HAL
open science

Action antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques dans des milieux modèles et des émulsions riches en lipides insaturés

Aurélia Pernin

To cite this version:

Aurélia Pernin. Action antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques dans des milieux modèles et des émulsions riches en lipides insaturés. Génie des procédés. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA033 . tel-02139084

HAL Id: tel-02139084

https://theses.hal.science/tel-02139084v1

Submitted on 24 May 2019

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.

NNT : 2018SACLA033

Action antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques dans des milieux modèles et des émulsions riches en lipides insaturés

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech
(Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement)

École doctorale n°581 – Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Génie des aliments

Thèse présentée et soutenue à Massy le **20 décembre 2018**

par **Aurélia PERNIN**

Composition du Jury :

Jean-Christophe AUGUSTIN Professeur ENVA	Président
Maria FIGUEROA Maître de Conférences – HDR Montpellier SupAgro (UMR IATE)	Rapporteure
Nadia OULAHAL Maître de Conférences – HDR Université C. Bernard Lyon 1 (EA BioDyMIA)	Rapporteure
Claire DUFOUR Chargée de Recherche – HDR INRA (UMR SQPOV)	Examinatrice
Marie-Noëlle MAILLARD Professeure AgroParisTech (UMR GENIAL)	Directrice de thèse
Florence DUBOIS-BRISSONNET Professeure AgroParisTech (Institut MICALIS)	Co-Directrice de thèse

UMR Ingénierie Procédés Aliments (GENIAL)
(AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay)
1 avenue des Olympiades, 91300, Massy, France

Institut Micalis
(INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay)
Domaine de Vilvert, 78350, Jouy-en-Josas, France

Thèse de doctorat

Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'équipe CAliPro au sein de l'UMR Ingénierie Procédés Aliments (UMR GENIAL, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay) et dans l'équipe B2HM au sein de l'Institut Micalis (INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay). Il a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Il a donné lieu aux publications suivantes :

Articles dans des revues à comité de lecture

Pernin, A., Dubois-Brissonnet, F., Roux, S., Masson, M., Bosc, V., Maillard, M.N. Phenolic compounds can delay the oxidation of polyunsaturated fatty acids and the growth of *Listeria monocytogenes*: structure-activity relationships. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **2018**, 98:5401-5408.

Pernin, A., Guillier, L., Dubois-Brissonnet, F. Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: Deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiology,* **2019**, 80:18-24.

Pernin, A., Bosc, V., Soto, P., Le Roux, E., Maillard, M.N. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions rich in omega-3: effect of aqueous phase viscosity, emulsifiers, and antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology,* **2019**, accepté pour publication.

Pernin, A., Bosc, V., Maillard, M.N., Dubois-Brissonnet, F. Ferulic acid and eugenol have different abilities to maintain their inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in emulsified systems. *Frontiers in Microbiology,* **2019**, 10:137.

Communications dans des congrès internationaux avec comité de lecture

Communications orales

Pernin, A., Roux, S., Bosc, V., Maillard, M.N., Dubois-Brissonnet, F. Phenolic compounds from agro-industrial by-products could be valued as antimicrobials: influence of their chemical structure on their efficiency to inhibit *Listeria monocytogenes* growth. ***4th International ISEKI-Food, PhD Workshop, 6-8 July 2016, Vienna, Austria***. *Premier prix du concours de communication orale.*

Pernin, A., Bosc, V., Soto, P., Le Roux, E., Dubois-Brissonnet, F., Maillard, M.N. Effect on lipid oxidation and microbial growth of bulk and interfacial composition in rich omega-3 oil-in-water emulsions. ***2nd International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants, EuroFedLipid, 4-6 June 2018, Graz, Austria***.

Communications par posters

Pernin, A., Dubois-Brissonnet, F., Roux, S., Maillard, M.N. Phenolic compounds can be valued for their dual antioxidant and antimicrobial potential: structure-activity relationships. ***28th International Conference on Polyphenols, 11-15 July 2016, Vienna, Austria***.
Premier prix du concours de communication par poster.

Pernin, A., Bosc, V., Truong, D., Sous, C., Maillard, M.N., Dubois-Brissonnet, F. Are antimicrobial phenolic compounds still efficient to limit *Listeria monocytogenes* growth in emulsified systems? ***5th ISEKI-Food Conference, 2-5 July 2018, Stuttgart, Germany***.

Pernin, A., Guillier, L., Dubois-Brissonnet, F. Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: deciphering mechanisms of action using three different models. ***5th ISEKI-Food Conference, 2-5 July 2018, Stuttgart, Germany***.

Pernin, A., Guillier, L., Bosc, V., Maillard, M.N., Dubois-Brissonnet, F. Could ferulic acid be an efficient natural antimicrobial against *Listeria monocytogenes* in model food systems? ***26th International ICFMH Conference – Food Micro – 3-6 September 2018, Berlin, Germany.***

Communications dans des journées scientifiques

Communications orales

Pernin, A., Roux, S., Maillard, M.N., Dubois-Brissonnet, F. Les composés phénoliques peuvent être valorisés pour leur double activité antioxydante et antimicrobienne : relations structure/activité. ***Journée des Doctorants de l'UMR Ingénierie Procédés Aliments, 25 novembre 2016, Massy, France***.

Pernin, A., Maillard, M.N., Dubois-Brissonnet, F. Antioxidant and antimicrobial activities of phenolic compounds in food systems rich in omega-3 fatty acids. ***Doctoral Days of ABIES Doctoral School, 26-27 April 2017, Paris, France***.

Pernin, A., Maillard, M.N., Dubois-Brissonnet, F. The use of phenolic compounds to limit both lipid oxidation and *Listeria monocytogenes* growth in emulsion: the case of eugenol and ferulic acid. ***Séminaire de l'Institut Micalis, 20 octobre 2017, Jouy-en-Josas, France***.

Communications par posters

Pernin, A.; Dubois-Brissonnet, F.; Roux, S.; Maillard, M.N. Phenolic compounds can be valued for their dual antioxidant and antimicrobial potential: structure-activity relationships.
Journée des Doctorants de l'UMR Ingénierie Procédés Aliments, 25 novembre 2016, Massy, France.

Remerciements

A l'issue de ces trois années de travail, c'est avec beaucoup d'émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. En particulier :

Marie-Noëlle MAILLARD, Professeure à AgroParisTech et directrice de thèse pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse, pour son encadrement tout au long de ce travail, pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances en biochimie et de sa riche expérience, pour m'avoir motivée à dépasser mes limites, pour sa disponibilité, son soutien et sa bienveillance.

Florence DUBOIS-BRISSONNET, Professeure à AgroParisTech et co-directrice de thèse pour son encadrement tout au long de ce travail, pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances en microbiologie, pour les discussions fructueuses, pour m'avoir donné confiance en moi, pour sa disponibilité, son écoute et son soutien.

Véronique BOSC, Maître de Conférences à AgroParisTech, pour son encadrement lors de cette thèse, pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances et de son expérience lors de la formulation des émulsions ainsi qu'en rhéologie, pour ses analyses perspicaces et ses critiques constructives vis-à-vis de ce travail, mais également pour sa gentillesse et son soutien.

Stéphanie ROUX, Maître de Conférences à AgroParisTech, pour son encadrement, pour sa participation aux comités de thèse, pour avoir apporté un regard éclairé sur ce travail lors des réunions et pour ces échanges agréables.

Maria FIGUEROA, Maître de Conférences à Montpellier SupAgro et Nadia OULAHAL, Maître de conférences à l'Université Lyon 1, pour l'honneur qu'elles me font en acceptant d'être rapporteures de cette thèse.

Claire DUFOUR, Chargée de Recherche à l'INRA d'Avignon et Jean-Christophe AUGUSTIN, Professeur à l'ENVA pour l'intérêt qu'ils me font en acceptant d'examiner ce travail.

Lionel MUNIGLIA, Maître de Conférences à l'ENSAIA-Université de Lorraine, Christophe NGUYEN-THE, Directeur de Recherche à l'INRA d'Avignon et Bertrand BROYART, Professeur à AgroParisTech, d'avoir accepté de participer à mon comité de thèse. Je les remercie particulièrement pour leurs remarques toujours constructives.

Irina VASSILIEVA et Alexandre PERY, de l'Ecole Doctorale ABIES pour leur aide administrative et pour m'avoir donné l'opportunité d'organiser les Journées des Doctorants ABIES.

Laurent GUILLIER, Ingénieur de Recherche à l'ANSES, pour son investissement lors de notre collaboration sur le développement de modèles sur l'activité antimicrobienne et pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances en modélisation.

Marine MASSON, Maître de Conférences à AgroParisTech, pour l'aide qu'elle m'a apportée lors du traitement statistique des données en première partie de thèse.

Paola SOTO, Ingénieure d'Etude à AgroParisTech, pour son travail et son investissement, sa participation active à mes travaux de thèse lors des expérimentations liées à l'oxydation des lipides, pour m'avoir formée au laboratoire, pour son aide technique, sa disponibilité, son soutien, sa gentillesse, et pour tous ces bons moments partagés.

Even LE ROUX, Technicien de Recherche à l'INRA, pour sa participation et son investissement dans ce travail de thèse notamment lors de la mise en évidence des produits d'oxydation des composés, pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances techniques et de son expérience au laboratoire, pour son soutien, et pour tous ces moments de rigolade.

Pablo GRANDA, Ingénieur d'Etude à AgroParisTech et Brigitte DEAU, Technicienne de Formation et de Recherche à AgroParisTech, pour leur aide technique et leur sympathie lors de mes passages au laboratoire SP2.

Julien DESCHAMPS, Technicien de Recherche à l'INRA, pour la formation dispensée au laboratoire en microbiologie et surtout celle au microscope confocal à balayage laser, pour sa patience et sa sympathie.

Delphine TRUONG et Camille SOUS, stagiaires de Master 1 et Grégoire DUFOUR, stagiaire Ingénieur 2A pour avoir participé à mes travaux de thèse, pour leur investissement et leur motivation. J'ai particulièrement apprécié ces premières expériences d'encadrement.

Tous les autres membres de l'équipe CAliPro : Nicolas DESCHARLES, pour son aide technique en GC-MS, son soutien et sa sympathie ; Séverine KELLER, pour sa gentillesse et son soutien ; Emmanuel BERNUAU pour ses conseils notamment en statistiques ; Catherine BONAZZI, Aline BOUSSARD, Julien CARTAILLER, Marie-Elisabeth CUVELIER, Martine ESTEBAN-DECLOUX, Pierre GIAMPAOLI, Daniel GOUJOT, Barbara REGA et Colette WONG pour leur accueil au sein de l'équipe, pour leur soutien et pour m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions. J'ai également une pensée pour Richard ROCCA.

Tous les autres membres de l'équipe B2HM et particulièrement Romain BRIANDET, pour son accueil au sein de l'équipe, sa bonne humeur et ses conseils bienveillants vis-à-vis de mon travail ; Maud DARSONVAL, Charlène LENEVEU-JANVRIN et Marina GREGOIRE.

Les doctorants et stagiaires actuels ou anciens des différentes équipes et particulièrement : Céline MONES, Adrien FORESTIER, Grégoire DELAPORTE, Pierre AWAD, Jeehyun LEE, Marion GAFF, Miguel DE FIGUEIREDO, Thibaut VINE, Marine MOUSSIER, Adrien

DOUADY, Josselin BOUSQUIERES, Samia ALMOUGHRABIE, Mayela CEPEDA-VASQUEZ, Cristian PUENTES, Benoît BASSE et Mathieu MARECHAL pour tous ces bons moments partagés ensemble, pour leur soutien et leur bonne humeur.

Mes amis et en particulier : Noémie PERIGAUD, Olivia POINTURIER, Solène SACRE, Morgane COURNARIE, Annabelle REVEL-MOUROZ, Leslie SAINT-MARC, Benoît TARASCONI, Thomas DUTERTRE, Léa VERDIER, pour leur soutien depuis maintenant plusieurs années.

Mes parents Eve et Marc PERNIN pour m'avoir toujours soutenue et encouragée dans toutes les étapes de ma vie, pour avoir toujours cru en moi, c'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui ; ma sœur Marion PERNIN, pour avoir toujours été à mes côtés, pour son soutien et ses encouragements, son humour et sa gentillesse.

Alexandre TROUCHE, pour son soutien inconditionnel, pour son réconfort dans les moments de doutes, pour me donner confiance en moi, pour croire en moi, et de faire tout son possible pour rendre chacune de mes journées un peu plus belle.

Sommaire

Liste des figures et tableaux _____ *E*

Abréviations _____ *J*

Introduction générale _____ *1*

Chapitre I – Etude bibliographique _____ *7*

I.1. LE ROLE ANTIOXYDANT DES COMPOSES PHENOLIQUES VIS-A-VIS DE L'OXYDATION DES LIPIDES _____ **8**

I.1.1. Les mécanismes d'oxydation des lipides **8**

I.1.2. Les mécanismes d'action antioxydants des composés phénoliques **13**

I.1.2.1. Les antioxydants primaires ou antiradicalaires **13**

I.1.2.2. Les antioxydants secondaires ou préventifs **17**

I.1.2.3. Efficacité antioxydante des composés phénoliques **18**

I.1.2.3.1. Efficacité antioxydante dans des huiles et des émulsions 18

I.1.2.3.2. Efficacité antioxydante dans des milieux modèles 20

I.1.3. L'oxydation des lipides et sa maîtrise en émulsion **23**

I.1.3.1. Rappel sur les émulsions alimentaires et les voies de stabilisation **23**

I.1.3.2. Paramètres influençant l'oxydation des lipides en émulsion **29**

I.1.3.2.1. Les sites de réaction dans un système émulsionné 30

I.1.3.2.2. Les conséquences sur la solubilité et la charge des constituants du pH de la phase aqueuse 30

I.1.3.2.3. L'influence de la surface de l'interface 31

I.1.3.2.4. L'influence de la nature et de la charge des émulsifiants 32

I.1.3.2.5. Le rôle des émulsifiants non adsorbés à l'interface 33

I.1.3.3. Paramètres influençant l'activité des antioxydants en émulsion **34**

I.1.3.3.1. L'influence de la localisation des antioxydants dans l'émulsion et sur leur réactivité et leur efficacité 34

I.1.3.3.2. L'influence des émulsifiants sur l'efficacité des antioxydants 37

I.2. LE ROLE ANTIMICROBIEN DES COMPOSES PHENOLIQUES VIS-A-VIS DU DEVELOPPEMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* _____ **39**

I.2.1. Présentation de *L. monocytogenes* **39**

I.2.2. Maîtrise de la croissance de *L. monocytogenes* **42**

I.2.2.1. Evaluation de la croissance et modèles primaires **42**

I.2.2.1.1. Les principales phases de la croissance microbienne 42

I.2.2.1.2. Les méthodes d'évaluation de la croissance microbienne 43

I.2.2.1.2.1. Le dénombrement en milieu gélosé *43*

I.2.2.1.2.2. La densité optique (DO) *43*

I.2.2.1.3. Les modèles primaires de croissance 44

I.2.2.2. Facteurs de maitrise de la croissance et modèles secondaires **45**

I.2.2.2.1. Exemple de quatre principaux facteurs de maitrise 46

I.2.2.2.1.1. La température *46*

I.2.2.2.1.2. Le pH *46*

I.2.2.2.1.3. L'activité de l'eau *48*

I.2.2.2.1.4. Les conservateurs *49*

I.2.2.2.2. Les modèles secondaires pour déterminer le taux de croissance 50

I.2.3. L'activité antimicrobienne des composés phénoliques **53**

I.2.3.1. Mécanismes d'action antimicrobiens des composés phénoliques **53**

I.2.3.1.1. Intercalation dans la membrane bactérienne 53

I.2.3.1.2. Pénétration des composés phénoliques jusqu'au cytoplasme 55
I.2.3.1.2.1. Acidification du cytoplasme *55*
I.2.3.1.2.2. Perturbation du métabolisme *56*
I.2.3.1.3. Autres effets indirects des composés phénoliques 57
I.2.3.1.3.1. Chélation des métaux *57*
I.2.3.1.3.2. Atténuation de la virulence bactérienne *57*
I.2.3.2. Efficacité antimicrobienne des composés phénoliques 58
I.2.3.3. Facteurs interférant dans les aliments 60
I.2.3.3.1. Influence de la structuration des aliments sur le développement bactérien 60
I.2.3.3.2. Interférences de la structuration des aliments sur l'activité de composés antimicrobiens 62

Chapitre II – Action antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques en milieux modèles _____65

II.1. INTRODUCTION _____ 66

II.2. ARTICLE 1 – "PHENOLIC COMPOUNDS CAN DELAY THE OXIDATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND THE GROWTH OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS" _____ 68
II.2.1. Abstract and keywords 68
II.2.2. Introduction 69
II.2.3. Materials and methods 70
II.2.3.1. Chemical reagents 70
II.2.3.2. Bacterial strain and growth conditions 70
II.2.3.3. Phenolic compounds 70
II.2.3.4. Evaluation of antioxidant activity 71
II.2.3.5. Evaluation of antibacterial activity 73
II.2.4. Results and discussion 74
II.2.4.1. Characterization of antioxidant behavior 74
II.2.4.2. Characterization of the antibacterial behavior 78
II.2.4.3. Structure-activity relationships 81
II.2.5. Conclusions 83

II.3. ARTICLE 2 – "INHIBITORY ACTIVITY OF PHENOLIC ACIDS AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES*: DECIPHERING THE MECHANISMS OF ACTION USING THREE DIFFERENT MODELS" _____ 84
II.3.1. Abstract and keywords 84
II.3.2. Introduction 85
II.3.3. Materials and methods 86
II.3.2.1. Chemical reagents 86
II.3.2.2. Bacterial strain 86
II.3.2.3. Phenolic compounds 86
II.3.2.4. Growth in the presence of phenolic compounds at various pHs 87
II.3.2.5. Determination of the growth rate 88
II.3.2.6. Modelling the effect of different acid forms on the growth rate 88
II.3.2.7. Statistical approach 90
II.3.4. Results and Discussion 90
II.3.4.1. Characterization of the models 90
II.3.4.2. Hypothesis on the antimicrobial mechanism based on the best-fitting model 94
II.3.4.2.1. Decreasing extracellular pH: the main antimicrobial mechanism of action for chlorogenic and gallic acids 94
II.3.4.2.2. The antimicrobial effect of the undissociated forms: the main antimicrobial mechanism of action for caffeic, vanillic, protocatechuic and p-hydroxybenzoic acids 96
II.3.4.2.3. Phenolic acids with a dissociated form that is significantly antimicrobial 97
II.3.5. Conclusion 98

II.4. POINTS A RETENIR _____ 100

Chapitre III – Action antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques en émulsions riches en lipides insaturés _____ *103*

III.1. INTRODUCTION _____ **104**

III.2. ARTICLE 3 – "LIPID OXIDATION IN OIL-IN-WATER EMULSIONS RICH IN OMEGA-3: EFFECT OF AQUEOUS PHASE VISCOSITY, EMULSIFIERS, AND ANTIOXIDANTS" _____ **108**

III.2.1. Abstract and keywords **108**
III.2.2. Introduction **109**
III.2.3. Materials and methods **111**
III.2.3.1. Materials **111**
III.2.3.2. Methods **112**
III.2.3.2.1. Preparation of the emulsions and storage conditions 113
III.2.3.2.1.1. Preparation of the aqueous phases of the emulsions *113*
III.2.3.2.1.2. Preparation of the lipid phases of the emulsions *114*
III.2.3.2.1.3. Emulsification procedure *114*
III.2.3.2.1.4. Storage and ageing conditions *115*
III.2.3.2.2. Determination of the physico-chemical and oxidation markers of emulsions during storage 115
III.2.3.2.2.1. Measurement of the oxygen partial pressure in the headspace and bulk emulsion *115*
III.2.3.2.2.2. Extraction of the lipid phase from the emulsions *116*
III.2.3.2.2.3. Determination of hydroperoxides concentration *116*
III.2.3.2.2.4. Determination of aldehydes concentration *117*
III.2.3.2.2.5. Determination of the fatty acid profile by GC-MS *117*
III.2.3.2.2.6. Determination of antioxidants concentration in the lipid phase by HPLC-DAD-Fluorimetry *118*
III.2.3.2.2.7. Identification of some oxidation products of α-tocopherol by UHPLC-PDA-MS *119*
III.2.3.2.2.8. Particle size measurement *119*
III.2.3.2.2.9. Evaluation of viscosity *119*
III.2.3.2.2.10. Measurement of surface tension *120*
III.2.3.3. Statistical analysis **120**
III.2.4. Results and discussion **121**
III.2.4.1. Impact of the viscosity of the aqueous continuous phase on lipid oxidation **122**
III.2.4.2. Impact of emulsifier type on lipid oxidation **124**
III.2.4.3. Impact of antioxidants on lipid oxidation **126**
III.2.5. Conclusion **130**

III.3. ARTICLE 4 – "FERULIC ACID AND EUGENOL HAVE DIFFERENT ABILITIES TO MAINTAIN THEIR INHIBITORY ACTIVITY AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN EMULSIFIED SYSTEMS" _____ **132**

III.3.1. Abstract and keywords **132**
III.3.2. Introduction **133**
III.3.3. Materials and Methods **134**
III.3.3.1. Bacterial strain and subculture conditions **134**
III.3.3.2. Phenolic compounds and other chemicals **134**
III.3.3.3. Aqueous phases for emulsion preparation **135**
III.3.3.4. Determination of the minimum inhibitory concentration of ferulic acid and eugenol in aqueous phases **135**
III.3.3.5. Preparation of emulsions **136**
III.3.3.6. Bacterial kinetics in emulsions and corresponding aqueous phases **138**
III.3.3.7. Statistical analysis **138**
III.3.4. Results **139**
III.3.4.1. MICs of eugenol and ferulic acid in aqueous phases **139**
III.3.4.2. Inhibitory activity of eugenol and ferulic acid in emulsions and their corresponding aqueous phases **140**

