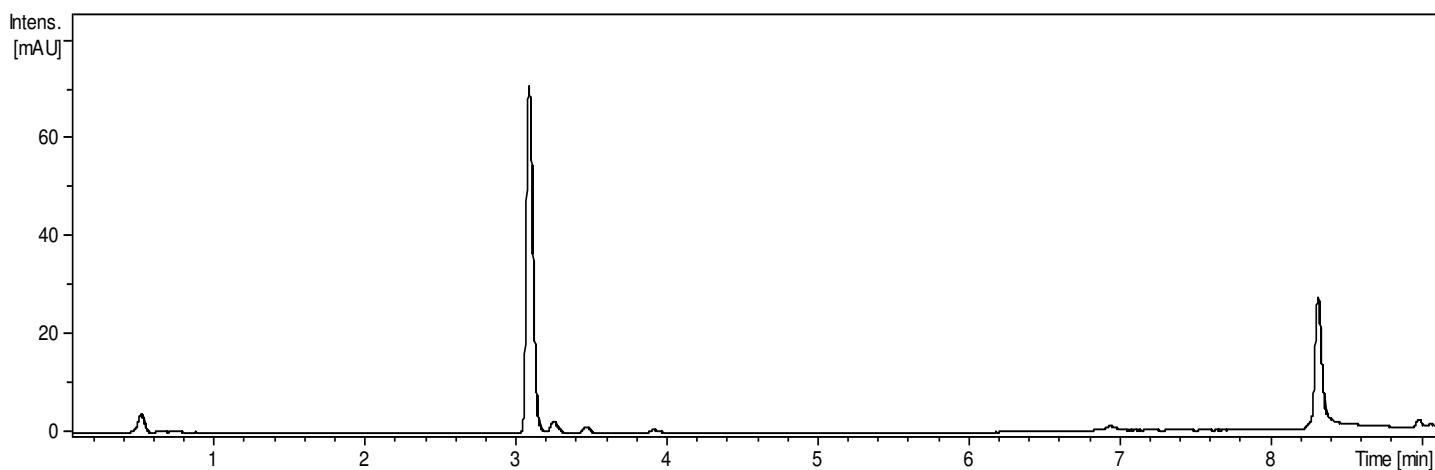


Les spectres masses de la réaction de complexation rutine (100 μm) par 1 equiv. Fe^{3+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). 3.1 min, 3.25 min et 3.5 min après mélange

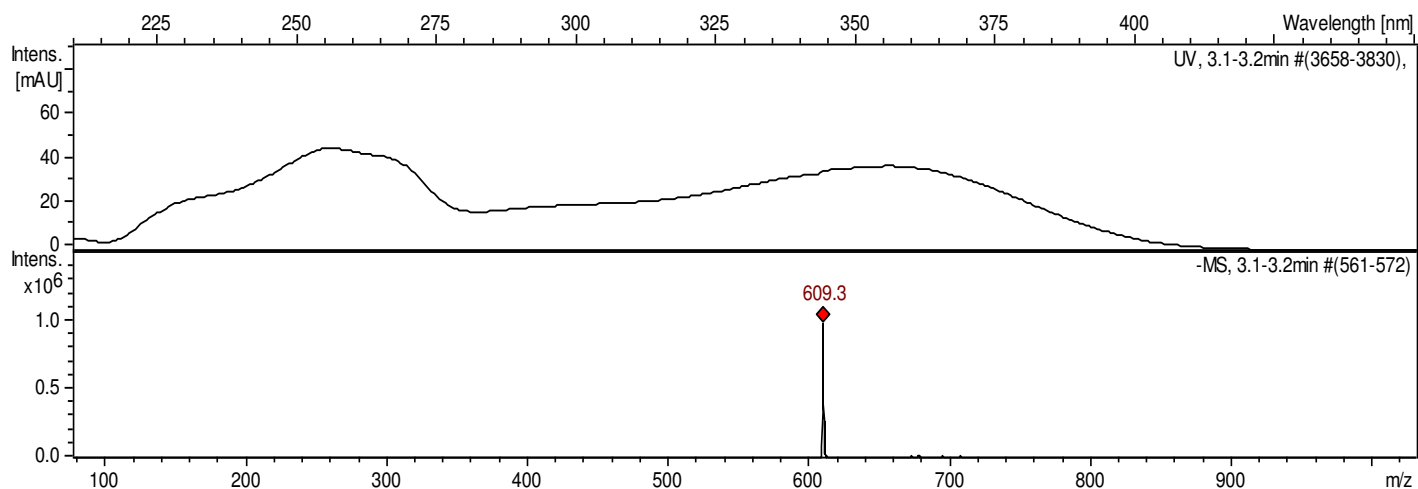
pas de nouveaux produits

Annexe 3: Analyse CLUP-SM de la complexation rutine – Fer (II)

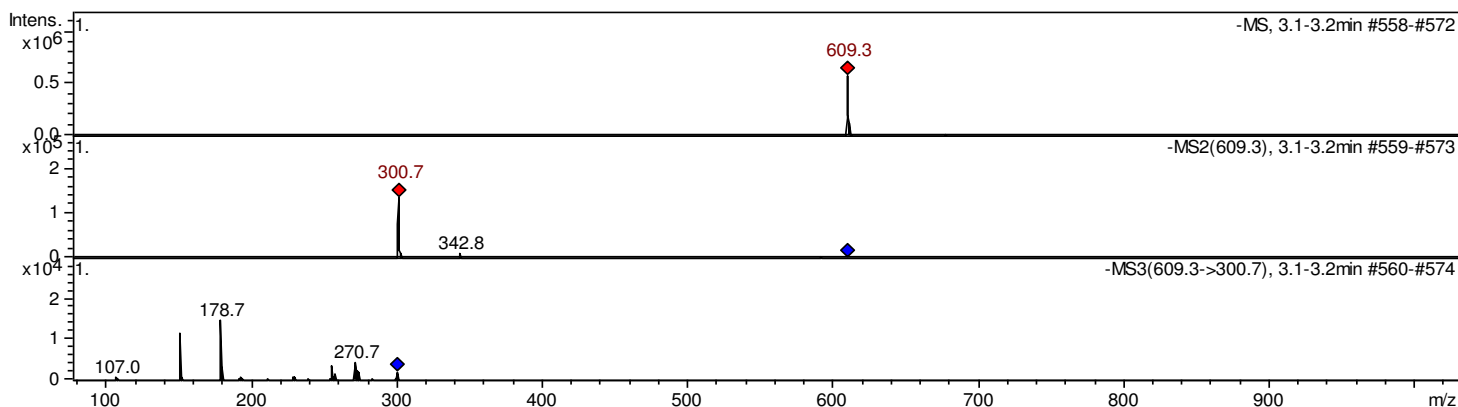
a- Complexation Rutine - fer (II)

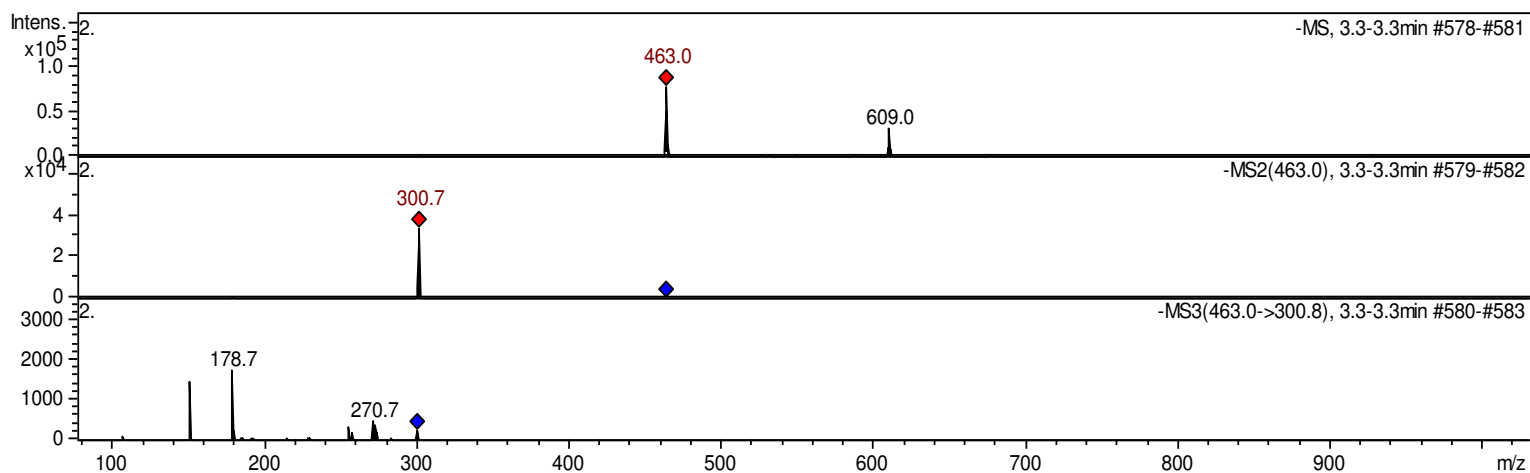
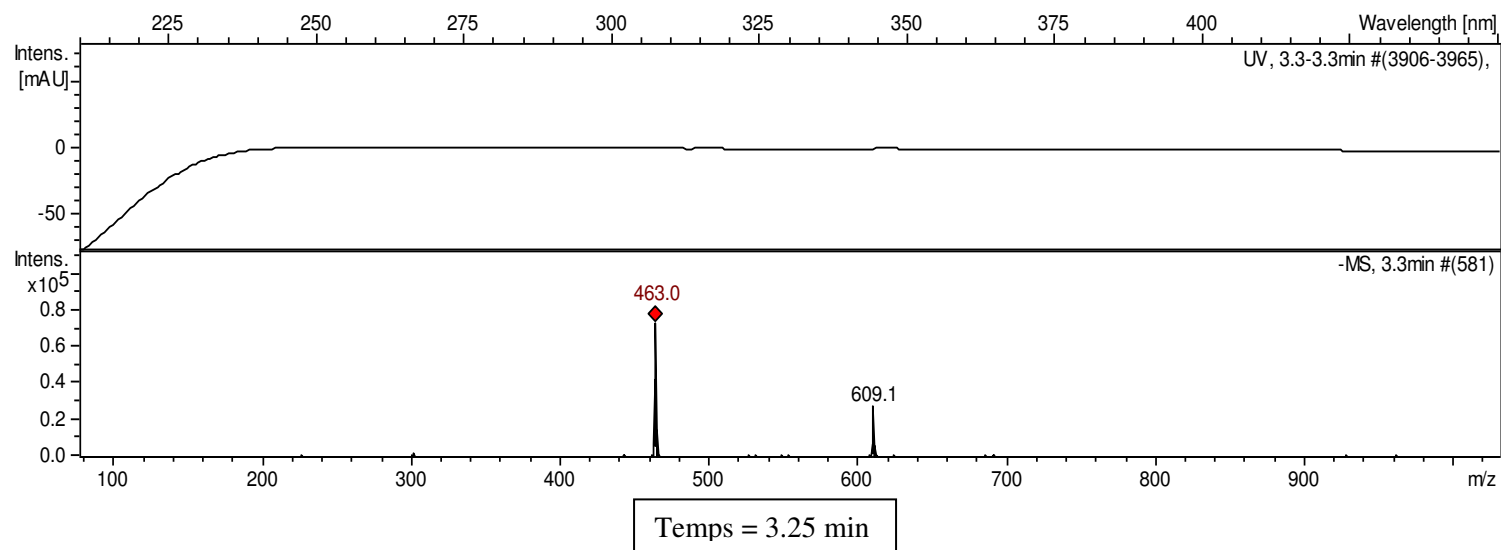


Chromatogramme HPLC-DAD à 280 nm du mélange équimolaire rutine / Fe^{2+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C), après 2 h. Concentration de la rutine et de fer (II) = 100 μM

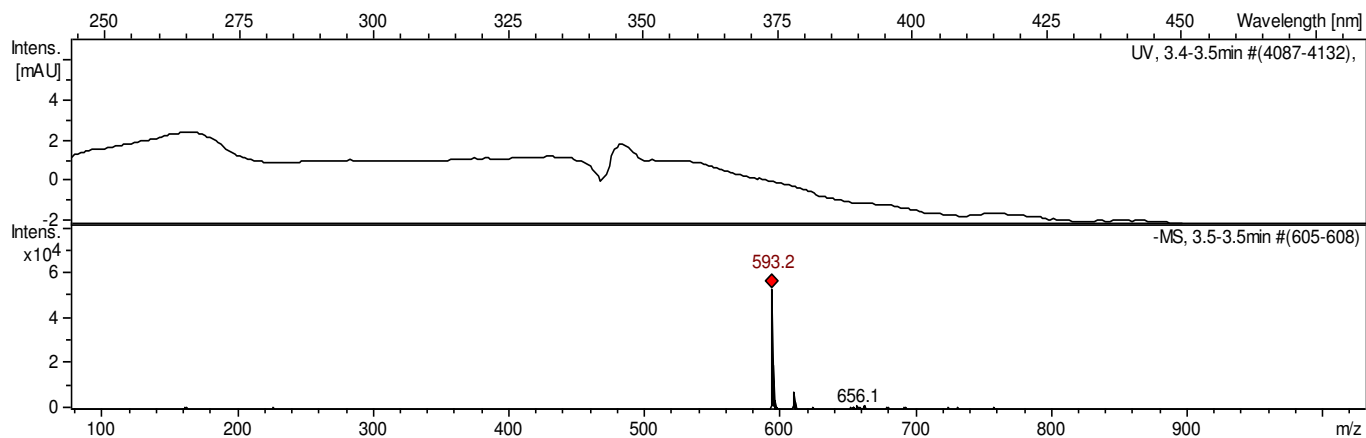


Temps = 3.1 min

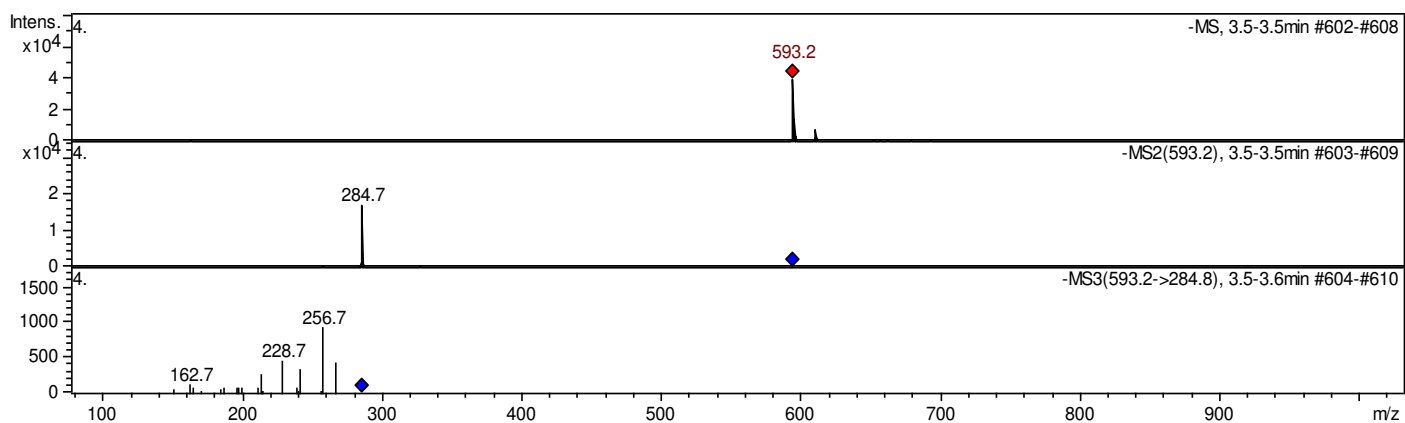




MS3 quercetine glucoside (impureté dans la routine de départ).