III.3.5. Discussion 143
III.3.5.1. Effect of emulsifiers on inhibitory activity of phenolic compounds in aqueous phases 143
III.3.5.2. Effect of the presence of oil droplets on the inhibitory activity of phenolic compounds 145
III.3.6. Conclusion 147
III.4. POINTS A RETENIR 148
Discussion générale & perspectives 151
Références bibliographiques 159

Liste des figures et tableaux

Introduction générale

Figure 0.1. *Structures chimiques de quelques composés phénoliques*

Chapitre I

Figure I.1. *Structures chimiques de quelques acides gras*

Figure I.2. *Représentation schématique des principales réactions d'oxydation des lipides rencontrées dans les aliments (Cuvelier & Maillard 2012)*

Figure I.3. *Mécanisme de formation des 9-, 12-, 13- et 16- mono-hydroperoxydes par auto-oxydation à partir de l'acide α-linolénique (Frankel 1998; Roman 2012)*

Figure I.4. *Stabilisation du radical phénoxyle par mésomérie (d'après Berset (2006))*

Figure I.5. *Représentation schématique des cinétiques d'oxydation des lipides en présence ou en absence d'antioxydants (Laguerre et al. 2007)*

Figure I.6. *Structures chimiques de la (+)-catéchine (gauche) et de la (-)-épicatéchine (droite)*

Figure I.7. *Sites potentiels de chélation des métaux chez les flavonoïdes (Leopoldini et al. 2011)*

Figure I.8. *Proposition de mécanisme d'action des tocophérols d'après Tappel (1972) (Berset 2006)*

Figure I.9. *Proposition de mécanisme réactionnel entre l'α-tocophérol et les radicaux peroxyles, ainsi que les différents produits d'oxydation identifiés: α-tocophérolquinone, 4a,5-epoxy-α-tocophérolquinone, 7,8-epoxy-α-tocophérolquinone (Tavadyan et al. 2007)*

Figure I.10. *Proposition de mécanisme réactionnel entre l'acide carnosique et les radicaux peroxyles (adapté de Masuda et al. 2001)*

Figure I.11. *Proposition de mécanisme réactionnel entre l'eugénol et le radical DPPH$^{\bullet}$ (Bondet et al. 1997)*

Figure I.12. *Illustration de plusieurs phénomènes de déstabilisation d'une émulsion au regard de la distribution des gouttelettes lipidiques : (a) émulsion stable, (b) crémage sans agrégation des gouttelettes, (c) formation d'un réseau connecté d'agrégats de gouttelettes. Les lignes pointillés et flèches indiquent la position de la limite visible entre les deux phases et son évolution dans le temps (van Aken 2006)*

Figure I.13. *Structure chimique du Tween 80 (Mahmood & Al-koofee 2013)*

Figure I.14. *Représentation schématique du positionnement de quelques émulsifiants à l'interface d'une gouttelette lipidique (Hasenhuettl & Hartel 2008)*

Figure I.15. *Représentation schématique de l'organisation des polysaccharides en solution en fonction de la concentration C, illustrant la transition de l'état dit « dilué » à l'état « concentré » (van Aken 2006)*

Figure I.16. *Structure de la gomme de guar E412 (EFSA ANS Panel et al. 2017)*

Figure I.17. *Représentation schématique des principaux compartiments et composants d'une émulsion h/e ainsi que les différentes gammes de tailles de particules (Berton-Carabin et al. 2014)*

Figure I.18. *Cinétique de formation du propanal (mmol/kg d'huile), produit d'oxydation des lipides, dans une huile d'algue en phase continue ou émulsifiée en présence de Tween 20 (Decker et al. 2017)*

Figure I.19 *Proposition de représentation schématique des mécanismes d'oxydation des lipides dans une émulsion h/e (Decker et al. 2017)*

Figure I.20. *Evolution de l'oxydation des lipides par suivi de la consommation en oxygène dans des émulsions à base d'huile de colza stabilisées par différents émulsifiants (A-caseine β, B-Tween 20) (Berton et al. 2011a; Berton-Carabin et al. 2014)*

Figure I.21. *Proposition de représentation schématique de la distribution des antioxydants dans un système émulsifié (Laguerre et al. 2015)*

Figure I.22. *Listeria monocytogenes au Microscope Electronique à Balayage (Micalis, Plateforme Mima2, F. Dubois-Brissonnet/ T. Meylheuc)*

Figure I.23. *Prévalence et distribution des clones MLST dans les échantillons alimentaires et cliniques (Maury et al. 2016)*

Figure I.24. *Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases (Delhalle et al. 2012)*

Figure I.25. *Evolution du taux de croissance (μ_{max}) en fonction de la température chez L. monocytogenes (extraction des données de la base internet ComBase) (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017)*

Figure I.26. *Evolution du taux de croissance (μ_{max}) en fonction du pH. Exemple de L. monocytogenes. Données de Le Marc et al. 2002 (ronds) et extraites de la base de données ComBase (carrés) (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017)*

Figure I.27. *Mode d'action des acides faibles et importance de la forme non dissociée (Lambert & Stratford 1999)*

Figure I.28. *Surface de réponse du taux de croissance de L. monocytogenes dans du saumon contenant 0 à 8% de sel et 0 à 34 ppm de composés phénoliques à 4°C (Hwang 2007)*

Figure I.29. *Influence de la température et du pH sur le modèle cardinal (Rosso et al. 1995)*

Figure I.30. *Application du modèle de Lambert et Pearson à des données de taux de croissance de L. monocytogenes obtenues dans le cadre de cette thèse pour déterminer la CNI (concentration non inhibitrice, NIC en anglais) et la CMI (concentration minimale inhibitrice, MIC en anglais) de l'acide p-hydroxybenzoïque*

Figure I.31. *Représentation schématique montrant les différents environnements possibles de croissance bactérienne dans un échantillon de fromage : les bactéries planctoniques en phase aqueuse et les colonies bactériennes dans la phase gélifiée (Parker et al. 1998; Wilson 2002)*

Figure I.32. *Représentation schématique montrant les différentes hypothèses expliquant une efficacité plus importante des antimicrobiens dans des émulsions à plus grand diamètre de gouttelettes (Terjung et al. 2012)*

Tableau I.1. *Valeurs cardinales de croissance de Listeria monocytogenes pour quelques facteurs environnementaux (Piveteau 2017)*

Tableau I.2. *Principaux modèles primaires déterministes de croissance (Guillier et al. 2017)*

Chapitre II

Figure II.1. *Chemical structures of the studied phenolic compounds*

Figure II.2. *Kinetics of linoleic acid oxidation in an AAPH system (followed by conjugated dienes measurement) in the presence of various concentrations of antioxidants with three different behaviors: kaempferol, representative of chain breakers (a), vanillic acid, representative of retarders (b), and protocatechuic acid, representative of compounds with an intermediate behavior (c)*

Figure II.3. *Effect of increasing concentrations of phenolic compounds on the growth of L. monocytogenes (data fitted with the Lambert-Pearson model) and broth pH*

Figure II.4. *Representation of the predicted μ_{max} as a function of the observed μ_{max} for the eight phenolic acids and their best fitting models (#3 for ferulic and p-coumaric acids, #2 for the others)*

Figure II.5. *Fitted complete model #3 with an example of the partial dataset of ferulic acid at pH 7.3 (a) and at pH 5.6 (b) and associated table of gammas for the undissociated form, dissociated form and pH (c)*

Figure II.6. *L. monocytogenes growth rates (a) as a function of pH in the presence of various concentrations of chlorogenic and gallic acids compared to those at different pHs adjusted with hydrochloric acid and (b) as a function of concentrations of chlorogenic and gallic acids at pH 5.5a*

Figure II.7. *L. monocytogenes growth rates as a function of concentration of undissociated acid at pH 5.5, for four phenolic acids with the best fitting model #2*

Figure II.8. *Schematic representation of phenolic acid classification into three categories depending on different antimicrobial factors involved in bacterial growth inhibition*

Table II.1. *Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds: effective concentration to delay oxidation and non-inhibitory and minimum inhibitory concentrations for L. monocytogenes*

Table II.2. *Chemical structures and physico-chemical parameters of the eight studied phenolic acids*

Table II.3. *Estimated parameters and BIC for the three models and the eight phenolic acids*

Chapitre III

Figure III.0. *Représentation schématique des émulsions étudiées avec différents paramètres de formulation et de structure*

Figure III.1. *Effect of the viscosity of the aqueous phase by the addition of guar gum at 0, 0.3, or 0.6% (w/w) on lipid oxidation of o/w emulsions and biphasic systems during storage at 25°C: evolution of lipidic hydroperoxides (a), aldehydes (b), oxygen partial pressure in the HS (c), oxygen partial pressure in the B (d) in O/W_WP-C, O/W_WP-g3, O/W_WP-g6, and evolution of the oxygen partial pressure in biphasic systems (O+W_WP-C and O+W_WP-g6) with distinct measurements in oil (O) and water (W) (e)*

Figure III.2. *Effect of the nature of emulsifier on lipid oxidation of o/w emulsions, biphasic systems, and oils during storage at 25°C: evolution of lipidic hydroperoxides (a), aldehydes (b), oxygen partial pressure in the HS (c), oxygen partial pressure in the B (d) in O/W_WP-C and O/W_T80-C; evolution of the oxygen partial pressure in biphasic systems (O+W_WP-C and O+W_T80-C) with distinct measurements in oil (O) and water (W) (e); evolution of oxygen partial pressure in oil ± T80 with distinct measurements in headspace (HS) and bulk (B) (f)*

Figure III.3. *Effect of antioxidants on lipid oxidation of o/w emulsions formulated with whey proteins during storage at 25°C: evolution of lipidic hydroperoxides (a), aldehydes (b), oxygen partial pressure in the HS (c), oxygen partial pressure in the B (d), antioxidants (e) in O/W_WP-C, O/W_WP-F, O/W_WP-T, O/W_WP-E, and O/W_WP-T+E*

Figure III.4. *Effect of antioxidants on lipid oxidation of o/w emulsions formulated with Tween 80 during storage at 25°C: evolution of lipidic hydroperoxides (a), aldehydes (b), oxygen partial pressure in the HS (c), oxygen partial pressure in the B (d), antioxidants (e) in O/W_T80-C, O/W_T80-T, and O/W_T80-E*

Figure III.5. *UHPLC-PDA-MS chromatograms of a methanolic extract from the lipid phase of the emulsion O/W_T80-T, after 0 (a) and 12 (b) days of storage at 25°C, at different m/z corresponding to α-tocopherol, α-tocopherolquinone, 7,8-epoxy-α-tocopherolquinone, and 4,5-epoxy-α-tocopherolquinone*

Figure III.6. *Chemical structures of eugenol (a) and ferulic acid (b)*

Figure III.7. *L. monocytogenes growth rates as a function of the concentrations of eugenol (a) or ferulic acid (b) in different aqueous systems (data fitted with the Lambert and Pearson model)*

Figure III.8. *Growth curves of L. monocytogenes in different aqueous and emulsified systems in the presence of eugenol or ferulic acid: aqueous system (a) and emulsion (b) formulated with Tween 80 at pH 7.2 with or without eugenol (16 mmol/L); aqueous system (c) and emulsion (d) formulated with whey proteins at pH 7.2 with or without eugenol (10 mmol/L); aqueous system (e) and emulsion (f) formulated with Tween 80 at pH 5.5 with or without ferulic acid (5.5 mmol/L). Growth curves were fitted using the Gompertz model until 40 h (until the bacterial counts decreased)*

Figure III.9. *Schematic representation of the hypothesis for the partition of eugenol and ferulic acid in the different phases in aqueous and emulsified systems*

Figure III.10. *Représentation schématique des principales hypothèses expliquant les résultats acquis concernant les activités i) antioxydante des composés en émulsion: localisation (a), compétition pour l'interface (b), interaction avec les émulsifiants (c) et ii) antimicrobienne : interaction avec les émulsifiants en phase aqueuse (d), localisation en émulsion (e)*

Table III.1. *Overview of the various systems studied*

Table III.2. *Droplet-size distribution of all emulsified systems after various storage times expressed as the volume median diameter d(v0.5)*

Table III.3. *Evaluation of the viscosity of emulsions formulated with whey proteins and various levels of guar gum at a shear stress of 12 s^{-1} and evaluation of the parameters of the Power law model*

Table III.4. *Overview of the emulsified systems used in this study and corresponding aqueous phases*

Table III.5. *L. monocytogenes growth rates (μ_{max}), in different aqueous systems without phenolic compounds, determined using the Gompertz model and the non-inhibitory concentration (NIC) and minimal inhibitory concentration (MIC) of eugenol and ferulic acid, determined using the Lambert and Pearson model*

Table III.6. *L. monocytogenes growth rates (μ_{max}) determined using the Gompertz model in different aqueous and emulsified systems, with or without phenolic compounds*

Abréviations

	Anglais	Français
η	viscosity	viscosité
μ_{max}	growth rate	taux de croissance
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dichloride	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dichloride
AGMI	-	acide gras monoinsaturé
AGPI	-	acide gras polyinsaturé
AGS	-	acide gras saturé
AH	antioxidant	-
ANCOVA	analysis of covariance	-
ANOVA	analysis of variance	-
AOH	-	antioxydant
A_d	concentration of the dissociated form of the acid	-
A_{tot}	concentration of total acid	-
ATP	-	adénosine tri-phosphate
A_u	concentration of the undissociated form of the acid	-
a_w	-	activité de l'eau
B	bulk	-
BDE	bond dissociation energy	-
BHA	butylhydroxyanisol	butylhydroxyanisole
BHT	butylhydroxytoluene	butylhydroxytoluène
BIC	Boulton-Shwartz information criterion	-
CCL	critical chain length	-
CFU	colony forming unit	-
CMB	-	concentration minimale bactéricide
CMC	critical micellar concentration	concentration micellaire critique
CMI	-	concentration minimale inhibitrice
CNI	-	concentration non inhibitrice
DAD	diode array detector	-
DHA	docohexaenoic acid	acide docohexaénoïque
DO	-	densité optique
EC	efficient concentration	-
EOR	-	espèces oxygénées réactives
EPA	eicosapentaenoic acid	acide éicosapentaénoïque
d(v,0.5)	volume median diameter	-
GC	gas chromatography	-
HAT	hydrogen atom transfer	transfert d'un atome d'hydrogène
h/e	-	huile dans eau
HLB	hydrophilic-lipophilic balance	balance hydrophile/lipophile
HPLC	high pressure liquid chromatography	-
HS	headspace	-
$L^{\bullet}$	alkyl radical	radical alkyle
lag	-	phase de latence
LC	liquid chromatography	-
LCC	-	longueur de chaîne critique
LH	unsaturated fatty acid	acide gras insaturé
LLO	-	listériolysine O
$LO^{\bullet}$	alkoxyl radical	radical alkoxyle
logP	partition coefficient	coefficient de partage
$LOO^{\bullet}$	peroxyl radical	radical peroxyle
LOOH	hydroperoxide	hydroperoxyde
M	metal	métal
MIC	minimal inhibitory concentration	-
MIC_d	MIC of the dissociated form of the acid	-
MIC_u	MIC of the undissociated form of the acid	-
MS	mass spectrometry	-
MUFA	monounsaturated fatty acid	-

NIC	non inhibitory concentration	-
OD	optical density	-
o/w	oil-in-water	-
PDA	photo diode array detector	-
pI	isoelectric point	point isoélectrique
pO_2	oxygen partial pressure	pression partielle en oxygène
PUFA	polyunsaturated fatty acid	-
ROS	reactive oxygen species	-
SD	standard deviation	-
SFA	saturated fatty acid	-
SET	single electron transfer	transfert d'électron
T80	Tween 80	-
TBHQ	2-tertiobutyl-4-hydroxyquinone	2-tertiobutyl-4-hydroxyquinone
TSA	tryptone soy agar	-
TSB	trypic soy broth	-
UHPLC	ultra-high pressure liquid chromatography	-
UFA	unsaturated fatty acid	-
UFC	-	unité formant colonie
WP	whey proteins	-

Introduction générale

Les grands enjeux des systèmes alimentaires sont aujourd'hui de rendre accessible à tous une alimentation plus durable, plus saine et plus sûre. Pour y répondre, il est parfois nécessaire de faire évoluer tout ou une partie du système de production des aliments, depuis l'approvisionnement en matières premières, la formulation, les procédés et jusqu'aux méthodes de conservation du produit fini (FAO 2017). La qualité des aliments repose sur différentes composantes interdépendantes - nutritionnelle, organoleptique, sanitaire, environnementale - et il est donc nécessaire de prendre en compte celles-ci dans leur globalité afin de construire et de stabiliser les produits rénovés ou nouveaux. L'une des priorités actuelles est de **mettre en place des améliorations liées à la nutrition et la santé** : diminution des teneurs en sel, en sucres, en lipides ; meilleur équilibre des ratios acides gras saturés/monoinsaturés/polyinsaturés ou acides gras omega-6/omega-3 ; apports satisfaisants en protéines animales et protéines végétales... Ces modifications bénéfiques pour la santé peuvent avoir des conséquences sur un des autres volets de la qualité (FAO 2017). Par exemple, la baisse du taux de sel dans certains produits doit être compensée par la mise en place d'un moyen complémentaire pour préserver la qualité microbiologique des produits concernés. Un autre objectif fondamental aujourd'hui est l'**amélioration de la sécurité chimique**, notamment *via* la réduction ou la suppression d'additifs controversés dans les produits transformés. Par exemple, le retrait d'opacifiants nanoparticulaires dans certains produits nécessite un important travail de reformulation pour adapter l'aspect du produit, et donc sa qualité organoleptique. De même, la baisse du taux de nitrite dans certains produits ne doit pas compromettre leur sécurité microbiologique. Ainsi, la maîtrise de la qualité sur l'ensemble de ces composantes constitue un véritable défi dans le contexte complexe et constamment évolutif de la rénovation et de l'innovation alimentaire. Il devient alors nécessaire de rechercher des solutions efficaces pouvant faire appel à un ou plusieurs levier(s) tels que le choix de matières premières, ingrédients ou additifs, le choix de procédés et de conditions de transformation et enfin la mise en place de moyens de conservation avec, le cas échéant, des dates limites de consommation ajustées (FAO 2017).

Les constituants biochimiques apportés par les matières premières et/ou les ingrédients jouent un rôle clé sur les caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques des aliments, mais aussi sur les paramètres physico-chimiques qu'ils induisent et dont plusieurs ont un impact sur la conservation du produit (pH, activité de l'eau, etc.). A ces caractéristiques intrinsèques de l'aliment, il est possible d'ajouter des ingrédients ou additifs permettant d'améliorer une ou plusieurs composante(s) de la qualité. Les composés présentant des activités multiples, tels que

les composés phénoliques, sont donc particulièrement intéressants dans ce cadre. En effet, certains d'entre eux peuvent apporter aux aliments des propriétés organoleptiques (flaveur, couleur), antioxydantes, antifongiques et antibactériennes, ou des bénéfices liés à la santé des consommateurs (protection cardio-vasculaire, activités anti-cancérigène, anti-inflammatoire, oestrogénique, etc.) (Collin & Crouzet 2011). Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'activité antibactérienne (vis-à-vis de la croissance de la bactérie pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes*) et antioxydante (vis-à-vis de l'oxydation des lipides) des composés phénoliques.