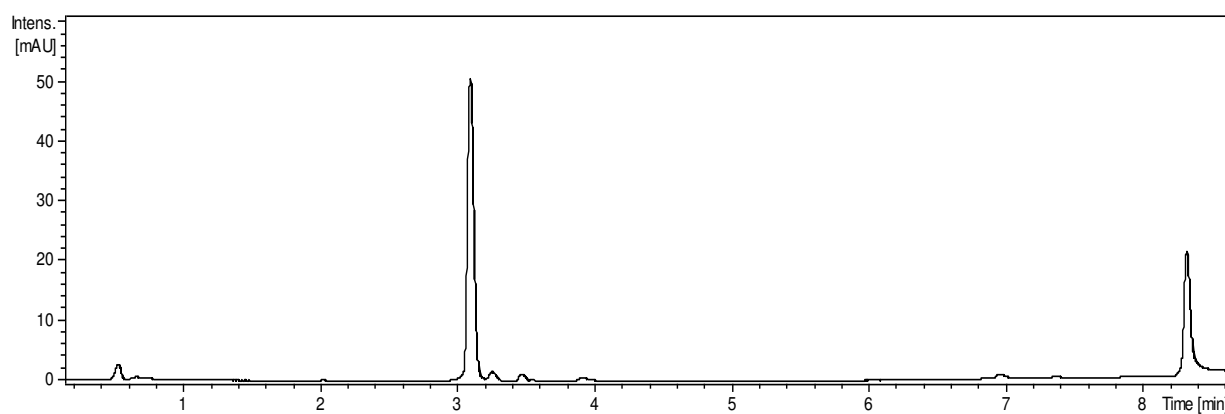


Temps = 3.5 min

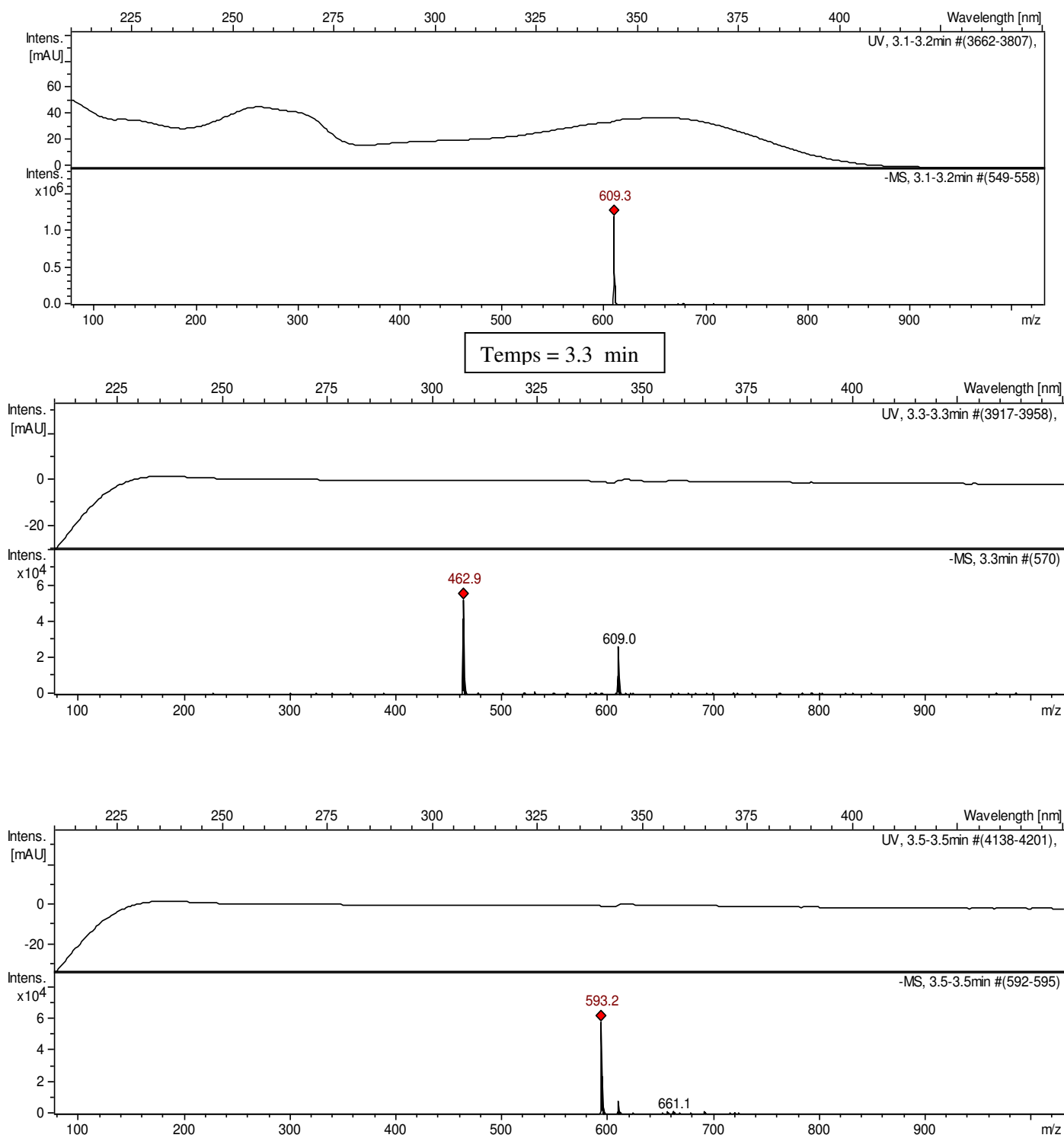


MS3 = kaempferol rutinoside impureté dans la rutine de départ

b- Complexation Rutine - fer (II), après 2 h 30

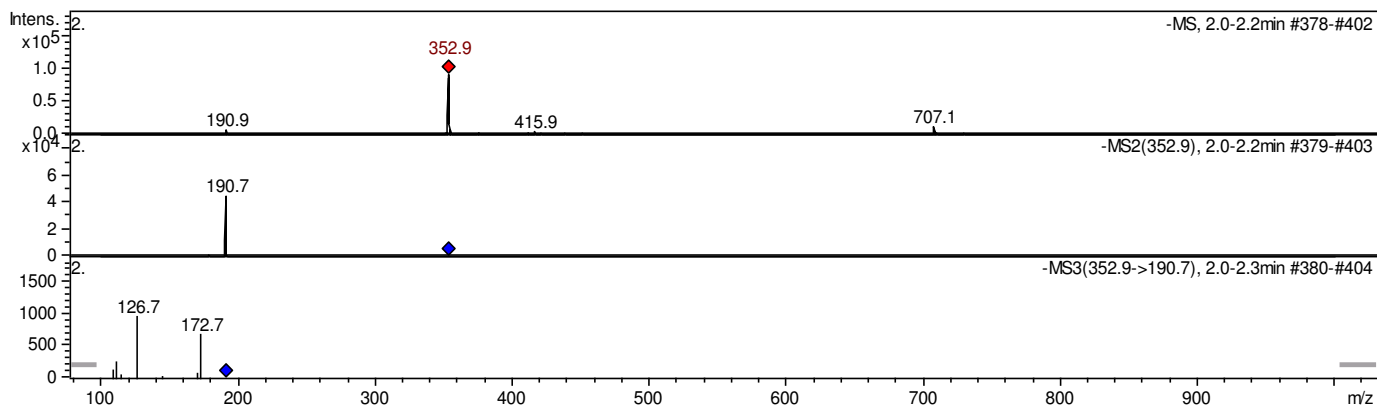
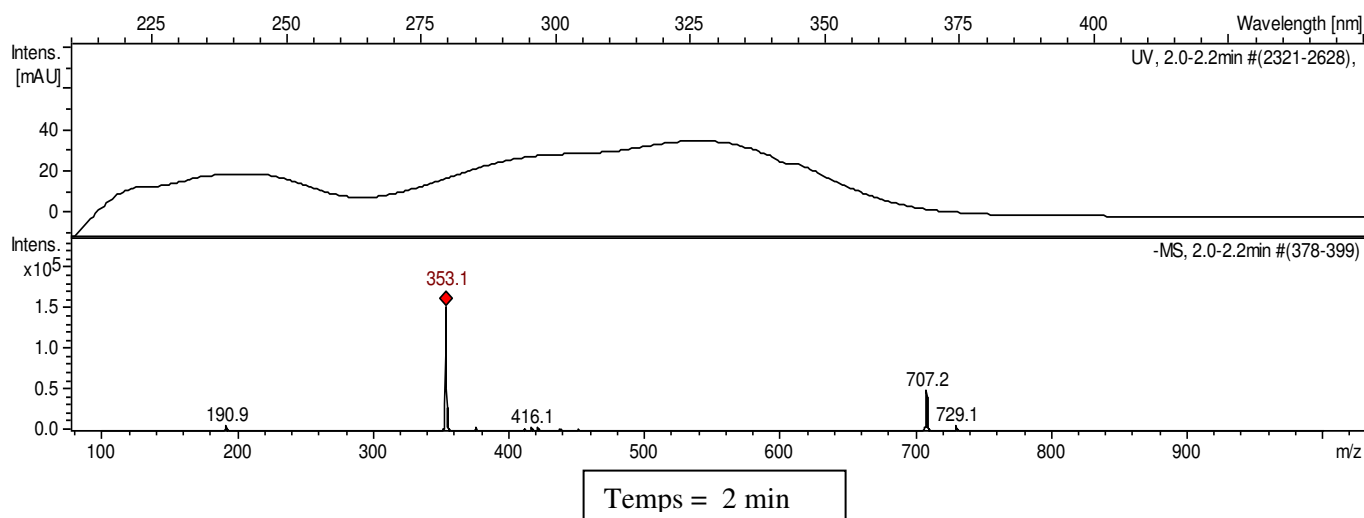
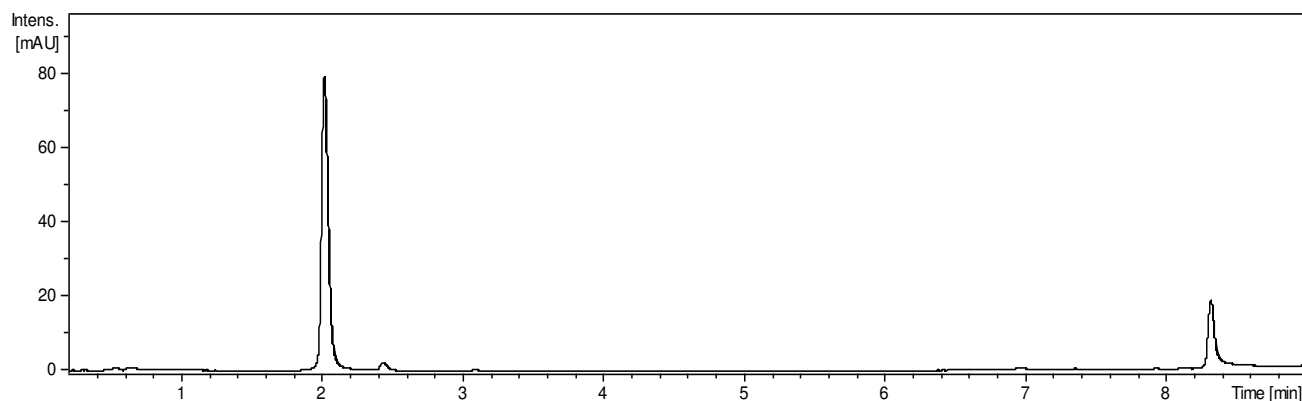


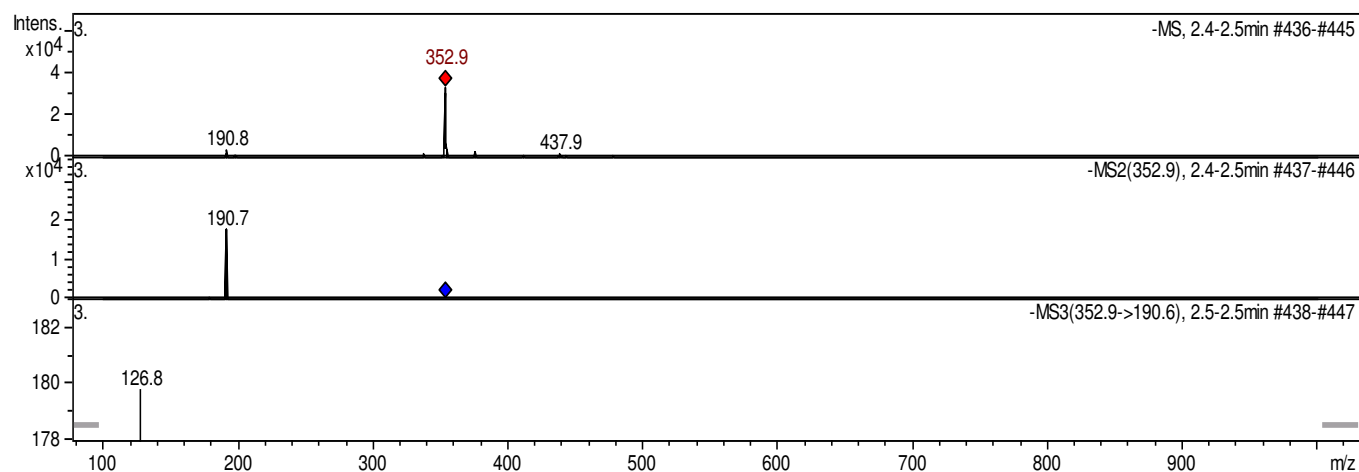
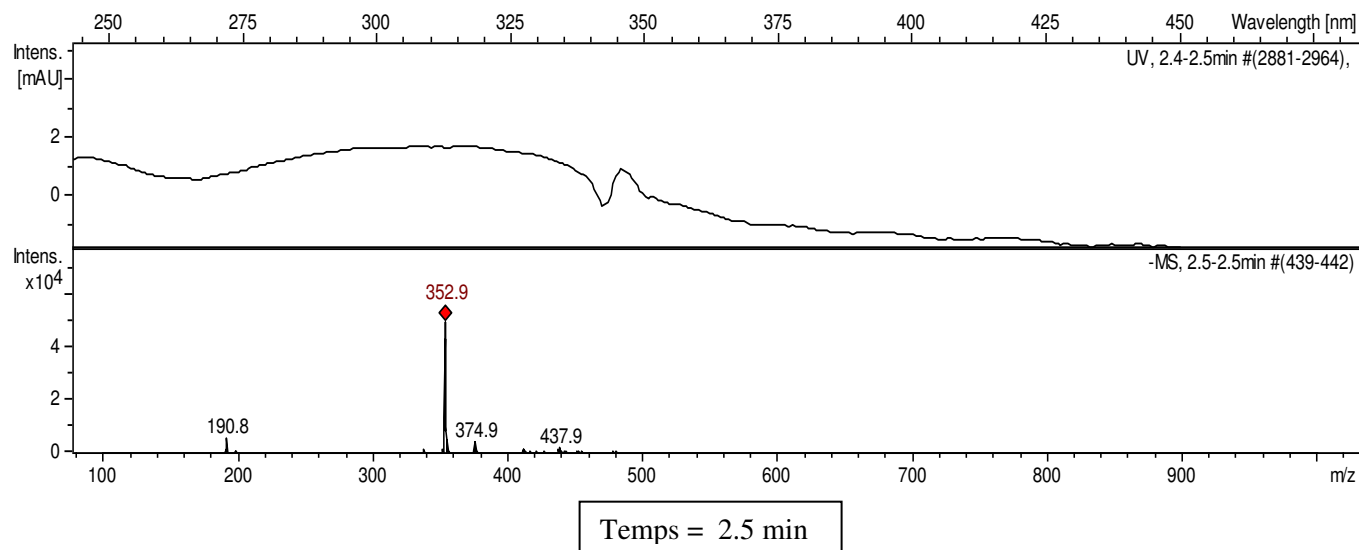
Chromatogramme HPLC-DAD à 280 nm du mélange équimolaire rutine / Fe^{2+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C), après 2 h. Concentration de la rutine et de fer (II) = 100 μM