Par définition, les composés phénoliques sont des molécules possédant au moins un cycle aromatique et portant au moins une fonction hydroxyle sur ce cycle (Macheix *et al.* 2006). Avec plus de 8000 composés répertoriés, ils constituent une très grande famille de molécules, uniquement synthétisées par les végétaux en tant de métabolites secondaires (Collin & Crouzet 2011). Ils se subdivisent en plusieurs familles qui dépendent de la complexité du squelette de base, des modifications de ce squelette et des possibles liaisons avec d'autres molécules. On y retrouve par exemple les acides phénoliques, les flavonoïdes et les phénols simples (***Figure 0.1***) (Berset 2006; Collin & Crouzet 2011). D'autres composés possédant également une fonction phénolique ne font pas partie *stricto sensu* de la famille des composés phénoliques telle que décrite précédemment mais y seront assimilés dans le cadre de la thèse. L'utilisation de ces composés pour leurs propriétés antimicrobienne et/ou antioxydante serait une opportunité de valorisation de co-produits issus d'agro-industries, celles-ci générant des quantités de déchets importantes. Les filières de transformation des produits céréaliers et notamment de la bière, de transformation des fruits et légumes et particulièrement des olives, d'élaboration de vins, de production d'épices et d'huiles essentielles seraient les premières concernées (Balasundram *et al.* 2006; Collin & Crouzet 2011; Tornuk *et al.* 2011). En effet, le son de blé, les peaux, graines, pépins et marcs de fruits et légumes, les feuilles des oliviers, les hydrosols d'huiles essentielles et les épices sont des sources très importantes de composés phénoliques appartenant à plusieurs familles (Balasundram *et al.* 2006; Collin & Crouzet 2011; Tornuk *et al.* 2011). De nombreuses études portent sur l'activité antioxydante ou antimicrobienne de ces composés phénoliques, mais peu comparent cette double activité sur une même série de molécules, pourtant intéressante pour rationnaliser l'utilisation des additifs. De plus, ces études sont menées la plupart du temps dans des systèmes modèles simplifiés et n'intègrent pas la complexité des milieux alimentaires. La problématique de cette thèse consiste

à **évaluer la double activité antioxydante et antimicrobienne dans des modèles complexes alimentaires et à mieux comprendre les mécanismes d'action associés.**

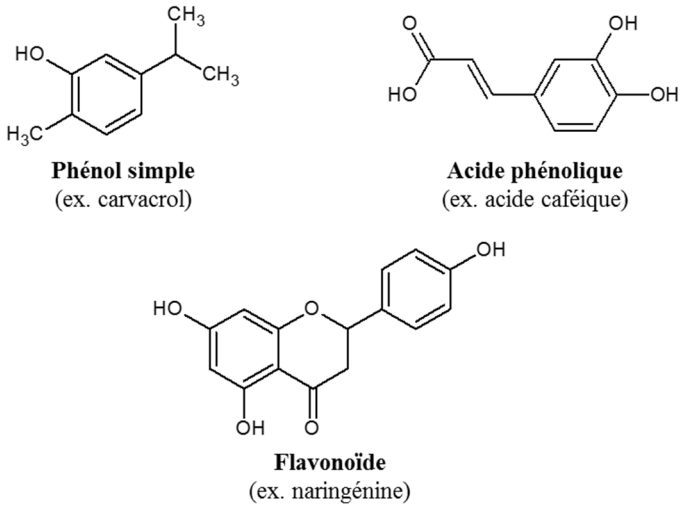


Figure 0.1. *Structures chimiques de quelques composés phénoliques*

Dans ce travail, l'activité antimicrobienne de composés phénoliques est étudiée vis-à-vis de la bactérie *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes,* responsable de la maladie appelée listériose, est la seule espèce de *Listeria* pathogène pour l'Homme. Bien que plus rare que les campylobactérioses ou les salmonelloses - maladies d'origine alimentaire les plus fréquentes dans l'UE (EFSA 2014b) - la listériose est souvent grave, avec des taux élevés d'hospitalisation et de mortalité (EFSA 2014a). Le nombre de listérioses humaines ne cesse d'augmenter en Europe : 1 645 cas en 2009 (EFSA & ECDC 2011) pour atteindre plus de 2536 cas et 247 décès en 2016 (EFSA & ECDC 2017). Bactérie ubiquitaire, *L. monocytogenes* peut contaminer les aliments à tous les stades de la chaîne alimentaire (Anses 2011), mais certains aliments sont à considérer en priorité comme les produits laitiers à base de lait cru, les aliments dits prêts à consommer ou encore les fruits et légumes (Anses 2011; Rodríguez-López *et al.* 2018). La surveillance de *L. monocytogenes* dans les aliments est assurée par les services officiels et les professionnels de la filière agro-alimentaire. Les critères de sécurité définis par le règlement européen (CE) n°2073/2005 et le règlement modificateur (CE) n° 1441/2007 (CE 2005; CE 2007) doivent être respectés et *L. monocytogenes* est la seule espèce bactérienne pathogène pour laquelle il existe une tolérance de 100 bactéries/g jusqu'à la date limite de consommation pour certaines denrées alimentaires. Il est donc particulièrement important de maîtriser sa croissance dans ces matrices alimentaires pendant leur conservation, d'autant que *L. monocytogenes* étant psychrotrophe, elle peut croître même aux températures de réfrigération

(température minimale : -2°C (Anses 2011)). Ainsi, des antimicrobiens comme les composés phénoliques peuvent être, entre autres facteurs, de bons moyens de maîtrise.

L'activité antioxydante des composés phénoliques, quant à elle, peut être utilisée pour lutter contre l'oxydation des lipides insaturés. En effet, depuis une dizaine d'années, les recommandations nutritionnelles ont conduit les industriels de l'agro-alimentaire à rééquilibrer les profils en acides gras des aliments : la proportion en acides gras saturés a ainsi diminué au profit des acides gras mono- et polyinsaturés (omega-3 en particulier) (INRA & ANSES 2013). Néanmoins, ces nouvelles formulations, justifiées sur le plan nutritionnel, ne sont pas sans conséquence sur la qualité des aliments. En effet, plus les acides gras possèdent un nombre important d'insaturations, plus ils sont susceptibles de s'oxyder au cours de la conservation des aliments. Ainsi, l'oxydation des produits est plus précoce et plus importante, conduisant à i) une diminution de leur qualité organoleptique par génération de composés volatils responsables de la rancidité (molécules directement issues de l'oxydation des acides gras insaturés et dont les notes sont spécifiques de l'acide gras initial) et par modification éventuelle de la couleur et de la texture des produits (réactions de co-oxydation), ii) une diminution de la qualité nutritionnelle par perte de nutriments (oxydation d'acides gras insaturés indispensables et co-oxydation de vitamines par exemple), et parfois iii) un risque chimique par génération de composés potentiellement toxiques pendant la cuisson (monomères cycliques, polymères, furanes, 4-hydroxynonénal) (Jacobsen *et al.* 2008; Cuvelier & Maillard 2012). Cette réactivité peut également être influencée par la structure des produits, celle-ci pouvant engendrer une organisation et une mobilité des molécules différentes selon les systèmes ainsi qu'une disponibilité variable de l'oxygène (Tikekar *et al.* 2011; Romsted & Bravo-Díaz 2013). Ainsi, il est particulièrement important de contrôler ces réactions d'oxydation, à la fois en mettant en œuvre des méthodes préventives telles que limiter le contact avec l'oxygène ou la lumière, mais aussi en tirant profit des propriétés de composés antioxydants naturellement présents dans les matières premières et les ingrédients, ou ajoutés en tant qu'additifs alimentaires (règlement européen (CE) n°1333/2008 (CE 2008)). Les composés phénoliques constituent pour cela de bons candidats.

Les problématiques de cette thèse ont été abordées à l'aide d'une démarche séquentielle. Tout d'abord, une étude approfondie de la littérature (**Chapitre I**) a permis d'**identifier les composés phénoliques présentant une double activité antioxydante et/ou antimicrobienne**, ainsi que les principaux mécanismes d'action mis en jeu.

Peu d'études décrivant la double activité de ces composés dans la littérature, la première étape de ce travail a été de quantifier les activités antioxydante et antimicrobienne d'une série de composés phénoliques dans des **milieux modèles** afin, d'une part, de sélectionner un petit nombre de composés présentant une double activité intéressante, et d'autre part de mettre en évidence les relations existant entre la structure chimique des composés et ces deux activités (**Chapitre II (II.2)**). Les mécanismes d'action antimicrobiens d'une des familles étudiées - les acides phénoliques - étant peu connus à ce jour, une attention particulière lui a été portée (**Chapitre II (II.3)**).

Très peu d'études existent dans la littérature sur la mise en œuvre conjointe des activités antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques dans des **milieux alimentaires complexes**. Le développement et la caractérisation de systèmes d'étude adaptés constituent donc une étape importante de ce travail (**Chapitre III**). Les milieux retenus sont des **émulsions**, choisies car s'apparentant à des systèmes réalistes et largement rencontrés en alimentaire, notamment dans le cas des sauces d'assaisonnement. Leur composition et leur structure ont été sélectionnées et contrôlées afin de mieux comprendre leur influence sur les activités observées. L'huile de poisson (thon) a été choisie comme phase lipidique en raison de sa richesse en lipides insaturés (dont omega-3) et donc de sa pertinence pour l'étude de l'activité antioxydante de composés phénoliques. Ces systèmes sont également intéressants pour étudier l'activité antimicrobienne car les sauces alimentaires peuvent entrer dans la composition d'aliments « prêts à consommer » sensibles vis-à-vis de *L. monocytogenes*.

L'activité antioxydante des trois composés phénoliques retenus à l'issue de l'étude en milieux modèles a donc ensuite été évaluée dans ces émulsions, formulées avec des protéines de lactosérum (émulsifiant fréquemment utilisé en alimentaire) ou du Tween 80 (émulsifiant de référence souvent utilisé dans les études disponibles dans la littérature), et parfois épaissies par l'ajout de gomme de guar (polysaccharide communément utilisé dans les produits de type sauce). Les mécanismes d'action antioxydants des composés phénoliques en émulsion sont explicités en fonction de la structuration de l'émulsion, avec une attention particulière portée au rôle de la composition de l'interface et des propriétés rhéologiques de la phase aqueuse sur l'oxydation des lipides (**Chapitre III (III.2)**). L'activité antimicrobienne des composés sélectionnés est également évaluée dans ces milieux émulsionnés et les mécanismes d'action antimicrobien sont explicités, avec une attention particulière portée à l'impact de la nature de l'émulsifiant sur l'activité antimicrobienne des composés (**Chapitre III (III.3)**).

Enfin, le bilan de ce travail et les perspectives associées sont discutés.

Chapitre I – Etude bibliographique

I.1. LE ROLE ANTIOXYDANT DES COMPOSES PHENOLIQUES VIS-A-VIS DE L'OXYDATION DES LIPIDES

I.1.1. Les mécanismes d'oxydation des lipides

Les lipides sont principalement présents dans les aliments sous forme de triglycérides et de phospholipides constitués d'acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) (***Figure I.1***). Les acides gras insaturés sont sensibles aux réactions d'oxydation (O'Keefe & Sarnoski 2017).

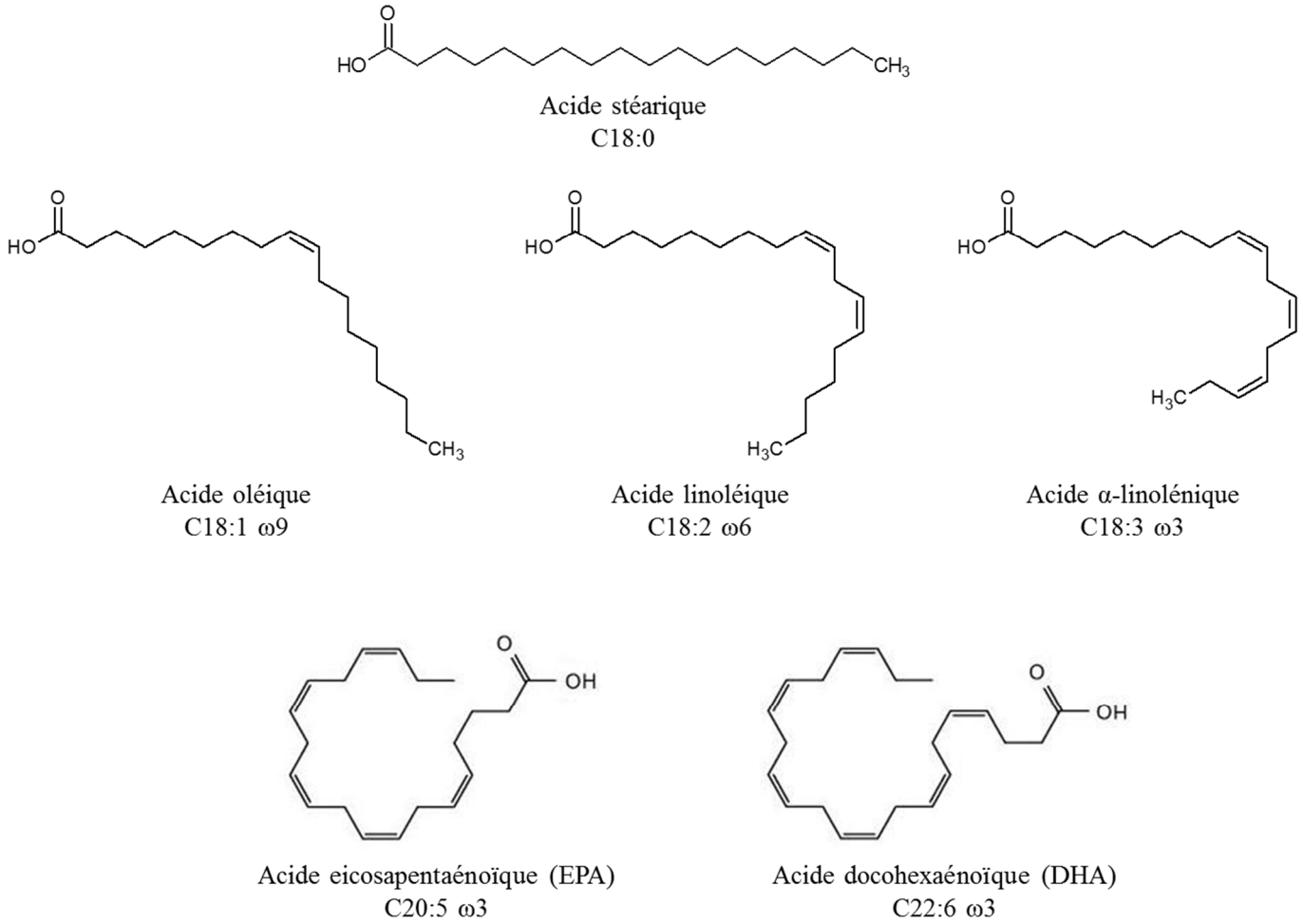


Figure I.1. *Structures chimiques de quelques acides gras*

Les principales voies réactionnelles d'oxydation des lipides insaturés sont complexes mais bien connues. Il en existe trois : l'auto-oxydation, l'oxydation enzymatique et la photo-oxydation (Berset & Cuvelier 1996) schématisées sur la ***Figure I.2***. Elles conduisent toutes à l'accumulation d'hydroperoxydes (LOOH), intermédiaires de réaction.

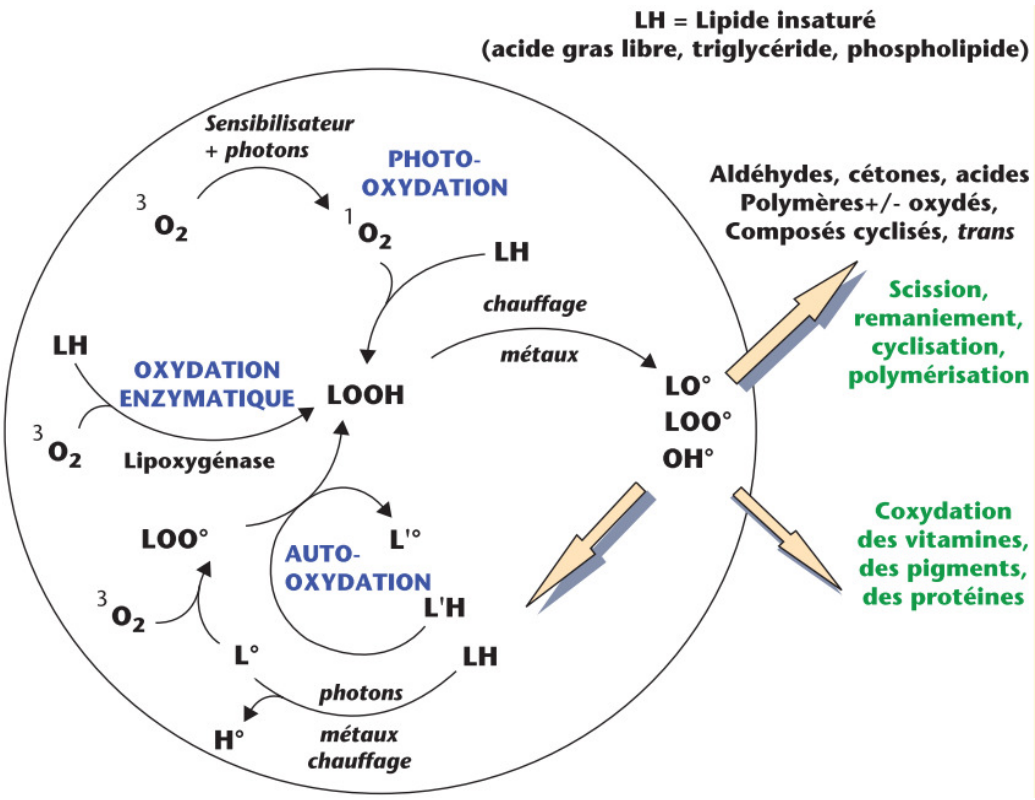


Figure I.2. *Représentation schématique des principales réactions d'oxydation des lipides rencontrées dans les aliments (Cuvelier & Maillard 2012)*

L'**auto-oxydation** est la principale voie réactionnelle rencontrée dans les aliments. Elle est met en jeu un ensemble de réactions radicalaires en chaîne qui se déroulent en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Labuza & Dugan Jr 1971; Chan *et al.* 1982; Frankel 1998; Kamal-Eldin 2003; Gunstone 2004; Choe & Min 2006; Cuvelier & Maillard 2012).

Elle commence par une étape d'initiation (primaire) qui consiste en l'arrachement d'un atome d'hydrogène ($H^{\bullet}$) dit allylique, situé sur le carbone en *alpha* de la double liaison de l'acide gras (LH), conduisant à la formation de radicaux alkyles ($L^{\bullet}$) (Pokorny 2003). Pour les AGPI, les radicaux alkyles ($L^{\bullet}$) générés se stabilisent par résonance, un réarrangement intramoléculaire formant des diènes conjugués. Au niveau des hydrogènes allyliques, l'énergie d'activation de la rupture de la liaison C-H est faible (Kerr 1966). Cette initiation primaire peut être accélérée par la température ou les métaux.

Lors de l'étape de propagation, les radicaux $L^{\bullet}$ réagissent avec l'oxygène dissous ($^3O_2$) pour former des radicaux peroxyles $LOO^{\bullet}$, très réactifs, qui vont à leur tour arracher un atome d'hydrogène soit à un autre acide gras (L'H), formant ainsi un radical alkyle $L'^{\bullet}$ et un nouvel hydroperoxyde (LOOH) (Tavadyan *et al.* 2007), soit à une molécule d'hydroperoxyde LOOH.

Il s'agit d'un mécanisme de propagation radicalaire, auto-catalytique, qui devient très rapidement irréversible. Selon l'acide gras insaturé considéré, le nombre d'hydroperoxydes formés varie car il existe alors plusieurs sites d'attaques pour l'oxygène triplet (Frankel 1998) (***Figure I.3***).

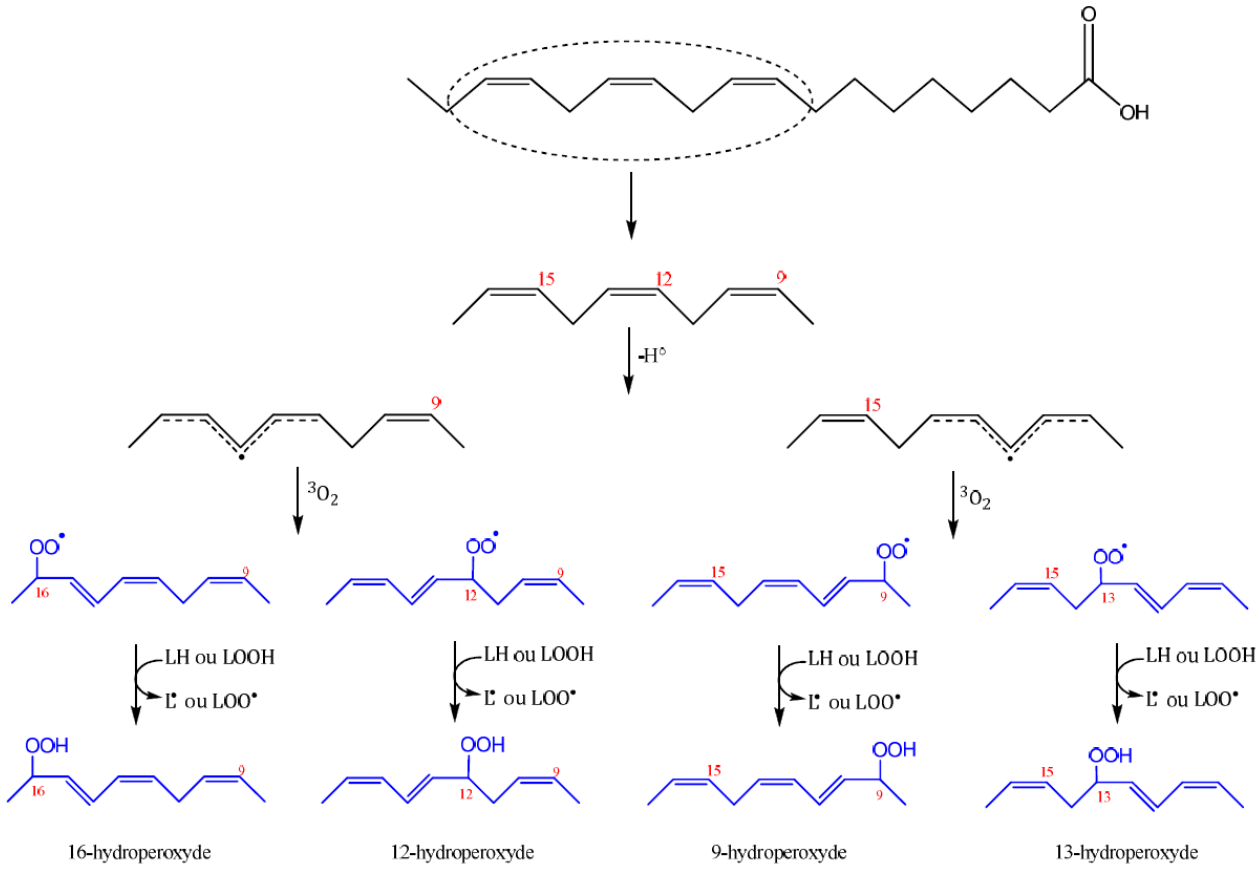


Figure I.3. *Mécanisme de formation des 9-, 12-, 13- et 16- mono-hydroperoxydes par auto-oxydation à partir de l'acide α-linolénique (Frankel 1998; Roman 2012)*

Les hydroperoxydes jouent un rôle important dans les réactions d'oxydation. Ils vont participer à l'initiation secondaire : sous l'action de la température et des métaux, les LOOH peuvent se scinder en différentes molécules radicalaires telles que LO• (radicaux alkoxyles) et LOO•, qui vont à leur tour initier l'oxydation des LH (Choe & Min 2006; Choe & Min 2009). Les radicaux LO• et LOO• peuvent également subir des réarrangements (scission, cyclisation, addition, polymérisation) (Chan *et al.* 1980; Choe & Min 2006; Choe & Min 2009; Schaich 2017). La scission des radicaux alkoxyles peut conduire à la formation de composés carbonylés (aldéhydes, alcanes, cétones, alcools, acides) à l'origine de la rancidité (Schaich 2017).

Les réactions de terminaison correspondent à la recombinaison entre les espèces radicalaires pour former des produits non radicalaires par des phénomènes de scission, cyclisation et polymérisation, formant une multitude de composés (Frankel 1998; Cuvelier & Maillard 2012).

Les ions métalliques tels le fer et le cuivre jouent un rôle très important dans la catalyse de ces réactions. En effet, le départ de l'hydrogène lors de l'initiation primaire est facilité par la présence d'ions métalliques (réaction 1) (Choe & Min 2009). De plus, la scission des hydroperoxydes peut être catalysée par des métaux comme le fer et le cuivre sous leurs différentes valences (réactions 2 et 3) (Choe & Min 2009). Les métaux peuvent également accélérer l'oxydation des lipides en participant à la formation de certaines espèces oxygénées réactives (EOR) telles que l'oxygène singulet, des radicaux hydroxyles, des radicaux anioniques superoxydes, notamment *via* les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton. Les EOR jouent un rôle important dans l'initiation des réactions d'oxydation des lipides (Choe & Min 2006; Cillard & Cillard 2006; Choe & Min 2009; Choe 2017).

$LH + M^{(n+1)+} \rightarrow H^+ + L^\bullet + M^{n+}$ (réaction 1)

$LOOH + M^{n+} \rightarrow HO^- + LO^\bullet + M^{(n+1)+}$ (réaction 2)

$LOOH + M^{(n+1)+} \rightarrow H^+ + LOO^\bullet + M^{n+}$ (réaction 3)

La **photo-oxydation** implique l'action de l'oxygène singulet ($^1O_2$), électrophile, directement sur la double liaison carbone-carbone. Il existe plusieurs sources d'oxygène singulet mais sa présence est souvent initiée dans les aliments par l'effet des UV sur des molécules photosensibles (riboflavine, chlorophylle, erythrosine) (Laguerre *et al.* 2007). L'oxydation par l'oxygène singulet n'implique pas la formation de radicaux lipidiques. Ainsi, les hydroperoxydes formés peuvent présenter à la fois des doubles liaisons non conjuguées et conjuguées, alors que la formation d'hydroperoxydes non conjugués n'est pas observée lors de l'auto-oxydation (Choe 2017). Les mécanismes de décomposition des hydroperoxydes formés par photo-oxydation sont les mêmes que ceux rencontrés en auto-oxydation, mais les produits sont obtenus dans des proportions différentes (Choe 2017). Néanmoins, dans les produits alimentaires, ce mécanisme semble mineur par rapport à l'auto-oxydation (Laguerre *et al.* 2007).

Enfin, dans les plantes comme les légumineuses ou les céréales ou dans certains tissus animaux comme les muscles, l'oxydation des lipides peut être provoquée par l'action d'enzymes, en

particulier la lipoxygénase (Min & Ahn 2005). Les mécanismes de l'**oxydation enzymatique** sont sensiblement les mêmes que ceux rencontrés dans l'auto-oxydation. Ils mettent en jeu un enchaînement de réactions radicalaires, conduisant à la formation d'hydroperoxydes qui se décomposent par la suite. Les hydroperoxydes générés dépendent cependant de l'enzyme présente, dioxygénase à fer non héminique qui incorpore de manière régiospécifique et stéréospécifique le dioxygène sur le système pentadiénique (Min & Ahn 2005).

L'oxydation des lipides est très dépendante du substrat (Berton-Carabin *et al.* 2014). Le degré d'insaturation de l'acide gras influence sa susceptibilité à l'arrachement de l'atome d'hydrogène. En effet, l'énergie de dissociation de la liaison C-H est plus faible pour un hydrogène bis-allylique (en *alpha* de deux insaturations) que pour un hydrogène allylique (en *alpha* d'une seule insaturation) (Schaich 2017), conduisant à une sensibilité vis-à-vis de l'oxydation plus élevée pour un acide gras polyinsaturé que pour un acide gras monoinsaturé. Plus le nombre d'insaturations est grand, plus la vitesse relative d'oxydation augmente et plus la période d'induction diminue : par exemple, dans des systèmes purs sans initiateurs ajoutés, les vitesses relatives d'oxydation des esters méthyliques d'acides gras suivent le rapport de réactivité suivant : **1** (C18 :1) / **40** (C18 :2) / **98** (C18 :3) (Frankel 1998).
La position des acides gras sur le triglycéride peut également influencer sa stabilité vis-à-vis de l'oxydation. Un triglycéride possédant deux acides gras insaturés en position adjacente serait plus sensible à l'oxydation que ce même triglycéride possédant deux acides gras non adjacents. Cela a été montré sur des triglycérides synthétiques composés d'acide palmitique et d'EPA, de DHA (Endo *et al.* 1997) ou d'acide linoléique (Neff & El-Agaimy 1996). Par exemple, des triglycérides composés d'acide palmitique et de deux acides linoléiques présentent des indices de peroxyde deux fois plus élevés au cours des six jours de conservation à 60°C lorsque les deux acides linoléiques sont en position adjacente (Neff & El-Agaimy 1996). De plus, il a été montré que les acides gras polyinsaturés seraient plus stables à l'oxydation lorsqu'ils se trouvent en position centrale du triglycéride par rapport à la position externe : par exemple, dans un triglycéride constitué de DHA et de deux acides oléiques et placé à 40°C, la formation d'hydroperoxydes est retardée d'environ 72 heures lorsque le DHA se trouve en position centrale, alors qu'aucune phase d'induction n'est observée lorsque le DHA est en position externe (Wijesundera *et al.* 2008).
L'état physique des lipides peut également avoir une influence sur la stabilité de l'huile vis-à-vis de l'oxydation. La cristallisation d'une partie des lipides pourrait stimuler l'oxydation, probablement en raison d'une augmentation de la concentration en acides gras insaturés ou en

espèces pro-oxydantes dans la phase liquide : par exemple, les cinétiques de formation, à 3°C ou à 25°C, des hydroperoxydes et de l'hexanal sont très proches et ne répondent plus à la loi d'Arrhenius (Calligaris *et al.* 2006).

Enfin, le traitement de l'huile (brute ou raffinée) a une incidence sur la présence ou non de certains composés mineurs dans l'huile (phospholipides, acides gras libres, traces d'eau, métaux, antioxydants) et peut donc influencer l'oxydation des lipides (Berton-Carabin *et al.* 2014).

I.1.2. Les mécanismes d'action antioxydants des composés phénoliques

Les antioxydants peuvent être définis comme des substances capables de prolonger la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations provoquées par l'oxydation, telles que le rancissement des matières grasses et les modifications de la couleur (CE 2008).

Il existe au moins cinq modes d'intervention des antioxydants : 1) interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires, 2) chélation des métaux de transition, 3) inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation, 4) désactivation des espèces oxygénées réactives (EOR) et 5) abaissement de la pression partielle en oxygène (Berset 2006; Cillard & Cillard 2006; Choe & Min 2009). Ces cinq modes d'intervention conduisent à classer les antioxydants en deux catégories : les antioxydants dits « primaires » ou « antiradicalaires » qui vont agir directement sur les radicaux lipidiques (mode d'intervention 1)), et les antioxydants dits « secondaires » ou « préventifs » qui vont inhiber indirectement les réactions d'oxydation *via* leurs effets sur les initiateurs de l'oxydation lipidique (mode d'intervention 2) à 5)) (Berset 2006; Cillard & Cillard 2006; Choe & Min 2009). La plupart des molécules antioxydantes ne sont pas associées à un seul et unique mode d'intervention et par ailleurs, plusieurs mécanismes peuvent se combiner pour protéger, dans un même milieu, les lipides de l'oxydation. Les recherches ont montré que de nombreux composés phénoliques pouvaient intervenir à l'un ou l'autre de ces niveaux (Berset 2006; Laguerre *et al.* 2007).

I.1.2.1. Les antioxydants primaires ou antiradicalaires

La structure chimique des composés phénoliques (AOH) leur permet d'être des antioxydants primaires très efficaces : c'est leur principal mécanisme d'action antioxydant. En effet, ils sont capables de céder, par rupture homolytique de la liaison O-H, un atome d'hydrogène aux radicaux peroxyles $LOO^{\bullet}$, alkoxyles $LO^{\bullet}$ ou alkyles $L^{\bullet}$ (réactions 4, 5 et 6), limitant ainsi les

réactions de propagation (Elias & Decker 2017). Ils agissent préférentiellement au niveau des $LOO^{\bullet}$ et $LO^{\bullet}$, à des vitesses de réaction de l'ordre de 10^6 et 10^9 $M^{-1}.s^{-1}$ respectivement (Tavadyan *et al.* 2007).

$AOH + LOO^{\bullet} \rightarrow AO^{\bullet} + LOOH$ (réaction 4)

$AOH + LO^{\bullet} \rightarrow AO^{\bullet} + LOH$ (réaction 5)

$AOH + L^{\bullet} \rightarrow AO^{\bullet} + LH$ (réaction 6)

Le radical phénoxyle ainsi formé est relativement stable dû à la délocalisation de l'électron non apparié sur le cycle aromatique (***Figure I.4***).

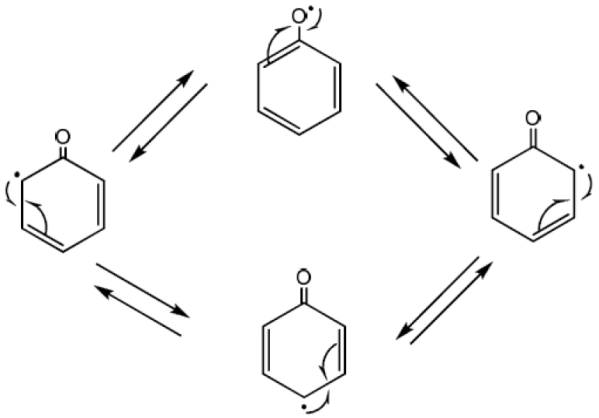


Figure I.4. *Stabilisation du radical phénoxyle par mésomérie (d'après Berset (2006))*

Ce mécanisme, appelé « transfert d'un atome d'hydrogène » (hydrogen atom transfer, HAT), est le plus communément proposé dans la littérature (Berset 2006; Cillard & Cillard 2006; Laguerre *et al.* 2007; Elias & Decker 2017). Certains auteurs désignent également le mécanisme appelé « transfert d'électron » (single electron transfer, SET) au cours duquel l'antioxydant ne cède qu'un seul électron à un radical $L^{\bullet}$ (réaction 7) (Leopoldini *et al.* 2011).

$AOH + L^{\bullet} \rightarrow AOH^{+\bullet} + L^{-}$ (réaction 7)

De la même façon, le radical phénolique formé permet à l'électron non apparié de se délocaliser sur l'ensemble de la molécule, stabilisant ainsi le radical formé et limitant la propagation de nouvelles réactions radicalaires. C'est ce phénomène qui explique en partie l'action antioxydante des ions phénolates (réaction 8) (Laguerre *et al.* 2014).

$AO^- + L^\bullet \rightarrow AO^\bullet + L^-$ (réaction 8)

De plus, l'absence de sites d'attaque de l'oxygène empêche la propagation de nouvelles espèces radicalaires car les réactions 9, 10 et 11 ne sont pas favorisées (Berset 2006). En revanche, elles se produisent si la concentration de la forme radicalaire de l'antioxydant est trop élevée et qu'il est alors à l'origine d'un effet pro-oxydant ; cela a déjà été rapporté pour l'α-tocophérol et quelques flavonoïdes (Cillard & Cillard 2006).

$AO^\bullet + O_2 \rightarrow AOOO^\bullet$ (réaction 9)

$AOOO^\bullet + LH \rightarrow AOOOH + L^\bullet$ (réaction 10)

$AO^\bullet + LH \rightarrow AOH + L^\bullet$ (réaction 11)

Les antioxydants sous forme $AO^\bullet$ peuvent ensuite évoluer vers un produit d'oxydation stable (par exemple l'α-tocophérylquinone pour l'α-tocophérol) (Cillard & Cillard 2006), former des adduits avec d'autres antioxydants sous forme radicalaire (réaction 12) (Elias & Decker 2017), ou des radicaux lipidiques, participant ainsi à des réactions de terminaison (réactions 13 et 14) (Berset 2006).

$AO^\bullet + AO^\bullet \rightarrow AOOA$ (réaction 12)

$AO^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow LOOOA$ (réaction 13)

$AO^\bullet + LO^\bullet \rightarrow LOOA$ (réaction 14)

D'un point de vue cinétique, lorsque des antioxydants primaires sont ajoutés, ils sont dits à effet retard ou « chain-breakers » s'ils induisent une phase de latence par rapport à un milieu témoin sans antioxydant, pendant laquelle le substrat n'est quasiment pas oxydé (Laguerre *et al.* 2007; Cuvelier & Maillard 2012). Cette phase de latence se poursuit jusqu'à ce que l'antioxydant soit complètement consommé. Une fois que l'antioxydant a disparu, le taux d'apparition des peroxydes augmente jusqu'à atteindre le même niveau que le témoin (Laguerre *et al.* 2007). Il existe néanmoins des antioxydants primaires qui inhibent l'oxydation sans engendrer de phase de latence : ils sont appelés antioxydants à ralentissement (« retarders ») (Laguerre *et al.* 2007; Cuvelier & Maillard 2012) (***Figures I.5***).

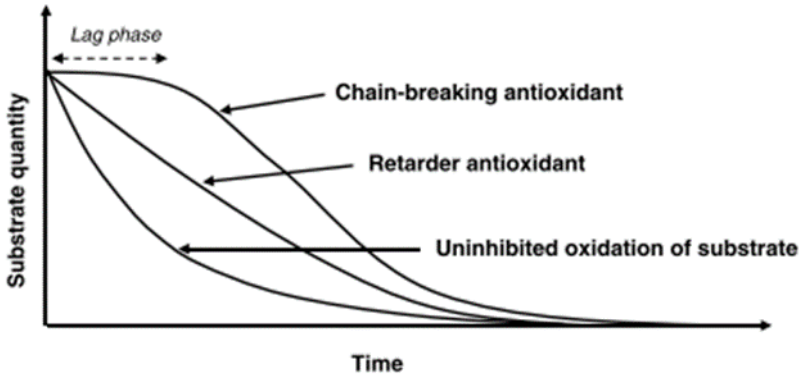


Figure I.5. *Représentation schématique des cinétiques d'oxydation des lipides en présence ou en absence d'antioxydants (Laguerre et al. 2007)*

Ainsi, les antioxydants sont plus efficaces s'ils sont introduits avant les étapes d'initiation ou de propagation de l'oxydation des lipides puisque ces réactions étant irréversibles, il ne sera jamais possible de revenir vers un état non oxydé des lipides (Berset 2006; Elias & Decker 2017).

Si la plupart des composés phénoliques présentent une activité antioxydante, leur efficacité diffère pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la capacité d'un composé phénolique à céder un atome d'hydrogène à un radical peut s'expliquer par son potentiel d'oxydo-réduction (E°'). Ainsi, si le potentiel d'oxydo-réduction d'une molécule ($AO^{\bullet}$, H^{+} / AOH) est inférieur à celui d'une autre molécule (par exemple $L^{\bullet}$, H^{+} / LH), l'antioxydant sera capable de céder un atome d'hydrogène (Elias & Decker 2017). Par exemple, d'après les données de Buettner (1993), l'α-tocopherol (E°' = 500 mV) a un potentiel d'oxydo-réduction inférieur à celui du radical peroxyle (E°' = 1000 mV) et est donc capable de céder à celui-ci un atome d'hydrogène. Néanmoins, si en première approche on peut considérer qu'un faible potentiel redox favorise l'activité antioxydante, la corrélation entre les deux n'est pas toujours étroite (Berset 2006). En effet, la structure chimique du composé a également une influence, en particulier les substituants situés à proximité du groupement phénolique. Plus les substituants sont donneurs d'électrons (par exemple OCH_3 et OH en position *ortho* ou *para* du groupement phénolique), plus la rupture homolytique de la liaison O-H est favorisée (caractérisée par une faible énergie de dissociation de la liaison ou bond dissociation energy, BDE) et plus l'efficacité de la molécule est grande (Shahidi *et al.* 1992). La conformation stérique de la molécule aurait également un impact. Par exemple, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine ont les mêmes propriétés électrochimiques mais la (-)épicatéchine a une probabilité quatre fois plus faible de céder un atome d'hydrogène que la (+)-catéchine, potentiellement en raison d'un

encombrement stérique plus important (groupement 3-hydroxyl dans le même plan que le cycle B) et donc d'une accessibilité réduite à cette fonction (***Figure I.6***) (Peyrat-Maillard *et al.* 2000). Cet impact n'est néanmoins pas généralisable et dépend du milieu étudié.

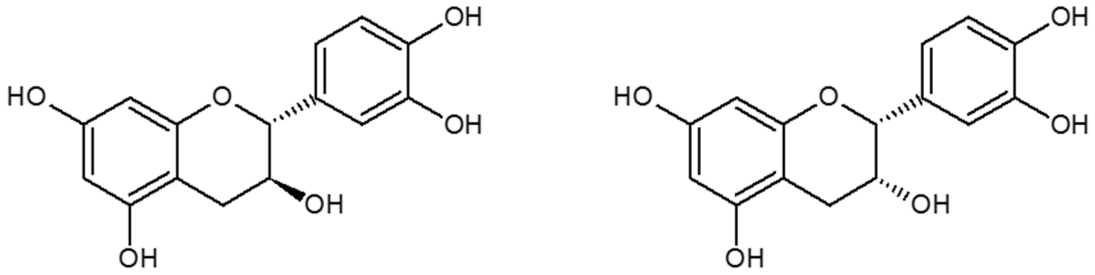


Figure I.6. *Structures chimiques de la (+)-catéchine (gauche) et de la (-)-épicatéchine (droite)*

I.1.2.2. Les antioxydants secondaires ou préventifs

Les antioxydants secondaires permettent de limiter l'oxydation en ayant un rôle sur les paramètres inducteurs de l'oxydation. C'est le cas par exemple de certains composés phénoliques qui possèdent la capacité de complexer des ions métalliques : il s'agit des molécules possédant un noyau catéchol ou deux groupements C=O et OH coplanaires et proches (Berset 2006; Dangles 2006; Leopoldini *et al.* 2011). La stabilité des complexes formés peut être modulée en fonction des substituants du noyau phénolique. Cette complexation joue un rôle important dans l'expression des couleurs naturelles (chez les anthocyanes) mais aussi dans les propriétés antioxydantes (notamment de certains acides phénoliques et flavonoïdes). En effet, les métaux interviennent dans de nombreuses réactions de production d'espèces oxygénées réactives. Ainsi, la formation de complexes stables et inertes bloquant l'ion métallique sous un état redox donné, constitue un mécanisme potentiel d'action antioxydante (Dangles 2006; Leopoldini *et al.* 2011) (***Figure I.7***).

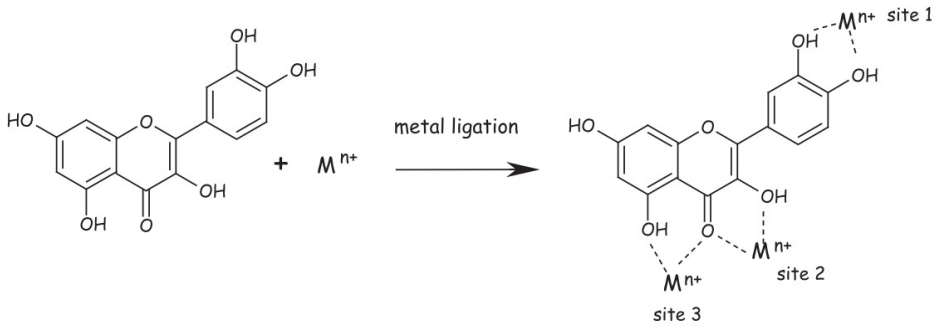


Figure I.7. *Sites potentiels de chélation des métaux chez les flavonoïdes (Leopoldini et al. 2011)*

Les composés phénoliques peuvent également inhiber l'oxydation des lipides par leur action inhibitrice sur les enzymes responsables de l'oxydation des lipides. Quelques études montrent ce type d'activité chez les acides phénoliques et les flavonoïdes vis-à-vis de la lipoxygénase (Richard-Forget *et al.* 1995; Malterud & Rydland 2000).

Enfin, certains composés sont capables d'inhiber la photoxydation des lipides en piégeant l'oxygène singulet (Yanishlieva *et al.* 1998). Ce mécanisme d'action est principalement connu pour les caroténoïdes mais il a également été montré pour des composés présentant une structure phénolique comme les tocophérols (Laguerre *et al.* 2007) qui produisent alors des hydroperoxydienones ou des endoperoxydes (Choe & Min 2005). Le piégeage peut être à la fois physique et/ou chimique (Yanishlieva *et al.* 1998; Choe & Min 2009).