Les spectres masses de la réaction de complexation rutine (100 μM) par 1 equiv. Fe^{3+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). 3.3 min, et 3.5 min après mélange

Pas de nouveaux produits

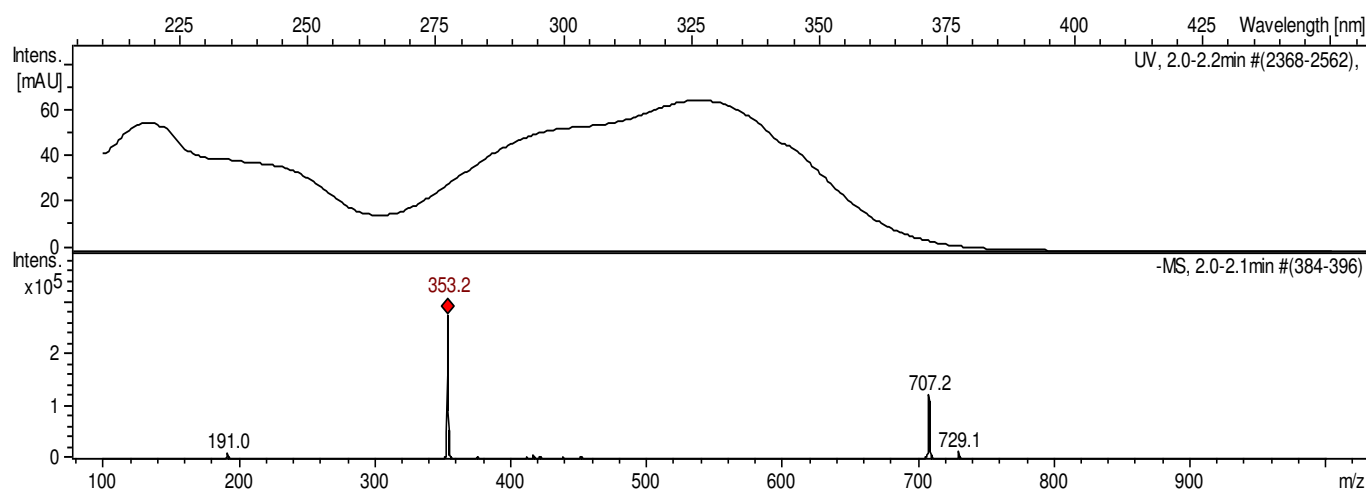
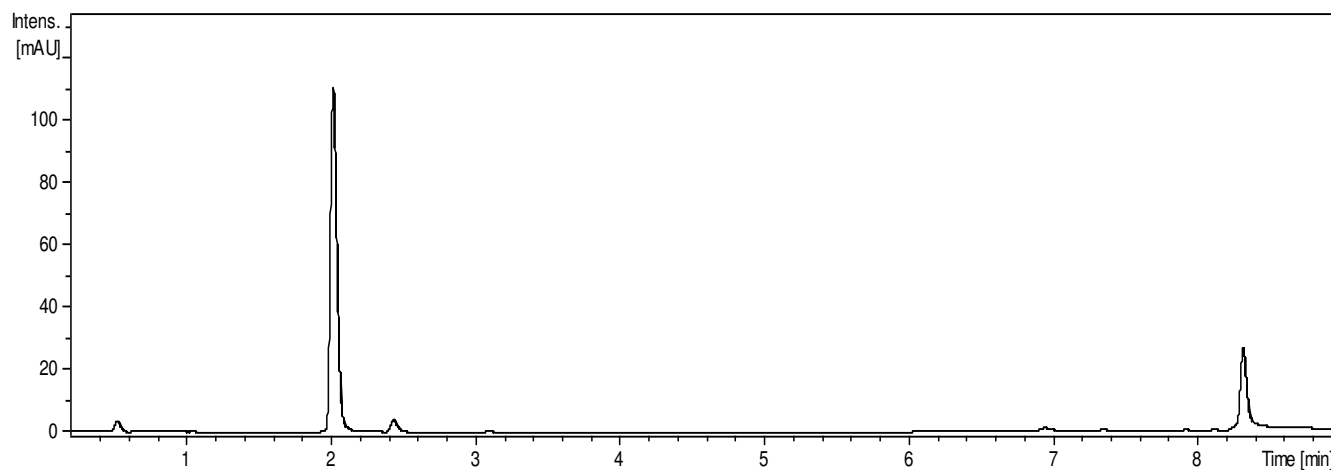
Annexe 4: Analyse CLUP-SM de la complexation acide chlorogénique – Fer**a- Complexation acide chlorogénique - fer (III)**



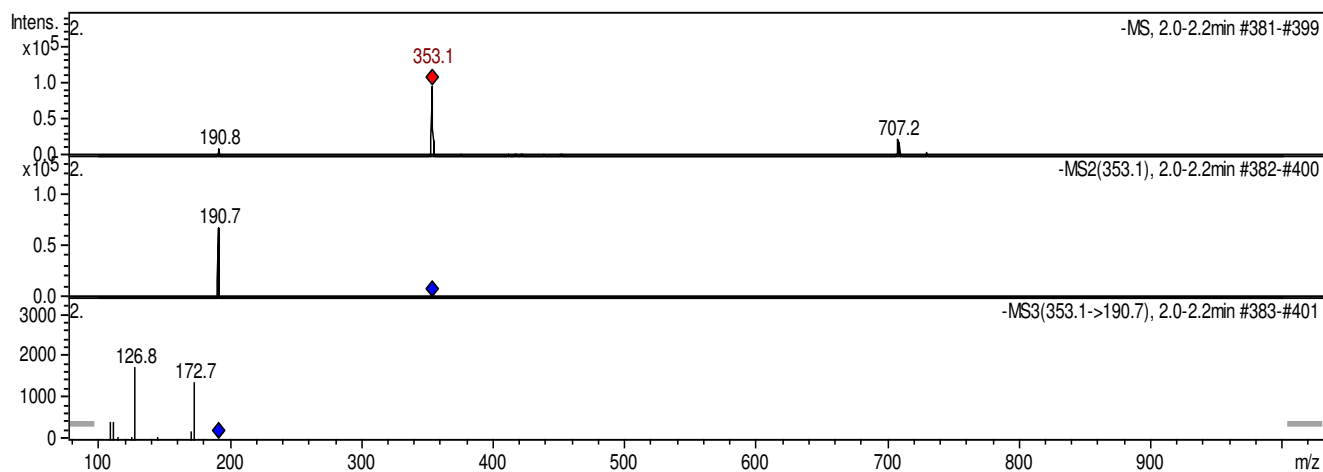
Les spectres masses de la réaction de complexation acide chlorogénique (100 μ m) par 1 equiv.