I.1.2.3. Efficacité antioxydante des composés phénoliques

De nombreux composés possédant une structure phénolique présentent une activité antioxydante reconnue. Plusieurs familles de composés sont concernées : phénols simples, tocophérols, acides phénoliques, diterpènes, flavonoïdes, stilbènes (Berset 2006). Il est impossible d'établir une valeur unique du pouvoir antioxydant pour une molécule donnée (Berset 2006). De nombreuses méthodes de mesure de cette activité sont disponibles, à la fois dans des systèmes modèles et dans des milieux proches des aliments tels que des huiles ou des émulsions comme en témoignent quelques exemples ci-après.

I.1.2.3.1. Efficacité antioxydante dans des huiles et des émulsions

La famille des **phénols simples** regroupe plusieurs antioxydants efficaces. Par exemple, le BHA (butylhydroxyanisole) et le BHT (butylhydroxytoluène) sont des composés phénoliques de synthèse, couramment utilisés en tant qu'additifs alimentaires (E 320 et E 321 respectivement) pour leurs propriétés antioxydantes et dont les doses autorisées sont respectivement de 100 mg/kg d'huile pour le BHT et de 200 mg/kg pour le BHA (CE 2008). La 2-tertiobutyl-4-hydroxyquinone (TBHQ) est un *para*-diphénol de synthèse, antioxydant très efficace notamment dans les huiles de friture et autorisé à hauteur de 200 mg/kg d'huile (CE 2008). Les monophénols naturels provenant d'huiles essentielles (thymol, carvacrol, eugénol, isoeugénol, gingérol) possèdent également des propriétés antioxydantes, bien qu'en général plus faibles que les monophénols de synthèse selon la plupart des études disponibles (Berset 2006). L'isoeugénol a même montré une efficacité antioxydante plus élevée que celle de l'α-tocophérol et l'eugénol similaire dans une émulsion huile/eau (h/e) composée de 30% d'huile

de colza préalablement purifiée de ses antioxydants endogènes et stabilisée par 20 g/L de sérum albumine bovine, de diamètre moyen 0,5 µm et conservée sous agitation à 47°C (Cuvelier *et al.* 2003). De même, le thymol et le carvacrol ont montré une bonne efficacité antioxydante dans deux systèmes lipidiques : des triglycérides purifiés de lard et une huile de colza conservés à 20°C (Yanishlieva *et al.* 1999).

Les **tocophérols** sont des antioxydants efficaces. Ils sont largement répandus dans la nature où ils contribuent à préserver les lipides végétaux. Autorisés dans les produits alimentaires (E 307) (CE 2008), ils sont présents en quantité significative, entre 500 et 1000 mg/kg dans les huiles végétales (Cuvelier & Maillard 2012). Ils se répartissent en deux familles, les tocophérols et les tocotriénols, chacune d'elle comportant quatre formes - α, β, γ et δ - qui diffèrent par le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau aromatique. Ils sont efficaces pour protéger les lipides alimentaires, notamment en émulsions (Cuvelier *et al.* 2003), dans des huiles végétales chauffées (Roman *et al.* 2013), à des concentrations allant de 200 à 1000 mg/kg ; au-delà, une action pro-oxydante peut-être observée (Cillard *et al.* 1980; Huang *et al.* 1994).

Certains **acides phénoliques** et leurs dérivés - cinnamiques ou benzoïques - possèdent également une efficacité antioxydante. Par exemple, l'acide rosmarinique est plus efficace que le BHA et le BHT dans une huile chauffée à 60°C (Frankel *et al.* 1996). L'acide sinapique a une activité antioxydante similaire à celle du TBHQ dans une émulsion contenant de l'huile d'Echium (riche en acide α-linolénique) et conservée à température ambiante (Espinosa *et al.* 2015). L'acide caféique permet de limiter l'oxydation des lipides dans une émulsion composées d'huile de poisson (Maqsood & Benjakul 2010), ou dans une huile de foie de morue non émulsifiée (De Leonardis & Macciola 2003) même si son efficacité diffère selon le système considéré (Medina *et al.* 2012; Sørensen *et al.* 2017).

De nombreux **flavonoïdes** sont également antioxydants. Si l'on compare des molécules issues de différentes familles de flavonoïdes mais ayant des noyaux A et B équivalents, les flavonols apparaissent plus efficaces que les flavones, eux-mêmes plus efficaces que les flavanones (Van Acker *et al.* 1996). Parmi les flavonoïdes les plus efficaces, on trouve la quercétine et ses dérivés glycosylés (rutine), qui se sont montrés plus efficaces que le BHT dans une huile de poisson et que l'α-tocophérol dans des systèmes émulsionnés (Huber *et al.* 2009). La rutine a également présenté une activité antioxydante similaire à celle du TBHQ dans une émulsion riche en oméga-3 (Espinosa *et al.* 2015).

I.1.2.3.2. Efficacité antioxydante dans des milieux modèles

Les milieux de type « huile » ou « émulsion » étant souvent trop complexes pour accéder aux mécanismes d'action des antioxydants, des tests en milieux modèles ont été mis en place. Ils ne font pas intervenir de triglycérides mais permettent par exemple d'évaluer la capacité des antioxydants, notamment des composés phénoliques, à piéger des radicaux libres ou des espèces oxygénées réactives (ORAC, DPPH, AAPH, ABTS, etc.) (Cuvelier *et al.* 1992; Brand-Williams *et al.* 1995; Foti *et al.* 1996; Rice-Evans *et al.* 1996; Rice-Evans *et al.* 1997; Peyrat-Maillard *et al.* 2000; Goupy *et al.* 2003; Peyrat-Maillard *et al.* 2003; Roche *et al.* 2005; Scherer & Godoy 2009), de déterminer les potentiels redox de ces antioxydants (FRAP, CUPRAC, etc.) ou d'évaluer leur capacité à chélater des métaux (Wettasinghe & Shahidi 2002; Karawita *et al.* 2005; Wijeratne *et al.* 2006; Shahidi & Zhong 2015).

Certains d'entre eux ont également permis d'identifier les schémas réactionnels mis en jeu et d'identifier les produits de réaction générés, notamment à partir de l'α-tocophérol (Tappel 1972 (***Figure I.8***); Verleyen *et al.* 2001a; Verleyen *et al.* 2001b ; Tavadyan *et al.* 2007 (***Figure I.9***)), de l'acide carnosique (***Figure I.10***) ou encore de l'eugénol (Bondet *et al.* 1997) (***Figure I.11***).

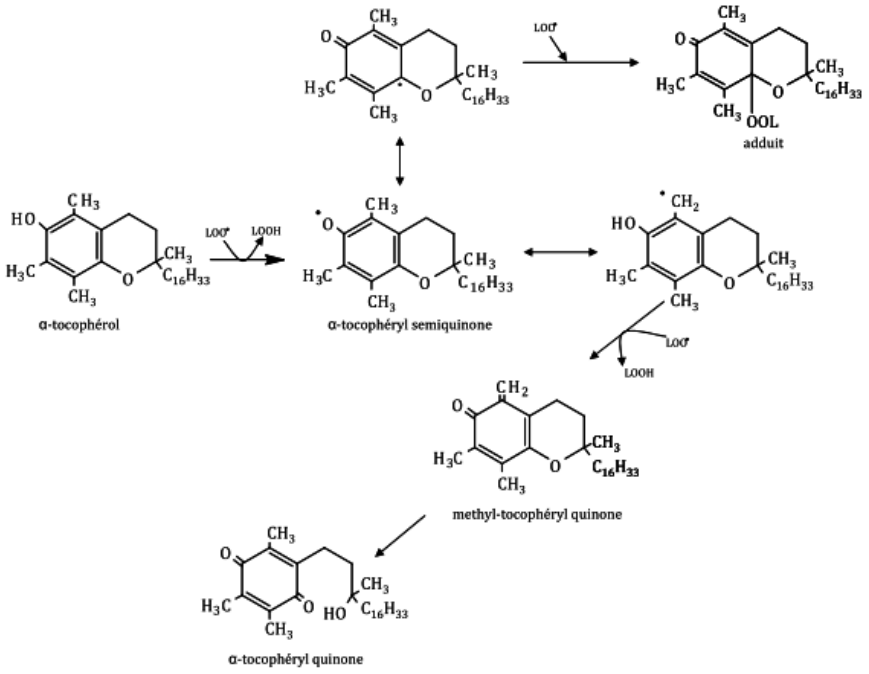


Figure I.8. *Proposition de mécanisme d'action des tocophérols d'après Tappel (1972) (Berset 2006)*

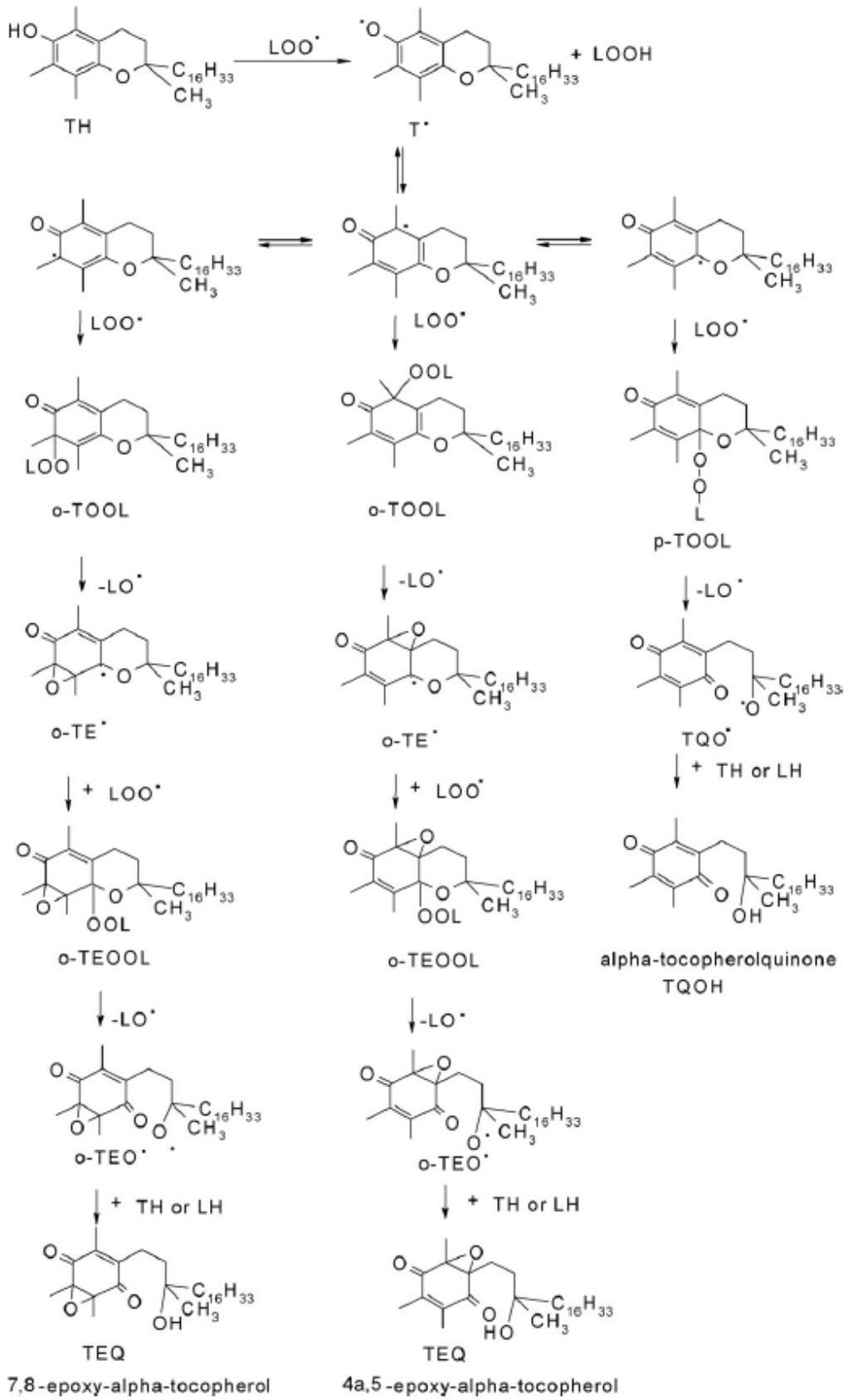


Figure I.9. *Proposition de mécanisme réactionnel entre l'α-tocophérol et les radicaux peroxyles, ainsi que les différents produits d'oxydation identifiés: α-tocophérolquinone, 4a,5-epoxy-α-tocophérolquinone, 7,8-epoxy-α-tocophérolquinone (Tavadyan et al. 2007)*

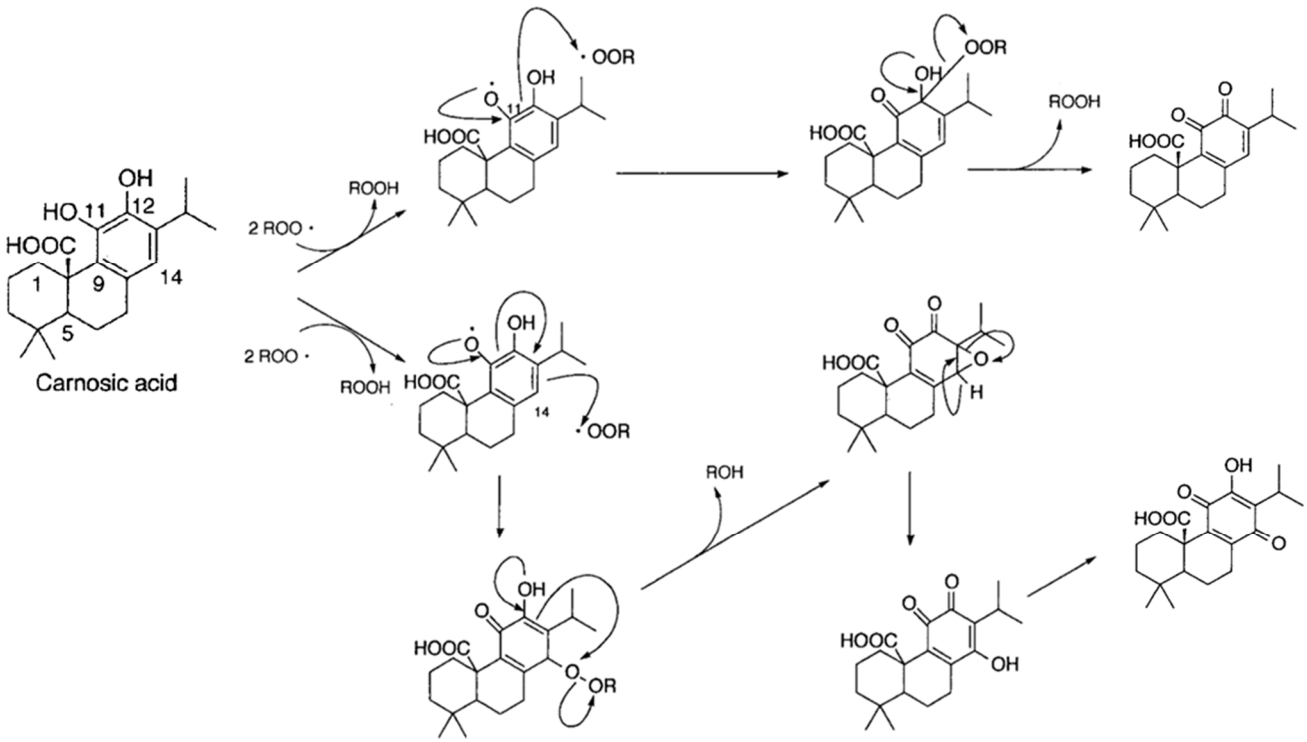


Figure I.10. *Proposition de mécanisme réactionnel entre l'acide carnosique et les radicaux peroxyles (adapté de Masuda et al. 2001)*

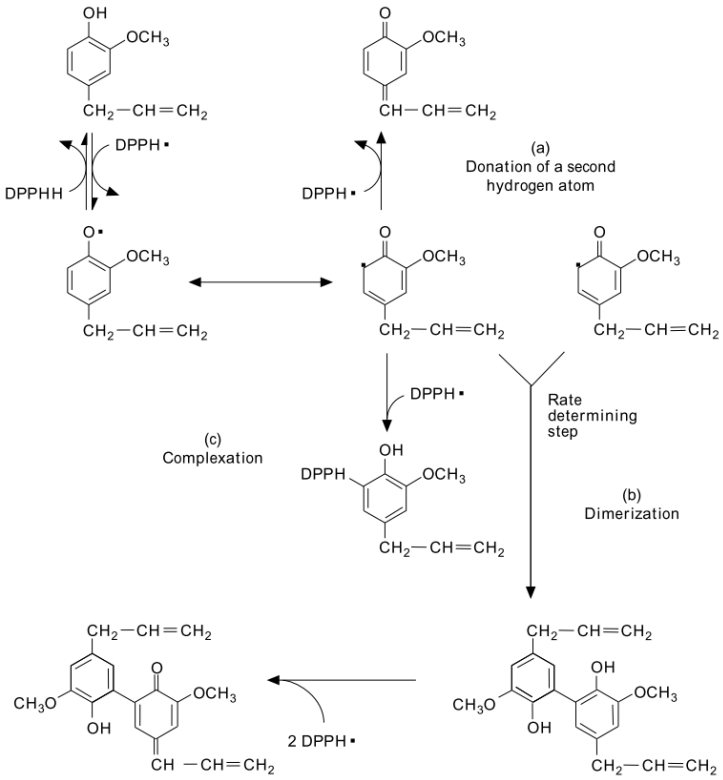


Figure I.11. *Proposition de mécanisme réactionnel entre l'eugénol et le radical DPPH•* *(Bondet et al. 1997)*

I.1.3. L'oxydation des lipides et sa maîtrise en émulsion

I.1.3.1. Rappel sur les émulsions alimentaires et les voies de stabilisation

Les émulsions h/e sont composées de deux phases non miscibles dont l'une, l'huile, est dispersée dans l'autre, la phase aqueuse. Dans les émulsions alimentaires, un très large panel de tailles de gouttelettes est rencontré : de 0,1 à 20 µm voire plus. Ce système peut se décomposer en trois phases : la phase lipidique présente sous forme de gouttelettes, la phase aqueuse sous forme d'une phase continue et l'interface entre les phases aqueuse et lipidique. Bien que très fine, l'interface est une phase très importante car elle intervient dans de nombreux phénomènes gouvernant la stabilité physico-chimique des émulsions (Berton-Carabin *et al.* 2014). Ce sont des systèmes qui sont thermodynamiquement instables. Ainsi, les gouttelettes vont avoir tendance à se regrouper (floculation), voire à fusionner (coalescence) et, comme elles sont moins denses que l'eau, à remonter (crémage) (***Figure I.12***) (Berton-Carabin *et al.* 2014; McClements 2017).

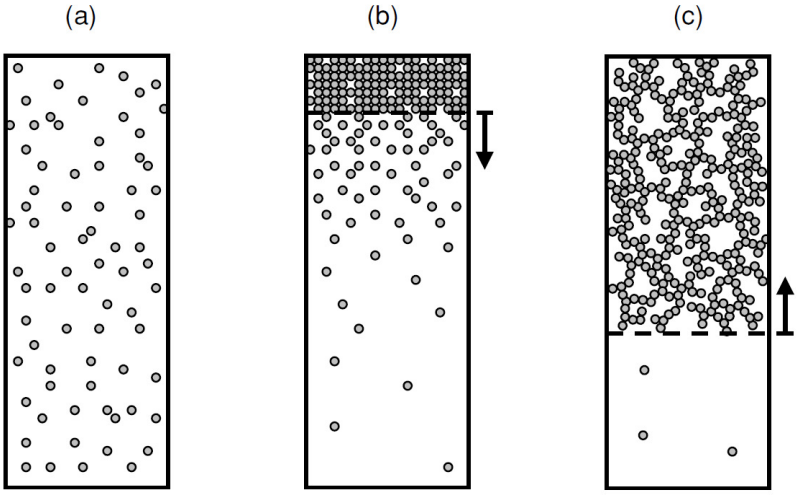


Figure I.12. *Illustration de plusieurs phénomènes de déstabilisation d'une émulsion au regard de la distribution des gouttelettes lipidiques : (a) émulsion stable, (b) crémage sans agrégation des gouttelettes, (c) formation d'un réseau connecté d'agrégats de gouttelettes. Les lignes pointillées et flèches indiquent la position de la limite visible entre les deux phases et son évolution dans le temps (van Aken 2006)*

Pour éviter ces phénomènes de déstabilisation physique, on peut avoir recours à deux types de molécules : i) des agents tensio-actifs (émulsifiants de petite taille ou macromoléculaire), qui s'adsorbent à l'interface pendant le procédé d'émulsification et diminuent la tension interfaciale entre l'huile et l'eau et qui peuvent par ailleurs limiter le rapprochement entre les gouttelettes (et donc la floculation) par gène stérique ou répulsion électrostatique, et ii) des agents de texture,

qui stabilisent l'émulsion en augmentant la viscosité de la phase aqueuse, limitant ainsi le déplacement des gouttelettes lipidiques (Berton-Carabin *et al.* 2014; McClements 2017).

Les émulsifiants sont divisés en trois grandes catégories : les émulsifiants à faible poids moléculaire, les émulsifiants à fort poids moléculaire et les particules solides (Berton-Carabin *et al.* 2014). La première catégorie est composée de molécules de synthèse ou d'origine naturelle, encore appelées **surfactants**, constituées d'une tête hydrophile (chargée ou non) et d'une queue hydrophobe. Dans le domaine alimentaire, on trouve en particulier les mono- et diglycérides, les polysorbates ou Tweens (***Figure I.13***), les Spans et les phospholipides (Hasenhuettl & Hartel 2008). Ils sont caractérisés par leur HLB, balance hydrophile/lipophile, qui permet de définir leur potentialité à stabiliser des émulsions huile dans eau h/e (HLB élevée) ou eau dans huile e/h (HLB faible).

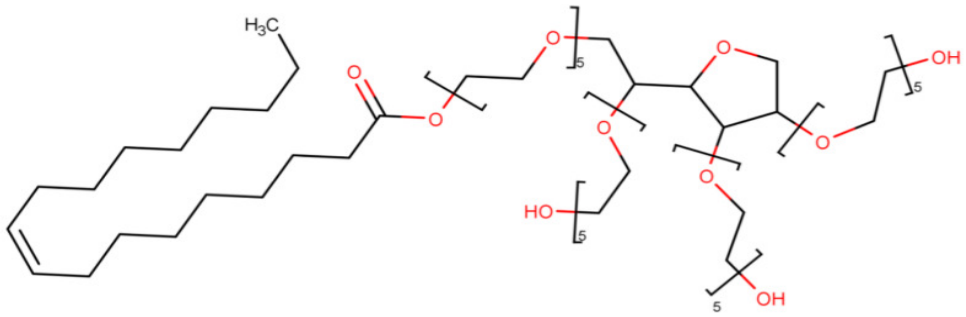


Figure I.13. *Structure chimique du Tween 80 (Mahmood & Al-koofee 2013)*

La seconde catégorie est constituée de **biopolymères** amphiphiles qui peuvent être principalement des protéines ou quelques polysaccharides (hydrocolloïdes). Parmi les **polysaccharides**, la gomme arabique, les amidons modifiés, les celluloses modifiées, certaines pectines et les galactomannanes présentent des propriétés interfaciales dans une moindre mesure (Dickinson 2009). Parmi les **protéines** alimentaires, les plus utilisées pour leurs propriétés émulsifiantes sont celles dérivées du lait ou de l'œuf (Phillips & Williams 2011). Parmi les protéines laitières, on retrouve les protéines globulaires du lactosérum ou leurs fractions purifiées sous forme plus ou moins native (*beta*-lactoglobuline, sérum albumine bovine), les caséines et les caséinates (Phillips & Williams 2011). Leur activité interfaciale dépend de leur point isoélectrique, de leur poids moléculaire, de leur conformation ainsi que de leur composition en acides aminés dont découlent leurs caractéristiques amphiphiles (Phillips & Williams 2011). Les protéines de lactosérum, co-produits de l'industrie laitière, sont des

ingrédients dont l'utilisation a beaucoup augmenté ces trente dernières années (Boland 2011). Leur composition dépend fortement de la source et du procédé de fabrication et elles sont composées majoritairement de *beta*-lactoglobuline (51 à 80%), d'*alpha*-lactalbumine (12 à 19%), d'immunoglobuline G, de sérum albumine bovine, de proteose peptone et de caseinomacropeptides (Boland 2011). Plus particulièrement, la *beta*-lactoglobuline est composée de 162 acides aminés, a un poids moléculaire de 18,2 kDa, un pI de 5,4 et possède deux sous-unités à pH neutre (Boland 2011). L'*alpha*-lactalbumine est composée de 123 acides aminés, a un poids moléculaire de 14 kDa et un pI de 4,4 (Boland 2011).

Enfin, la troisième catégorie regroupe des **particules solides** qui s'adsorbent à l'interface (Dickinson 2010), telles que les particules de silice (Pichot *et al.* 2010) voire d'amidon (Rayner *et al.* 2012; Song *et al.* 2015), et forment une famille spécifique d'émulsions appelées émulsions de Pickering.

L'activité interfaciale de ces émulsifiants s'explique par la présence conjointe de domaines hydrophiles et hydrophobes dans les molécules (***Figure I.14***) qui, dans le cas des biopolymères, une fois adsorbées à l'interface, peuvent adopter une conformation étirée ou globulaire pouvant donner un film plus ou moins dense et élastique (Berton-Carabin *et al.* 2014).

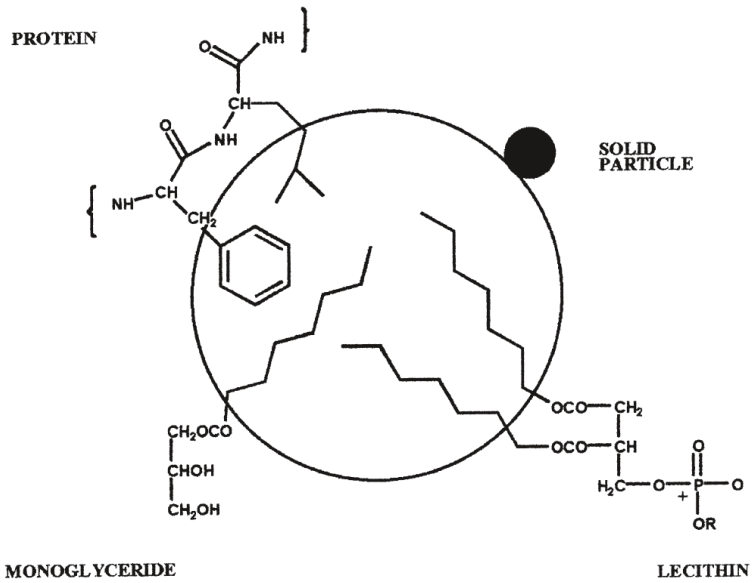


Figure I.14. *Représentation schématique du positionnement de quelques émulsifiants à l'interface d'une gouttelette lipidique (Hasenhuettl & Hartel 2008)*

Tous les émulsifiants peuvent être définis par leur « surface couvrante », c'est à dire la quantité d'émulsifiant nécessaire pour couvrir une surface d'interface donnée à l'équilibre. Par exemple, les surfaces couvrantes théoriques données par la littérature sont de 2,0 mg/m^2 pour les isolats

de protéines de lactosérum et la sérum albumine bovine, 3,0 mg/m^2 pour les caséinates de sodium, 1,5 mg/m^2 pour le Tween 20 (Berton-Carabin *et al.* 2014). Lorsque la concentration en émulsifiant introduite est supérieure à la surface couvrante, la partie des émulsifiants en excès et non adsorbée à l'interface va rester dans la phase dans laquelle la molécule d'émulsifiant est la plus soluble. Pour les protéines et les polysaccharides, il s'agira de la phase aqueuse. Pour les surfactants, cela dépendra du paramètre HLB qui détermine indirectement la localisation préférentielle de la part non adsorbée. Au-delà d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC), les surfactants non-adsorbés vont former des micelles (s'ils sont dans la phase aqueuse) ou des micelles inversées (s'ils sont dans la phase lipidique) (Berton-Carabin *et al.* 2014; McClements 2017).

Les agents de texture utilisés en alimentaire sont des polysaccharides, également appelés hydrocolloïdes (Chen *et al.* 2010; Berton-Carabin *et al.* 2014). Ils peuvent également être de nature protéique (gélatine). Les polysaccharides peuvent avoir des structures linéaires ou branchées avec différents degrés de polymérisation, des groupements ionisables, ce qui a une influence sur leurs propriétés physiques telles que la solubilité, la viscosité développée et/ou le pouvoir gélifiant (Stephen & Churms 2006). Ces polysaccharides sont utilisés pour de nombreuses applications en tant qu'épaississants, agents liants, stabilisants, émulsifiants, agents de suspension ou agents gélifiants (Stephen & Churms 2006). Ils sont incorporés dans des produits laitiers, de la confiserie, des sauces, des produits carnés, etc. On y retrouve : l'amidon et ses dérivés, les galactomannanes (gomme de guar et de caroube), les carraghénanes et agars, la gomme arabique, les pectines, les alginates, la carboxyméthyl-cellulose et la gomme de xanthane (Stephen & Churms 2006). Une grande diversité de propriétés est retrouvée chez les polysaccharides : de formes insolubles (cellulose) à très solubles (amidon, gomme de guar), de faible viscosité (gomme arabique) à viscosité élevée (gomme de guar), de nature non gélifiante (dextran, gomme de guar) à gélifiante à froid (alginates, pectines) ou à chaud (des dérivés de cellulose) (van Aken 2006).

Ainsi, les polysaccharides sont présents dans de nombreuses émulsions alimentaires (mayonnaise, glaces, sauces, ...). Leurs fonctions premières y sont l'augmentation de la viscosité et la rétention d'eau (van Aken 2006). Les polysaccharides peuvent être ajoutés à la phase aqueuse d'une émulsion pour augmenter sa viscosité, permettant d'obtenir une texture désirée pour le produit, ou pour réduire les phénomènes de crémage des gouttelettes lipidiques.

En effet, le phénomène de crémage répond à la loi de Stokes (équation 1) et ainsi, quand la viscosité de la phase continue augmente, ce phénomène est ralenti.

$$v = \frac{2a^2(\rho_0 - \rho)g}{9\eta_0} \qquad \text{(équation 1)}$$

Avec v la vitesse de déplacement de la gouttelette, a le rayon de la gouttelette, ρ_0 la densité de la phase continue, ρ la densité de la phase dispersée, g l'accélération de la pesanteur, η_0 la viscosité de la phase continue.

La plupart des polysaccharides sont des épaississants très efficaces à de petites concentrations (van Aken 2006). L'évolution de la viscosité va dépendre du régime de concentration, dilué ou semi-dilué, dans lequel se trouve le polymère. Ces deux domaines sont définis par une concentration limite d'enchevêtrement notée C* (van Aken 2006). En dessous de cette concentration, les polysaccharides sont individualisés et occupent un volume spécifique appelé viscosité intrinsèque dépendante des propriétés de structure du polymère. Dans ce domaine, la solution de polysaccharides se comporte comme une dispersion diluée et présente un comportement newtonien. Au-delà de C*, les molécules de polymères s'enchevêtrent et la viscosité de la solution augmente de façon exponentielle avec la concentration. La solution présente alors un comportement rhéofluidifiant, la viscosité diminue avec l'application de contraintes de cisaillement (***Figure I.15***) (van Aken 2006).

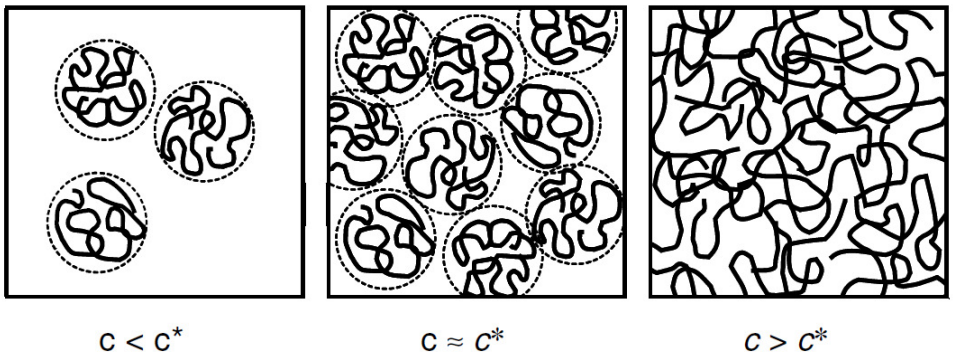


Figure I.15. *Représentation schématique de l'organisation des polysaccharides en solution en fonction de la concentration C, illustrant la transition de l'état dit « dilué » à l'état « concentré » (van Aken 2006)*

La gomme de guar (***Figure I.16***) par exemple est caractérisée par une C* très faible, d'environ 0,25% (p/v) (Morris *et al.* 1981). Les émulsions contenant des polysaccharides épaississants non gélifiants en concentration très supérieure à leur C* sont plus stables sur le long terme vis-à-vis de phénomènes comme le crémage (Cao *et al.* 1990).

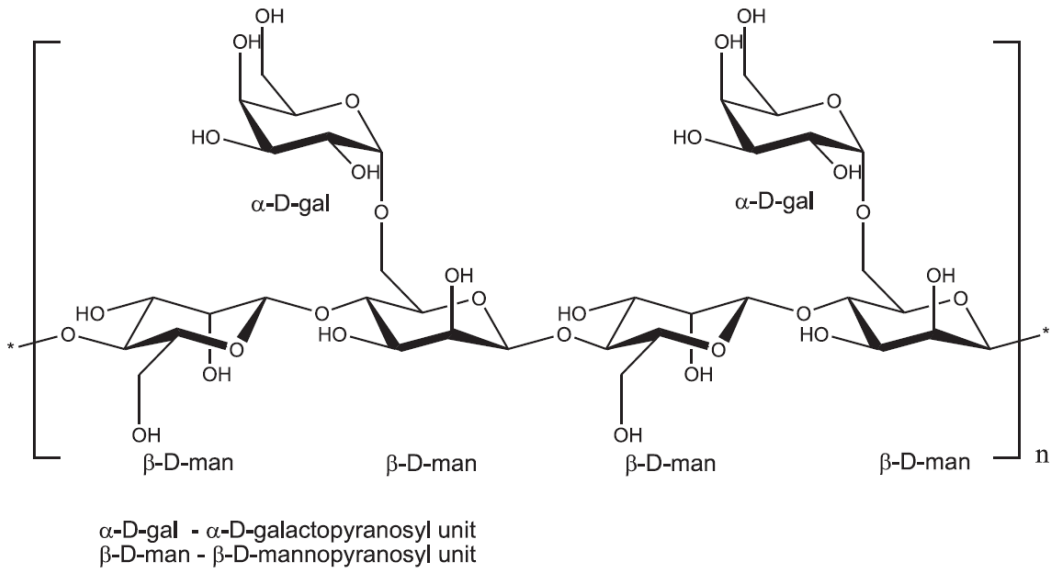


Figure I.16. *Structure de la gomme de guar E412 (EFSA ANS Panel et al. 2017)*

Néanmoins, à ces concentrations élevées en polymère et selon la fraction volumique d'huile, des phénomènes de floculation par déplétion peuvent conduire à la déstabilisation d'émulsion (Blijdenstein *et al.* 2003). Les polymères plus gros que l'espace entre les gouttelettes sont exclus de cette zone et conduisent à une phase aqueuse riche en polysaccharides exerçant une pression osmotique pouvant mener à l'agrégation de gouttelettes lipidiques ; il se produit alors une séparation de phase entre la fraction riche en lipides et la fraction riche en polysaccharides de l'émulsion (van Aken 2006). Cela peut mener à une déstabilisation plus rapide par rapport à la gravité (crémage) ou conduire à la formation d'un réseau de gouttelettes agrégées comme présenté en ***Figure I.12c***.

L'ensemble des constituants présents dans une émulsion h/e et leur répartition dans les différents compartiments du système peuvent être représentés sur le schéma proposé ***Figure I.17*** (Berton-Carabin *et al.* 2014).

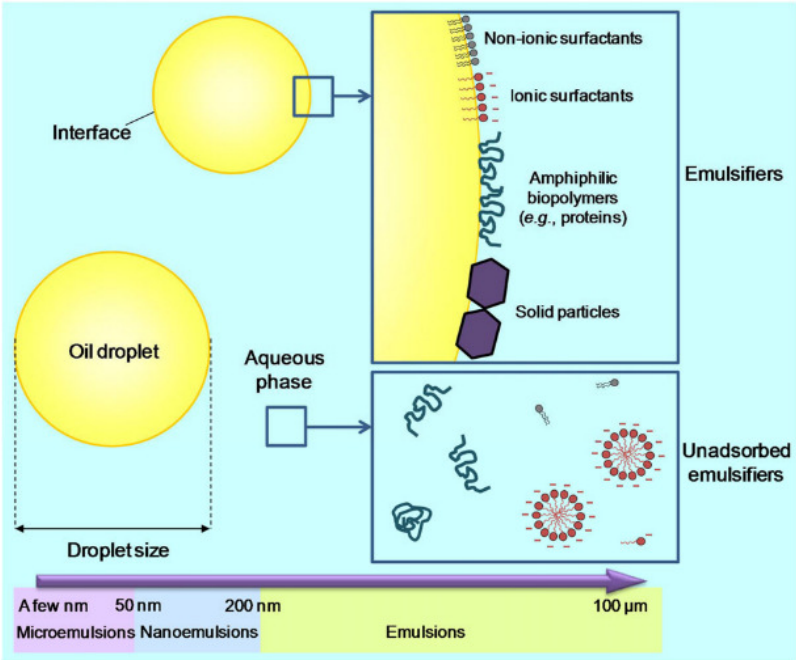


Figure I.17. *Représentation schématique des principaux compartiments et composants d'une émulsion h/e ainsi que les différentes gammes de tailles de particules (Berton-Carabin et al. 2014)*

I.1.3.2. Paramètres influençant l'oxydation des lipides en émulsion

Exceptés quelques travaux indiquant une oxydabilité moins importante des acides gras polyinsaturés en émulsion que dans une huile (Belhaj *et al.* 2010; Gotoh *et al.* 2010; Berton-Carabin *et al.* 2014), la plupart des études montrent des cinétiques d'oxydation plus rapides et/ou plus précoces (***Figure I.18***) dans ces systèmes (Berton-Carabin *et al.* 2014; Decker *et al.* 2017). Cette différence de réactivité s'explique par l'organisation du système en différentes phases (lipidique, aqueuse, interface) et la répartition des constituants au sein de ces différents compartiements, mais également par la présence d'un nombre plus important de molécules susceptibles d'intervenir dans les mécanismes réactionnels mis en jeu.

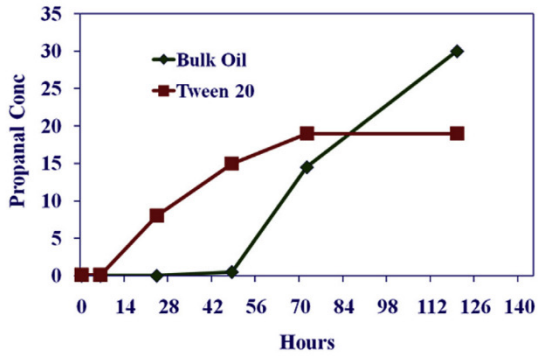


Figure I.18. *Cinétique de formation du propanal (mmol/kg d'huile), produit d'oxydation des lipides, dans une huile d'algue en phase continue ou émulsifiée en présence de Tween 20 (Decker et al. 2017)*

I.1.3.2.1. Les sites de réaction dans un système émulsionné

Il est communément admis qu'en émulsion, l'oxydation des lipides va être initiée au niveau de l'interface, d'une part car il s'agit d'une zone de contact entre les acides gras insaturés, l'oxygène dissous et les métaux, et d'autre part car les produits d'oxydation formés tels que les LOOH, LOO• ou LO• vont avoir tendance à se positionner à l'interface compte tenu de leur polarité plus élevée, voire à se retrouver dans la phase aqueuse (Decker *et al.* 2017; ***Figure I.19***). Une fois à l'interface, les hydroperoxydes peuvent interagir avec les métaux, particulièrement importants dans l'induction des réactions d'oxydation en émulsion (Frankel *et al.* 2002). Compte tenu du nombre de paramètres qui entrent en jeu, il est souvent difficile d'isoler l'effet de tel ou tel paramètre (Berton-Carabin *et al.* 2014).

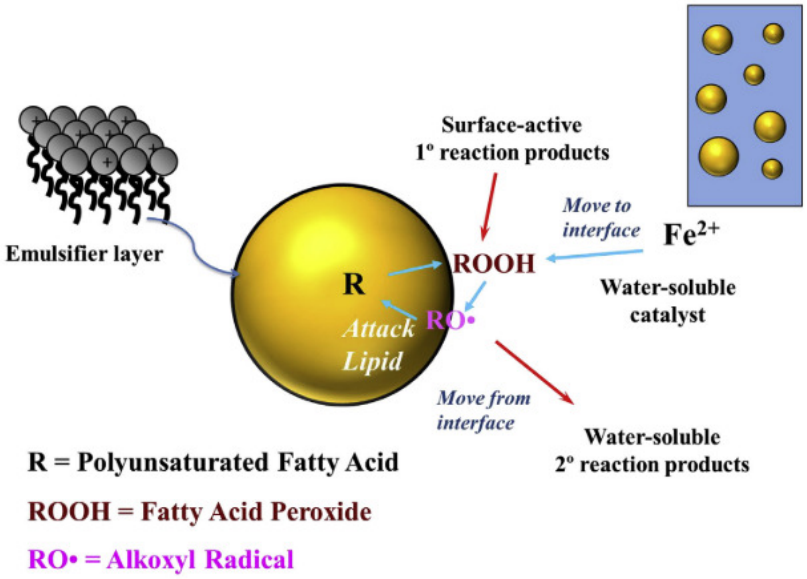


Figure I.19. *Proposition de représentation schématique des mécanismes d'oxydation des lipides dans une émulsion h/e (Decker et al. 2017)*

I.1.3.2.2. Les conséquences sur la solubilité et la charge des constituants du pH de la phase aqueuse

Le pH de la phase aqueuse joue un rôle très important dans l'oxydation des lipides. En effet, le pH influe sur la charge, la solubilité, la répartition, l'état redox et la stabilité chimique de nombreuses molécules impliquées dans l'oxydation des lipides telles que les métaux, les antioxydants et les émulsifiants. Plusieurs mécanismes sous-jacents étant impliqués, il est difficile de généraliser et finalement, la diminution du pH peut avoir à la fois un effet négatif et positif sur l'oxydation des lipides (Waraho *et al.* 2011; Berton-Carabin *et al.* 2014). Parmi les principaux mécanismes, le pH influence la **solubilité des métaux** : lorsque le pH diminue, leur

solubilité augmente et cela pourrait accroître l'oxydation des lipides ; au contraire, le passage d'un pH acide à un pH neutre diminuerait leur solubilité, ce qui pourrait provoquer leur précipitation directement à la surface des gouttelettes lipidiques et accroître également l'oxydation (Waraho *et al.* 2011; Berton-Carabin *et al.* 2014). Dans le cas d'une stabilisation de l'interface par des agents tensio-actifs ioniques, le pH influence la **charge de surface de l'interface**. Cette charge de surface a longtemps été décrite comme l'un des principaux facteurs gouvernant l'oxydation des lipides en émulsion, bien que de nombreux résultats contradictoires aient été reportés. Les interfaces chargées positivement permettraient de repousser les cations métalliques, limitant l'oxydation (Kellerby *et al.* 2006) alors que celles chargées négativement les attireraient, favorisant l'oxydation (Mei *et al.* 1998). Néanmoins, il a été rapporté que les interfaces composées d'émulsifiants chargés négativement pouvait limiter l'oxydation, et que cela était probablement dû aux propriétés chélatrices de ces émulsifiants (Hu *et al.* 2003; Sørensen *et al.* 2008). Enfin, l'étude de Berton *et al.* (2011b) montre une faible corrélation entre la charge des gouttelettes et la stabilité de l'émulsion vis-à-vis de l'oxydation, probablement car de nombreux autres facteurs entrent en jeu (solubilité des métaux, part non adsorbée des émulsifiants, etc.). Le pH affecte également la **charge des émulsifiants non adsorbés** (Waraho *et al.* 2011; Berton-Carabin *et al.* 2014) et jouerait notamment sur l'activité chélatrice des protéines tensioactives non adsorbées présentes dans la phase aqueuse. Au delà de leur pI (de l'ordre de 4 pour bon nombre d'entre elles), les protéines alimentaires, chargées négativement, favoriseraient l'attraction et la chélation des métaux (fer, cuivre) dans la phase aqueuse, limitant ainsi leur rôle inducteur de l'oxydation des lipides ; à l'inverse, lorsque le pH est plus faible, elles sont chargées positivement, ce qui diminuerait leur activité chélatrice et favoriserait la répulsion des métaux ; ces derniers étant plus solubles, cela favoriserait l'oxydation (Berton-Carabin *et al.* 2014). L'influence spécifique de la nature et de la charge des émulsifiants, qu'ils soient adsorbés ou non à l'interface, fait l'objet des paragraphes suivants.