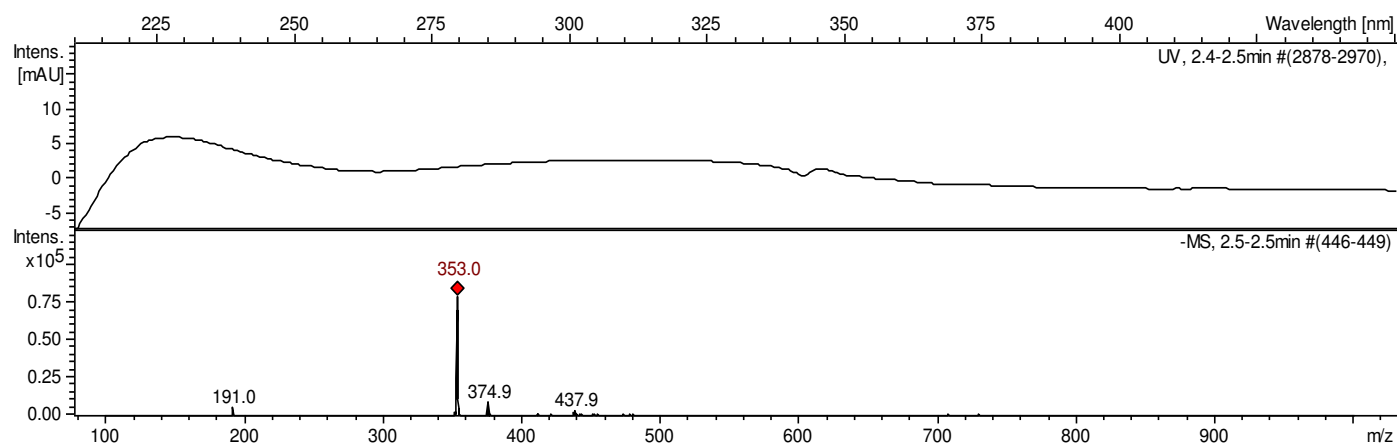
Fe^{3+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). 2 min et 2.5 min après mélange

pas de nouveaux produits

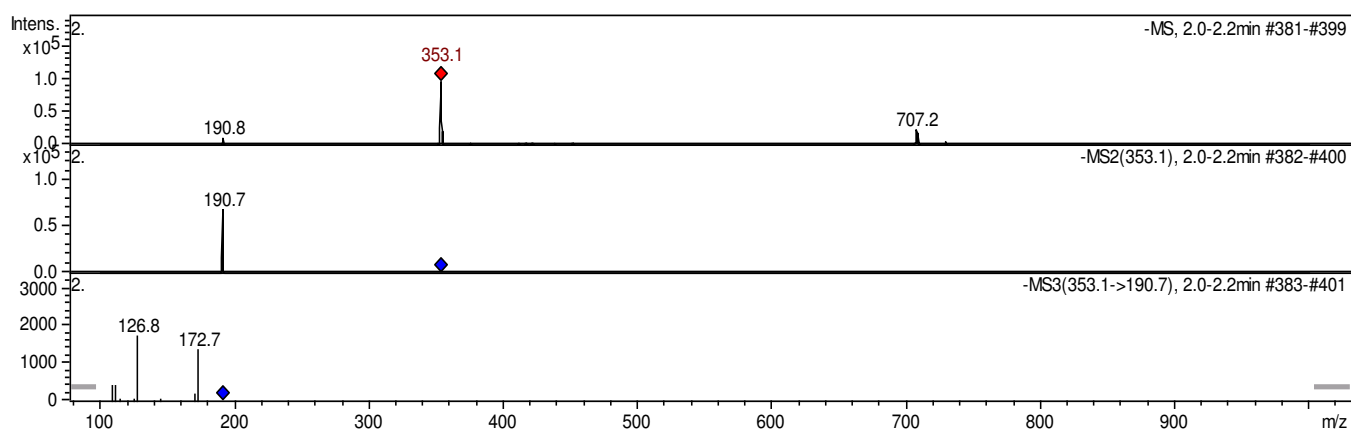
b- Complexation acide chlorogénique - fer (II)

Temps = 2 min





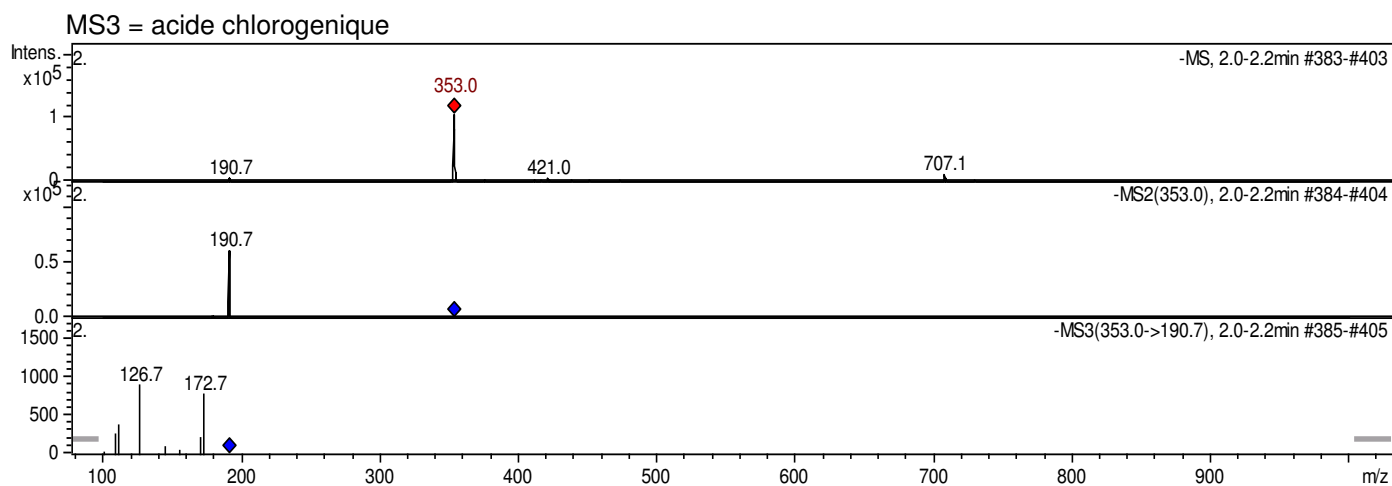
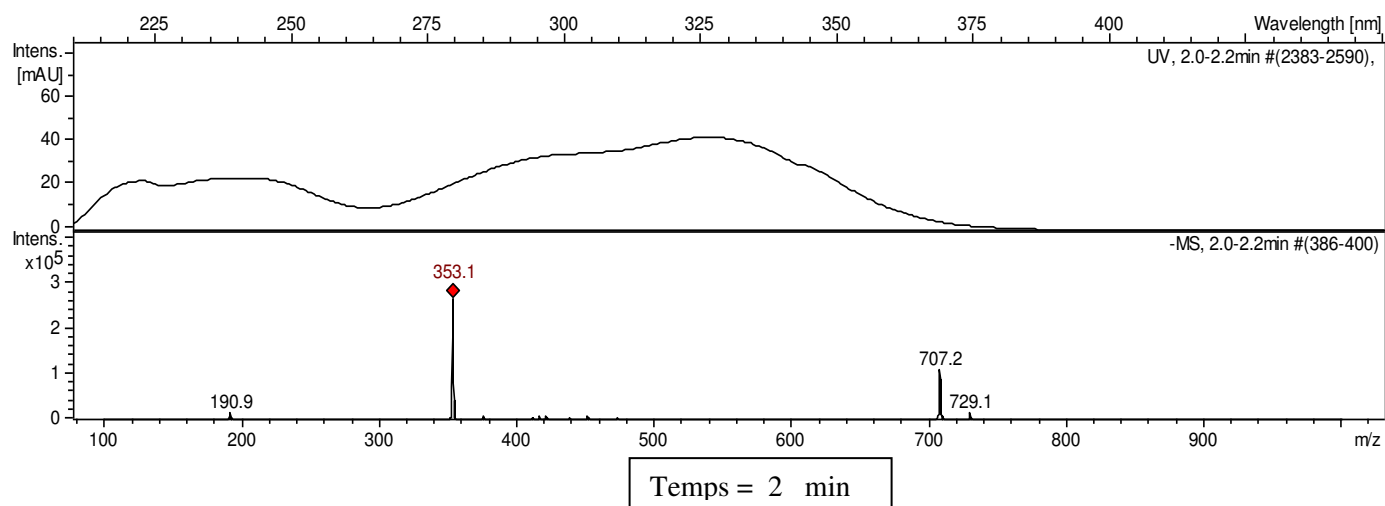
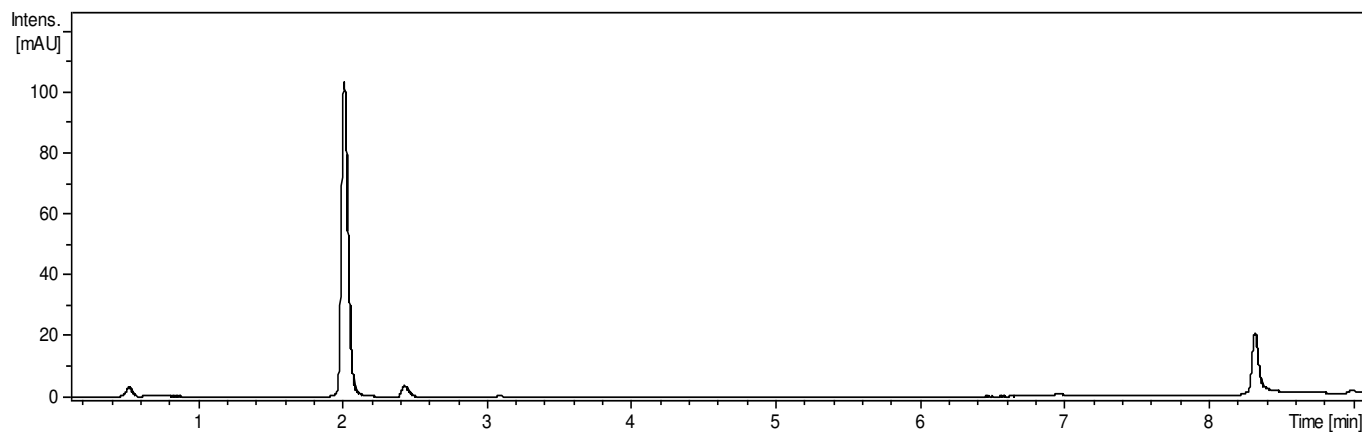
Temps = 2.5 min

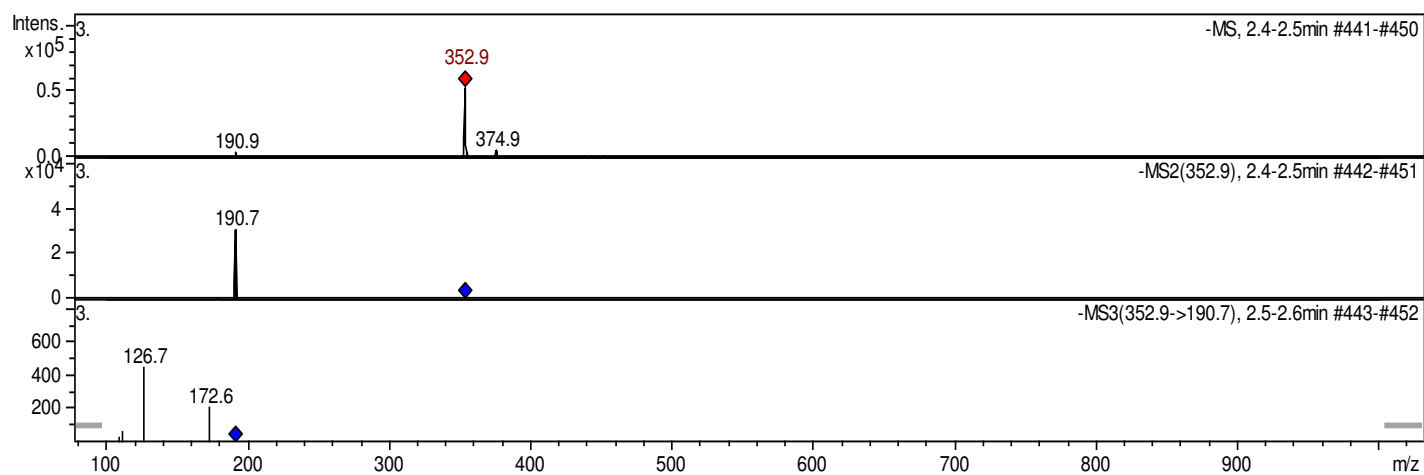
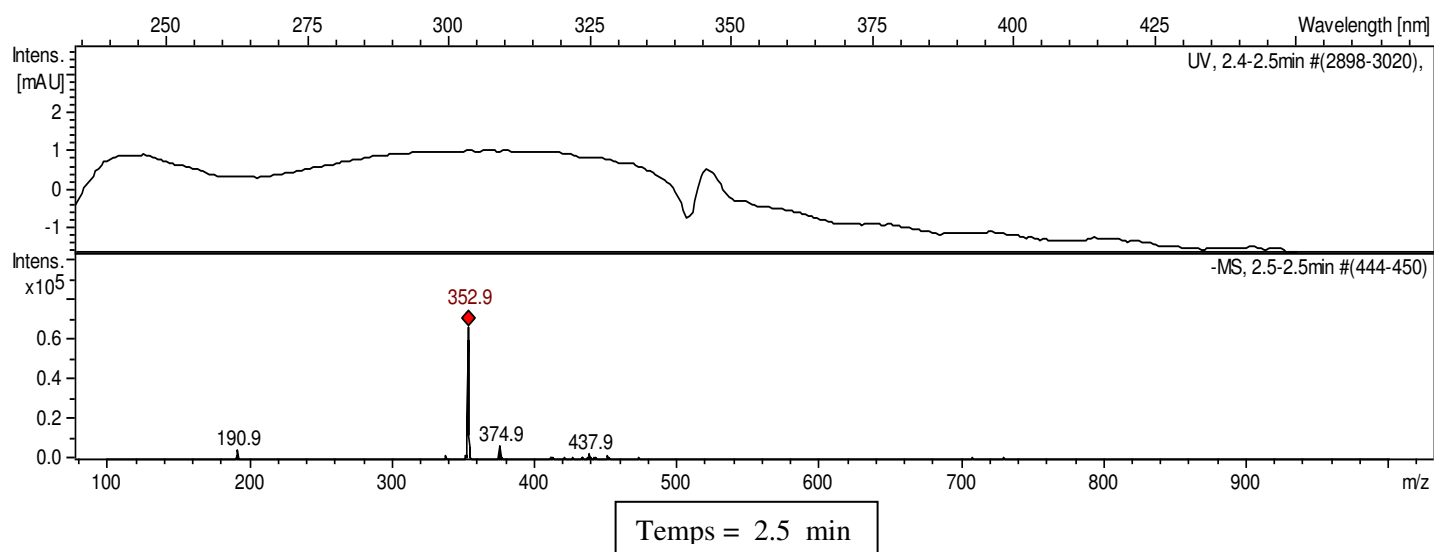


Les spectres masses de la réaction de complexation acide chlorogénique (100 μ m) par 1 equiv.