I.1.3.2.3. L'influence de la surface de l'interface

Ce paramètre est intimement lié à la taille des gouttelettes lipidiques : pour une même quantité d'huile, plus les gouttelettes sont petites, plus la surface de l'interface est importante. Ainsi, il semble logique de postuler que, plus la surface de l'interface est grande, plus les réactions d'oxydation sont favorisées car la surface de contact entre les lipides, l'oxygène dissous et les métaux est plus importante (Berton-Carabin *et al.* 2014). Néanmoins, même si plusieurs études vont dans ce sens (Lethuaut *et al.* 2002; Lee *et al.* 2011), ceci est difficile à démontrer car faire varier la taille des gouttelettes dans une émulsion s'accompagne d'une modification de la part

adsorbée / non adsorbée des émulsifiants. Pour une même quantité d'émulsifiants, la diminution de la taille des gouttelettes lipidiques entraîne une diminution de la part non-adsorbée des émulsifiants et, dans le cas de protéines, cela diminuerait l'inhibition de l'oxydation (Berton-Carabin *et al.* 2014). A l'inverse, d'autres études montrent que la diminution de la taille des gouttelettes n'aurait pas d'influence (Dimakou *et al.* 2007), limiterait l'oxydation des lipides (Atarés *et al.* 2012), ou encore que cela dépendrait de la nature de l'huile utilisée (Azuma *et al.* 2009).

I.1.3.2.4. L'influence de la nature et de la charge des émulsifiants

En fonction de l'émulsifiant utilisé, les caractéristiques physico-chimiques de l'interface varient et peuvent ainsi moduler l'oxydation des lipides en émulsion.

La charge des émulsifiants, comme évoqué précédemment, va également jouer un rôle sur ces réactions, variable selon les études. Certaines études montrent en effet que les protéines adsorbées à l'interface, capables de chélater les métaux de la phase aqueuse, limitent la propagation de l'oxydation en empêchant les métaux d'interagir avec les hydroperoxydes (Tong *et al.* 2000; Faraji *et al.* 2004; Elias *et al.* 2005; Sørensen *et al.* 2007; Guzun-Cojocaru *et al.* 2011). Certaines protéines seraient également capables de piéger les radicaux issus de l'oxydation des lipides, du fait de la présence de résidus tryptophanyles, cystéyles, méthionyles et tyrosyles (Faraji *et al.* 2004; Elias *et al.* 2005) ; ces groupements devant être exposés pour exercer leur activité, la structure tertiaire des protéines sera également importante (Elias *et al.* 2005).

Les caractéristiques physiques des interfaces sont aussi des facteurs d'influence. Les émulsifiants (protéines, surfactants) peuvent en effet former des interfaces d'épaisseur et de compacité variables, ce qui modulerait l'accessibilité à la phase lipidique des espèces pro-oxydantes issues de la phase aqueuse, *via* des paramètres tels que la taille de la tête hydrophile et la longueur de la queue hydrophobe de ces surfactants ou l'organisation dans l'espace des protéines (Berton-Carabin *et al.* 2014). Il est difficile de comparer l'effet des protéines et des surfactants car de nombreux facteurs entrent en jeu, notamment la part non adsorbée de ces molécules. La plupart des études montrent une stabilité à l'oxydation plus importante des émulsions formulées avec des protéines qu'avec des surfactants (Tweens, lécithines) (Donnelly *et al.* 1998; Haahr & Jacobsen 2008), mais les milieux considérés contiennent toujours une part importante d'émulsifiants non adsorbés à l'interface. Dans le peu d'études où la part d'émulsifiants non adsorbés est minimisée, les émulsions avec protéines semblent moins oxydables que celles avec surfactants (Berton *et al.* 2011b). Ceci s'expliquerait par les

caractéristiques physiques des films formés à l'interface, plus homogènes et compacts dans le cas des surfactants et plus hétérogènes et poreux avec les protéines (Berton-Carabin *et al.* 2014). Plusieurs phénomènes sont à l'origine de cette constatation : i) la surface d'interface couverte par les protéines est plus faible (30-40% de la surface totale) que celle couverte par les surfactants (100%) puisque, dans le cas des protéines, seule une partie de la chaîne polypeptidique est réellement en contact direct avec l'interface (Dickinson 1992); ii) les surfactants s'organiseraient en mono-couches d'épaisseur comprise entre 0,5 et 1 nm alors que les protéines formeraient des interfaces plus épaisses (mono-couches de 1 à 15 nm) (Singh 2011) ou pourraient former des multi-couches par interaction entre les protéines en excès et les protéines adsorbées (Berton-Carabin *et al.* 2014) ; iii) certains surfactants formeraient des interfaces fluides contrairement aux protéines qui formeraient des interfaces viscoélastiques (Wilde *et al.* 2004).

I.1.3.2.5. Le rôle des émulsifiants non adsorbés à l'interface

D'après la revue de Berton-Carabin *et al.* (2014), que ce soit pour des émulsifiants de nature protéique ou des surfactants, de nombreuses études ont montré que leur présence dans la phase aqueuse avait une influence importante sur la réactivité chimique des émulsions (Donnelly *et al.* 1998; Nuchi *et al.* 2002; Richards *et al.* 2002; Faraji *et al.* 2004; Almajano *et al.* 2007; Panya *et al.* 2012). En effet, la présence d'émulsifiants en excès pourrait limiter l'oxydation des lipides (***Figure I.20***) (Berton *et al.* 2011a).

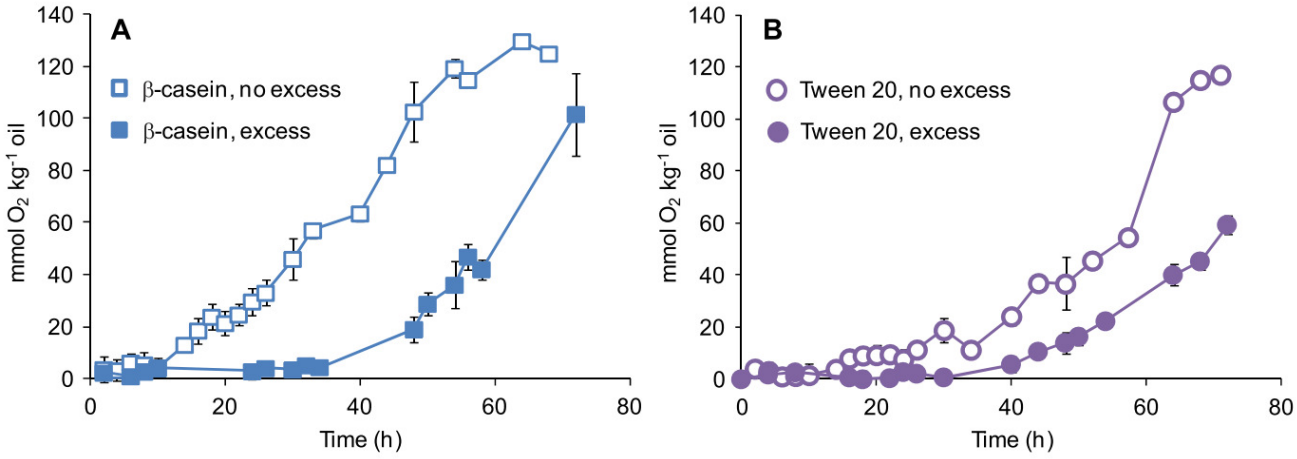


Figure I.20. *Evolution de l'oxydation des lipides par suivi de la consommation en oxygène dans des émulsions à base d'huile de colza stabilisées par différents émulsifiants (A-caseine β, B-Tween 20) (Berton, et al. 2011a; Berton-Carabin et al. 2014)*

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène : i) comme évoqué précédemment, les protéines non adsorbées chélateraient les métaux de la phase aqueuse et les empêcheraient d'atteindre l'interface, évitant ainsi que les hydroperoxydes présents à l'interface propagent l'oxydation, ou elles piégeraient les radicaux libres présents dans la phase aqueuse ($HOO^{\bullet}$ par exemple) et/ou issus de l'oxydation des lipides (Tong *et al.* 2000; Faraji *et al.* 2004; Elias *et al.* 2005; Sørensen *et al.* 2007; Guzun-Cojocaru *et al.* 2011) ; ii) les surfactants, au-delà de leur concentration micellaire critique (CMC), se trouvent dans la phase aqueuse sous forme de micelles et pourraient soit piéger des hydroperoxydes, limitant ainsi l'oxydation en éloignant physiquement ces molécules des gouttelettes lipidiques (Cho *et al.* 2002; Nuchi *et al.* 2002;), soit à l'inverse transférer des produits d'oxydation d'une gouttelette lipidique présentant un stade avancé d'oxydation vers une autre gouttelette moins oxydée (Raudsepp *et al.* 2014), ces micelles étant des structures très dynamiques (Decker *et al.* 2017).

I.1.3.3. Paramètres influençant l'activité des antioxydants en émulsion

I.1.3.3.1. L'influence de la localisation des antioxydants dans l'émulsion et sur leur réactivité et leur efficacité

Dans les années 80, Porter et son équipe ont été les premiers à proposer une règle générale qui décrit l'efficacité des antioxydants dans différents milieux : il s'agit du **paradoxe polaire**. Cette règle postule que les antioxydants polaires seraient plus actifs que leurs homologues apolaires dans un milieu constitué uniquement d'huile alors que les antioxydants apolaires seraient plus actifs dans les émulsions h/e ou les liposomes (Porter 1980). En 1994, Frankel *et al.* proposent une théorie expliquant ces observations empiriques : le paradoxe polaire serait dû à un phénomène interfacial (Frankel *et al.* 1994). Ainsi, dans une émulsion h/e, les antioxydants apolaires se localiseraient à l'interface huile/eau, où se produiraient les réactions d'oxydation, et inhiberaient ainsi plus efficacement l'oxydation que les antioxydants polaires, localisés dans la phase aqueuse. A l'inverse, dans une huile, les antioxydants polaires pourraient migrer et se localiser à l'interface air/huile où l'oxydation est prépondérante alors que les antioxydants apolaires seraient solubilisés dans l'huile et ainsi moins efficaces pour limiter l'oxydation (Frankel *et al.* 1994). Si l'application de ce paradoxe polaire a été validée par de nombreuses études et est toujours d'actualité, des études plus récentes sont venues le nuancer, considérant le lien entre l'**hydrophobicité** de la molécule et son activité antioxydante en émulsion (Laguerre *et al.* 2015). Pour étudier uniquement l'effet de l'hydrophobicité, il est important de travailler sur des molécules présentant toujours le(s) même(s) groupement(s) phénolique(s)

actif(s) auxquels on conjugue une chaîne hydrocarbonée de différentes longueurs : il s'agit des phénolipides (Laguerre *et al.* 2010). Ainsi, Laguerre *et al.* ont pu montrer sur différents dérivés alkyls de l'acide chlorogénique que l'augmentation de la longueur de chaîne augmentait l'activité antioxydante en émulsion jusqu'à une certaine limite (appelée longueur de chaîne critique ou LCC, « critical chain length » ou CCL en anglais), au-delà de laquelle l'activité antioxydante chutait (Laguerre *et al.* 2009). Ce qu'ils ont tout d'abord appelé « hypothèse de non linéarité » a également été montré sur d'autres composés phénoliques dont ils ont fait varier le type de substituant dans différentes émulsions (Medina *et al.* 2009; Panya *et al.* 2012). Ce phénomène a ensuite été renommé **« cut-off effect »**, en lien avec un phénomène également constaté dans d'autres activités biologiques (dont l'activité antimicrobienne). Si jusqu'à la LCC, le paradoxe polaire s'applique, plusieurs hypothèses ont été suggérées pour expliquer le rôle de ce phénomène sur l'activité antioxydante au-delà de la LCC, dont les hypothèses d'internalisation (les phénolipides à longues chaînes sont localisés au centre de la gouttelette, loin de l'interface) et d'agrégation (les phénolipides à longues chaînes pourraient s'organiser sous forme de micelles dans la phase aqueuse) schématisées sur la ***Figure I.21,*** et l'hypothèse de la mobilité réduite (les phénolipides à longues chaînes se déplacent plus lentement vers des sites où l'oxydation a lieu) (Laguerre *et al.* 2015).

Dans leur revue, Decker *et al.* (2017) montrent bien que dans plusieurs études, des **antioxydants très polaires** apparaissent efficaces pour limiter l'oxydation d'émulsions malgré leur très faible solubilité dans la phase lipidique (Di Mattia *et al.* 2009; Zhou & Elias 2012; Liu *et al.* 2016). Ceci s'expliquerait par la capacité de ces antioxydants à piéger les radicaux libres à l'interface des gouttelettes lipidiques ou dans la phase aqueuse (espèces oxygénées réactives, dont celles issues de l'oxydation des lipides), par leur capacité à chélater les métaux dans la phase aqueuse ou par leur capacité à régénérer les antioxydants oxydés à l'interface (Decker *et al.* 2017). Dans une démarche de méta-analyse exploitant 180 publications, Decker *et al.* (2017) ont tenté d'établir une corrélation entre le pourcentage de surface d'interface couverte par les composés antioxydants et l'efficacité antioxydante mesurée. Pour cela, ils ont calculé le pourcentage de surface d'interface couverte théoriquement en faisant deux hypothèses : i) les antioxydants se comportent comme des sphères (monodisperses) dont on peut calculer le volume occupé et ii) la totalité des antioxydants introduits se localiserait à l'interface. Il en ressort que dans de nombreuses études, une efficacité antioxydante significative est observée bien que la couverture de la surface d'interface par les antioxydants ne dépasse pas 10%, voire n'atteigne pas 1% dans certains cas. Ceci conforte bien l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de l'oxydation des lipides serait aussi due à la capacité des antioxydants à piéger des radicaux

libres dans d'autres compartiments qu'à l'interface (Decker *et al.* 2017). Mieux connaître la localisation des antioxydants, et notamment des composés phénoliques, reste donc un élément essentiel pour comprendre et prédire leur activité.

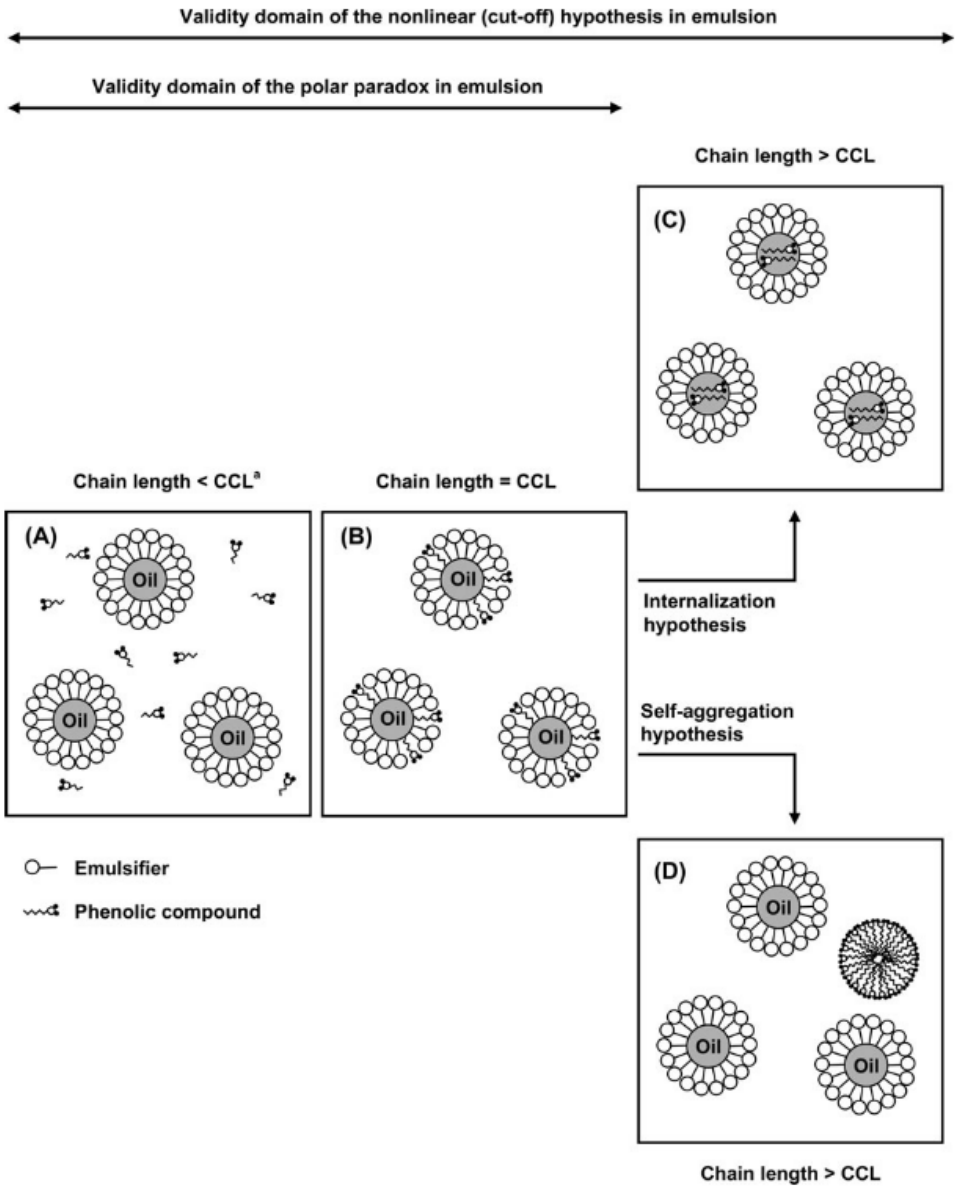


Figure I.21. *Proposition de représentation schématique de la distribution des antioxydants dans un système émulsifié (Laguerre et al. 2015)*

Le partage d'un antioxydant entre les phases aqueuse et lipidique est décrit par un coefficient de partage à l'équilibre (K) et dépend de l'affinité thermodynamique des molécules pour les deux phases. Dans les émulsions, ce sont principalement les interactions hydrophobes qui régissent cette répartition. A de faibles concentrations en antioxydants, le coefficient de partage s'exprime par $K_{OW} = c_O/c_W$, avec c_O la concentration dans l'huile et c_W la concentration dans

l'eau. Néanmoins, ces données de partage huile/eau ont une utilisation limitée en émulsion car elles ne prennent pas en compte l'interface (Decker *et al.* 2017). Il existe des équations permettant de décrire cette fraction d'antioxydants qui s'accumule à l'interface, mais les coefficients de partage interface/eau et interface/huile sont difficiles à obtenir expérimentalement. Néanmoins, des méthodes de détermination de cette fraction existent, utilisant des sondes interfaciales radioactives (Sengupta & Damodaran 1998) ou spectrophotométriques couplées au modèle pseudo-phase (Losada-Barreiro *et al.* 2013; Romsted & Bravo-Díaz 2013). Il existe également une autre approche consistant à décrire l'adsorption des antioxydants aux interfaces avec l'Isotherme d'Adsorption de Langmuir dans laquelle un antioxydant peut être décrit par son activité interfaciale, sa pression interfaciale à saturation et sa charge interfaciale, données accessibles par des mesures de tensiométrie (Decker *et al.* 2017).