Fe^{2+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). 2 min et 2.5 min après mélange

MS3 = isomère de l'acide chlorogénique

b1- Complexation acide chlorogénique - fer (II), après 3 h



Les spectres masses de la réaction de complexation acide chlorogénique (100 μ m) par 1 equiv.

Fe^{2+} dans le tampon acétate (pH 5, 25°C). 2 min et 2.5 min après mélange

pas de nouveaux produits

Résumé. Les polyphénols sont des métabolites secondaires de végétaux abondants dans l'alimentation. Les extraire dans des conditions efficaces et mieux comprendre leurs propriétés physico-chimiques modulant leurs activités possibles dans le tractus digestif, constituent des enjeux scientifiques importants qui sont à la base de ce travail. La première partie porte sur l'enrichissement de l'huile d'olive en polyphénols par transfert direct de ces derniers des feuilles d'olivier à l'huile, sous irradiation ultrasonore en comparaison avec une macération conventionnelle. Après optimisation des paramètres d'extraction, la technique sous-ultrason à 16°C s'est révélée plus efficace que le procédé conventionnel du laboratoire (réacteur de 3 L) à l'échelle pilote industriel (réacteur de 30L). Dans la seconde partie, la réactivité de polyphénols communs et représentatifs des principales classes (rutine, quercétine, catéchine, acide chlorogénique et phénols de l'olive) avec le radical DPPH[•] et les ions de métaux de transition d'intérêt biologique (Fe^{II}, Fe^{III}, Cu^I, Cu^{II}), a été étudiée par spectroscopie UV-visible (études cinétiques), par CLUP-SM (analyse de produits d'oxydation) et au moyen des tests colorimétriques permettant de préciser l'état redox des ions métalliques. L'étude de l'activité antiradicalaire (test DPPH[•]) en milieu micellaire aqueux a confirmé la capacité antioxydante des polyphénols sélectionnés en présence et en absence de la protéine sérum albumine bovine (SAB) et d'un modèle d'amidon (β-cyclodextrine). L'étude de la capacité des composés phénoliques à complexer les ions métalliques, en solution faiblement acide (pH= 5-6), a suggéré que les flavonols et acides hydroxycinnamiques sont susceptibles de complexer Fe^{III} dès le compartiment gastrique quand le pH est faiblement acide (1-2 h après le repas). Par contre, l'interaction avec Fe^{II} et les ions du cuivre est probablement négligeable. L'interaction Fe^{III} – polyphénol conduit à des complexes stables (sans oxydation notable du polyphénol) mais peut être inhibée par les interactions polyphénol-protéine.

Abstract. Polyphenols are plant secondary metabolites which are abundant in the diet. Their extraction using efficient processes and a better understanding of their physico-chemical properties that modulate their possible activities in the gastric tract are important scientific goals, which underline this work. The first part deals with the direct enrichment of olive oil in polyphenols of olive leaves under ultrasonic irradiation in comparison with conventional maceration. After optimization of extraction parameters, the ultrasound-assisted process came up as more efficient than the conventional method at laboratory (reactor 3 L) to industrial pilot scale (reactor 30L). In the second part, the reactivity of some polyphenols, both common and representative of the main classes (rutin, quercetin, catechin, chlorogenic acid and olive phenols) with DPPH[•] radical and transition metal ions of biological interest (Fe^{II}, Fe^{III}, Cu^I, Cu^{II}) was studied by UV-visible spectroscopy (kinetic studies), UPLC-MS (analysis of oxidation products) and via colorimetric tests for the determination of the redox state of the metal ions. The study of the antiradical activity (DPPH[•] test) in aqueous micellar medium confirmed the antioxidant capacity of selected polyphenols in the presence and absence of bovine serum albumin (BSA) protein and a starch model (β-cyclodextrin). The study of the ability of phenolic compounds to bind metal ions in weakly acidic solution (pH= 5-6), suggested that flavonols and hydroxycinnamic acids are able to complex Fe^{III} from the gastric compartment when pH is slightly acid (1-2 h after the meal). However, interaction with Fe^{II} and copper ions is probably negligible. Interaction Fe^{III}- polyphenol leads to stable complexes (without significant oxidation of the polyphenol), but can be inhibited by the polyphenol-protein interactions.

ملخص. البولي فينول هي مركبات نباتية ثانوية وفيرة في النظام الغذائي. استخراجها في ظل ظروف فعالة وفهم خصائصها الفيزيو-كيميائية المغيرة لأنشطتها الممكنة في الجهاز الهضمي، يعتبر قضايا علمية هامة طرحت خلال هذا العمل. يتركز الجزء الأول على تخصيب زيت الزيتون بالبولي فينولات بالنقل المباشر من الأوراق الى زيت الزيتون تحت أشعة بالموجات فوق الصوتية، بالمقارنة مع النقع التقليدي. بعد التحسين من معاملات الاستخراج، ظهرت تقنية الموجات فوق الصوتية الفرعية في 16 م أكثر فعالية من عملية المخبر التقليدي مفاعل (3ل) على نطاق محطة تجريبية مفاعل (30ل). في الجزء الثاني تفاعل البوليفينول المشتركة والمثل للطبقات الرئيسية (روتين، كيرسيتين، كاتشين، حمض الكلوروجينيك والفينول في زيت الزيتون) مع الراديكالية وانتقال ايونات المعادن ذات الأهمية البيولوجية (ثنائي أكسيد الحديد، ثلاثي أكسيد الحديد، احادي أكسيد النحاس و ثنائي أكسيد النحاس) درس بجهاز السبكتروفوتوميتر للأشعة فوق البنفسجية المرئية (دراسات الحركية). قد درست وفق السبكتروفوتوميتر فوق البنفسجية المرئية (دراسات الحركية) و طريقة تحليل منتجات الاكسدة وبواسطة الاختبارات الكولورومتريّة دراسة النشاط عديم الراديكالية في وسط ميسيلار المائي أكد القدرة المضادة للأكسدة لمادة البوليفينول المختارة في لتوضيح حالة الأكسدة لايونات المعادن. حضور وغياب البروتين البومين المصل البقري ونموذج نشاء (ب-سيكلوديكسترين). دراسة قدرة المركبات الفينولية على تعقيد ايونات المعادن في محلول حامض ضعيف (حموضة 6,5) بينت أن الفلافون واحماض هيدروكسيسيناميك قادرة على تعقيد ثلاثي أكسيد الحديد انطلاقا من مقصورة المعدة في ظروف حموضة ضعيفة 1-2 ساعات بعد تناول وجبة، غير انه التفاعل مع ثنائي أكسيد الحديد وأيونات النحاس مهيمنة الذكر. تفاعل ثلاثي أكسيد الحديد و البولي فينول يؤدي إلى مجمعات مستقرة (دون أكسدة كبيرة من البوليفينول) ولكن يمكن أن يبطء من تفاعلات البروتين البوليفينول.