I.1.3.3.2. L'influence des émulsifiants sur l'efficacité des antioxydants

Les émulsifiants utilisés pour stabiliser les émulsions peuvent également avoir un impact important sur l'efficacité des antioxydants, dépendant de leur localisation et de certaines de leurs propriétés (nature, charge, etc.) (Decker *et al.* 2017). Leur rôle est difficile à appréhender car ils peuvent aussi influencer l'oxydation des lipides comme évoqué précédemment (cf § I.1.3.2.4 et I.1.3.2.5). Peu de recherches existent sur ce sujet. L'étude de Stöckmann *et al.* (2000) montre que l'acide gallique est un antioxydant relativement efficace en émulsion lorsque l'émulsifiant utilisé est la lécithine de soja partiellement hydrolysée, alors qu'il a un comportement pro-oxydant en présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS) ou de Brij 58 (polyoxyethylene 20 cetyl ether). Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre ces observations, et en particulier comment la nature de l'émulsifiant influence la localisation et la réactivité des antioxydants et pro-oxydants (Decker *et al.* 2017). A cette complexité s'ajoute la possibilité pour les surfactants de former des micelles qui ont un impact sur l'efficacité des antioxydants. Ainsi, les antioxydants amphiphiles ou apolaires peuvent être piégés dans les micelles de surfactants. Ce sont des structures dynamiques qui peuvent faciliter le transfert des composés d'une phase à une autre (Decker *et al.* 2017), jouant ainsi sur l'oxydation des lipides (cf § I.1.3.2.5). Quelques études se sont intéressées à l'effet de l'augmentation du nombre de micelles de surfactants dans la phase aqueuse sur l'activité antioxydante de composés phénoliques et de phénolipides (Oehlke *et al.* 2010; Panya *et al.* 2012; Kiralan *et al.* 2014). Elles ont montré que la présence d'un nombre plus important de micelles provoquait l'augmentation de la concentration en antioxydants dans la phase aqueuse

et en parallèle l'augmentation de l'activité antioxydante de ces composés (Oehlke *et al.* 2010; Panya *et al.* 2012; Kiralan *et al.* 2014). Les micelles pourraient ainsi agir comme des réservoirs d'antioxydants, ces derniers pouvant remplacer les antioxydants oxydés dans les gouttelettes lipidiques (Laguerre *et al.* 2015).

I.2. LE ROLE ANTIMICROBIEN DES COMPOSES PHENOLIQUES VIS-A-VIS DU DEVELOPPEMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

I.2.1. Présentation de *L. monocytogenes*

Mise en évidence au début du XXè siècle, *Listeria monocytogenes* appartient au genre *Listeria* qui se place dans le phylum des firmicutes, la classe des *Bacilli*, et la famille des *Listeriaceae*. Parmi les 17 espèces de ce genre, seules *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont pathogènes, la première pour l'Homme et les animaux, la deuxième pour les animaux et rarement pour l'Homme (Piveteau 2017).

L. monocytogenes est un bacille à Gram positif de dimensions 0,5 à 2 µm de longueur et 0,5 µm de largeur, pouvant se présenter isolé ou en chaînettes (***Figure I.22***). Cette bactérie est non sporulée, anaérobie facultative, et motile à des températures inférieures à 37°C grâce à ses flagelles péritriches (répartis sur toute la surface cellulaire) (Piveteau 2017).

Figure I.22. *Listeria monocytogenes au Microscope Electronique à Balayage (Micalis, Plateforme Mima2, F. Dubois-Brissonnet/ T. Meylheuc)*

Il existe 13 sérotypes de l'espèce *L. monocytogenes* qui sont basés sur les antigènes somatiques et flagellaires et qui ont été remplacés en 2005 en France par 5 génosérogroupes déterminés par PCR : IIa (sérovars 1/2a et 3a), IIb (sérovars 1/2b et 3b), IIc (sérovars 1/2c et 3c), IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) et L (autres sérovars). Les génosérogroupes IVb puis IIa et enfin IIb sont les plus reliés aux cas humains.

L'ensemble des valeurs cardinales de croissance de *L. monocytogenes* est présenté dans le ***Tableau I.1.*** Parmi les points intéressants, il est à noter que cette bactérie est psychrotrophe et qu'elle peut donc croître aux températures de réfrigération. De plus, elle peut survivre en conditions de saumures retrouvées en alimentaire (Piveteau 2017).

Tableau I.1. *Valeurs cardinales de croissance de Listeria monocytogenes pour quelques facteurs environnementaux (Piveteau 2017)*

Facteur	Minimum	Optimum	Maximum
Température (°C)	-2	30-37	45
pH	4,5	7	9,6
a_w	0,92	0,99	-
NaCl	Croissance jusqu'à 10% - Survie jusqu'à 20%		

Le caractère ubiquitaire de *L. monocytogenes* est une caractéristique importante. L'écologie des souches est complexe et la diversité de leurs habitats est remarquable, d'autant plus que des transferts entre les différents écosystèmes sont avérés : différents types de sols et leurs faunes, plantes et systèmes racinaires, animaux sauvages et de rente, ensilages à fermentation insuffisante, tractus digestif de l'Homme, eaux usées et eaux de surface et enfin, ateliers de production alimentaire (Piveteau 2017).

Parmi les voies de transmission possibles, la voie alimentaire est de loin la plus importante (99% des cas) (Anses 2011). La contamination des aliments par *L. monocytogenes* peut survenir à tous les stades de la chaîne alimentaire (Anses 2011) mais certains aliments sont principalement à considérer comme : les produits laitiers à base de lait cru, les aliments dits prêts à consommer mais aussi les fruits et légumes (Anses 2011; Rodríguez-López *et al.* 2018).

L. monocytogenes est responsable de la maladie appelée listériose, dont il existe deux formes. La forme non-invasive est rare et se manifeste principalement par des gastroentérites fébriles. La forme invasive touche majoritairement une population dite sensible, à savoir les femmes enceintes (forme materno-néonatale), les personnes âgées de plus de 80 ans et les personnes souffrant déjà de pathologies ou immunodéprimées (forme non materno-néonatale) (Anses 2011). Les principaux symptômes de la forme non materno-néonatale sont des septicémies, des méningites pouvant entrainer des complications telles que des séquelles neurologiques, des infections locales, voire la mort dans 20 à 30% des cas (Anses 2011). Les principaux symptômes de la forme materno-néonatale sont un état pseudo-grippal, un avortement spontané, la mort *in utero*, la prématurité et des infections néo-natales, avec des taux de létalité de 20% chez les nouveaux nés (Anses 2011). La listériose est caractérisée par une durée moyenne d'incubation très variable, de 2 à 88 j avec une médiane à 17 j pour toutes les formes confondues. La durée des symptomes est de plusieurs jours (Anses 2011).

Le règlement européen (CE) considère différents critères de sécurité pour *L. monocytogenes* en fonction du type d'aliment (CE 2005; CE 2007):

i. les « denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées aux nourrissons et […] destinées à des fins médicales spéciales » doivent respecter le critère « Absence de *L. monocytogenes* dans 25 g de produit » tout au long de la durée de conservation ;

ii. les « denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de *L. monocytogenes*, autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales » doivent respecter le critère « Absence de *L. monocytogenes* dans 25 g de produit » en fin de production mais une tolérance de 100 UFC/g est admise pendant leur durée de conservation ;

iii. les « denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas de développement de *L. monocytogenes*, autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales » ne doivent pas contenir plus de « 100 UFC/g de produit » pendant leur durée de conservation. Les caractéristiques des denrées alimentaires ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes* doivent être garanties tout au long de la conservation et sont les suivantes : $a_w \leq 0.92$, ou pH ≤ 4.4, ou pH < 5 et $a_w \leq 0.94$, ou produit congelé/surgelé, ou produit à durée de vie inférieure à 5 jours, ou justification scientifique.

Ainsi, la réglementation concernant *L. monocytogenes* est particulière. Il s'agit d'une des rares bactéries pathogènes dont la présence est autorisée dans les aliments donc il est particulièrement important de maitriser sa croissance. De plus, la législation considère que toutes les souches de *L. monocytogenes* sont pathogènes. Cependant, les complexes clonaux (définis par MLST) isolés d'échantillons cliniques sont majoritairement distincts de ceux isolés des aliments (Maury *et al.* 2016). Les clones CC121 et CC9 sont les plus souvent associés aux aliments mais très peu aux échantillons cliniques (***Figure I.23***).

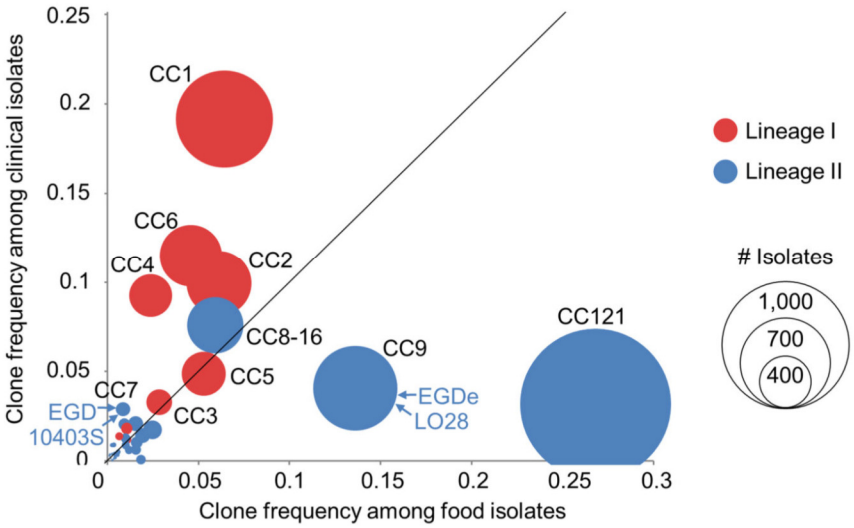


Figure I.23. *Prévalence et distribution des clones MLST dans les échantillons alimentaires et cliniques (Maury et al. 2016)*

I.2.2. Maîtrise de la croissance de *L. monocytogenes*

I.2.2.1. Evaluation de la croissance et modèles primaires

I.2.2.1.1. Les principales phases de la croissance microbienne

Pour les bactéries, la croissance dans les aliments correspond à une multiplication cellulaire. En milieu non renouvelé, les phases de croissance sont les suivantes : la latence, l'accélération, la croissance exponentielle, le ralentissement, la phase stationnaire (immédiate) et la phase de déclin (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). L'évolution de la population bactérienne en fonction du temps, traditionnellement représentée en échelle logarithmique, et les différentes phases associées sont illustrées sur la ***Figure I.24***. Les paramètres principaux caractéristiques de la croissance sont : l'inoculum initial N_0, la durée de la phase de latence lag ou λ, la vitesse maximale spécifique (ou le taux maximal) de croissance μ_{max}, et la population maximale N_{max} (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017).

La phase de croissance exponentielle correspond à une division cellulaire binaire : duplication de l'ADN, répartition des deux ADN aux extrémités de la cellule, septation de la cellule mère et séparation en deux cellules filles (Weiss 2004; Prescott *et al.* 2010). Dans des conditions optimales, le μ_{max} de *Listeria* est de l'ordre de 1,5 h^{-1} (Augustin *et al.* 2005).

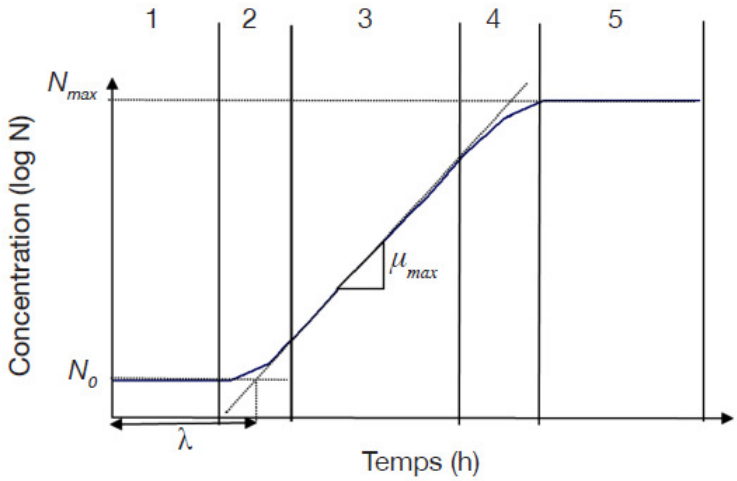


Figure I.24. *Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases (Delhalle et al. 2012)*

I.2.2.1.2. Les méthodes d'évaluation de la croissance microbienne

I.2.2.1.2.1. Le dénombrement en milieu gélosé

Cette méthode consiste classiquement à réaliser des dilutions sériales d'une suspension microbienne puis à étaler ou à inclure un volume précis de suspension diluée sur ou dans un milieu gélosé. Après incubation, les cellules bactériennes sont capables de former des colonies visibles à l'œil nu qui sont comptées. Cette méthode peut être appliquée pour dénombrer des populations dans des milieux liquides ou solides (après étape de mise en suspension). Par ailleurs, elle permet de suivre des cinétiques de croissance et/ou d'inactivation de la population viable cultivable. Néanmoins, les résultats obtenus peuvent sous-estimer le nombre de bactéries réellement présentes dans le milieu car si un amas de cellules est déposé sur le milieu de culture il donnera naissance à une seule colonie (Guillier *et al.* 2017).

I.2.2.1.2.2. La densité optique (DO)

Cette méthode de mesure de la turbidimétrie ou de l'absorbance est une méthode alternative. Elle repose sur le fait que la croissance d'une bactérie dans un milieu limpide provoque un trouble du milieu. Celui-ci est quantifiable par mesure de la DO qui dépend du ratio entre l'intensité de la lumière incidente et transmise. Pour chaque souche bactérienne, et dans une certaine gamme, il existe une relation de proportionnalité entre la DO mesurée et le nombre de cellules bactériennes (Guillier *et al.* 2017). Etant automatisable, cette méthode permet le suivi de nombreuses cinétiques de croissance simultanément. Mais elle n'est adaptée qu'au suivi de croissance et pas à celui de l'inactivation bactérienne car la DO ne chute pas forcément lorsque

les cellules meurent. Par ailleurs, la DO n'est mesurable qu'au-dessus d'un certain seuil de concentration bactérienne, généralement 10^5 à 10^7 bactéries/mL en fonction du microorganisme considéré (Guillier *et al.* 2017).

I.2.2.1.3. Les modèles primaires de croissance

Les modèles primaires permettent la description des cinétiques d'évolution des populations microbiennes en fonction du temps dans des conditions environnementales définies et stables (Guillier *et al.* 2017). L'ajustement de ces modèles aux données expérimentales de croissance permet de déterminer les quatre paramètres précédemment décrits : l'inoculum initial N_0, la durée de la phase de latence lag ou λ, le taux maximal de croissance μ_{max}, et la population maximale $N_{max.}$ Ces modèles peuvent être ajustés directement sur les cinétiques de résultats de dénombrement (Nombre UFC/mL), sur les cinétiques de DO (Dalgaard & Koutsoumanis 2001) ou sur les données de DO transformées selon une relation de calibration entre DO et nombre d'UFC (Augustin *et al.* 1999). Les modèles développés dans la grande majorité des cas sont dits « déterministes » : ils utilisent un jeu unique de valeurs pour les quatre paramètres et s'écrivent selon l'équation $dN/Ndt = \mu_{max} \cdot \alpha(t) \cdot f(N,t)$ avec les fonctions α et f décrivant respectivement les phases d'accélération et de freinage (Guillier *et al.* 2017). Les principaux modèles primaires déterministes utilisés sont les modèles exponentiel, de Gompertz modifié (Zwietering *et al.* 1990), Logistique (Zwietering *et al.* 1990), de Baranyi et Roberts (Baranyi & Roberts 1994), et Logistique avec délai et rupture (Rosso *et al.* 1995), dont les équations sont détaillés dans le ***Tableau I.2***. Pour un même jeu de données expérimentales, les valeurs des quatre paramètres avec chaque modèle sont proches mais légèrement différentes (Augustin *et al.* 1999; Augustin & Carlier 2000). Le modèle exponentiel décrit le début de la croissance par un démarrage brusque et ne prend pas en compte la phase stationnaire. Les modèles de Gompertz et Logistique prennent en compte la fonction de freinage et celui de Baranyi prend en compte à la fois la fonction d'accélération et de freinage.

Tableau I.2. *Principaux modèles primaires déterministes de croissance (Guillier et al. 2017)*

Nom	Equation	Références
Exponentiel	$\ln(N_0), t \leq lag$ $\ln(N_0) \cdot (t - lag), t > lag$	-
Gompertz modifié	$\ln(N_0) + A \cdot \exp(-\exp\left(\frac{\mu_{max} \cdot e}{A}\right) \cdot (lag - t) + 1))$ $A = \ln(N_{max}) - \ln(N_0)$	(Zwietering *et al.* 1990)
Logistique	$\ln(N_0) + \frac{A}{1 + \exp(\frac{4 \cdot \mu_{max}}{A} \cdot (t - lag) + 2)}$ $A = \ln(N_{max}) - \ln(N_0)$	(Zwietering *et al.* 1990)
Baranyi et Roberts	$\ln(N_0) + \mu_{max} \cdot A(t) - \ln(1 + \frac{\exp(\mu_{max} \cdot A(t)) - 1}{N_{max}/N_0})$ $A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \ln(\exp(-\mu_{max} \cdot t) + \exp(-\mu_{max} \cdot t) - \exp(-\mu_{max} \cdot t - \mu_{max} \cdot lag))$	(Baranyi & Roberts 1994)
Logistique avec délai et rupture	$\ln(N_0), t \leq lag$ $\ln(N_{max}) - \ln(1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1\right) \cdot \exp(-\mu_{max} \cdot (t - lag))), t > lag$	(Rosso *et al.* 1995)

Avec N_0 l'inoculum initial, lag la durée de la phase de latence, μ_{max} le taux maximal de croissance, N_{max} la population maximale

I.2.2.2. Facteurs de maitrise de la croissance et modèles secondaires

Il existe un certain nombre de facteurs déterminants pour la croissance microbienne, notamment les facteurs liés à l'environnement physico-chimique du microorganisme. Ceux-ci sont classés en facteurs intrinsèques (lié au produit lui-même) comme par exemple le pH, l'activité de l'eau, la présence de composés antimicrobiens, et en facteurs extrinsèques (liés à sa conservation) comme par exemple la température ou la composition de l'atmosphère (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Pour chacun de ces facteurs, il existe un domaine, propre à chaque microorganisme, permettant la croissance. En dehors de ce domaine, les microorganismes peuvent survivre sans se multiplier ou être inactivés dans certains cas spécifiques. Ces facteurs environnementaux peuvent être utilisés comme facteurs de maitrise des contaminants dans les aliments et l'environnement de production alimentaire (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). L'impact de ces facteurs physico-chimiques sur les paramètres de croissance (μ_{max}, lag, N_{max}) peuvent être décrits par des modèles dits secondaires (Guillier *et al.* 2017).

I.2.2.2.1. Exemple de quatre principaux facteurs de maitrise

I.2.2.2.1.1. La température

Le taux de croissance μ_{max} varie en fonction de la température du milieu extérieur selon une courbe dissymétrique. Les valeurs cardinales : température minimale (T_{min}), température optimale (T_{opt}) et température maximale (T_{max}) sont caractéristiques de chaque microorganisme (***Figure I.25***) (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017) et permettent de définir différentes classes de microorganismes : psychrophiles, psychrotrophes, mésophiles, thermotrophes, thermophiles (Leyral & Vierling 2007). La température de l'environnement se répercute sans régulation sur la température des cellules microbiennes. Elle induit une modification de la fluidité membranaire et influence donc les échanges transmembranaires des ions et des nutriments : les membranes ont tendance à se figer à basse température et à se fluidifier à haute température (Denich *et al.* 2003). La température a également un impact sur la synthèse des protéines (Bornet 2000) et sur la vitesse des réactions enzymatiques (Mescle & Zucca 1996). Il existe plusieurs moyens de conservation associés aux basses températures : la réfrigération, la surgélation et la congélation, qui permettent de ralentir voire inhiber complètement la croissance des microorganismes. Les hautes températures peuvent également être utilisées pour stabiliser voire inactiver une population microbienne (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017).

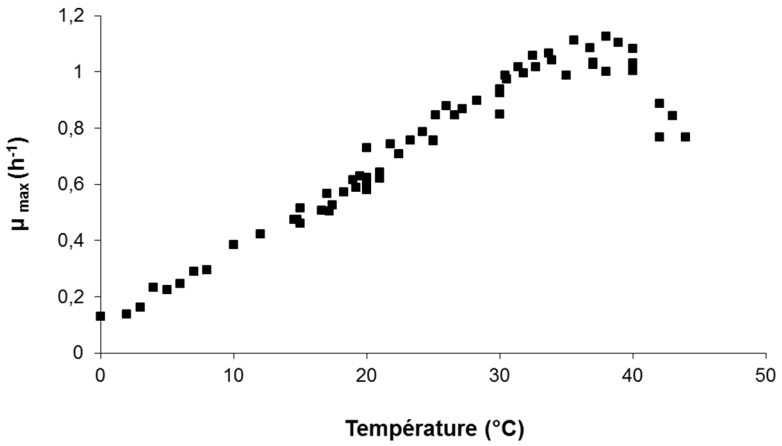


Figure I.25. *Evolution du taux de croissance (μ_{max}) en fonction de la température chez L. monocytogenes (extraction des données de la base internet ComBase)* (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017)

I.2.2.2.1.2. Le pH

Le taux de croissance est dépendant du pH extracellulaire (pH_e). Pour chaque microorganisme, la valeur de μ_{max} en fonction de pH_e peut être représentée par une courbe symétrique autour du pH optimal de croissance (pH_{opt}) (***Figure I.26***) (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Le pH extracellulaire a une influence sur la physiologie bactérienne. En effet, un pH acide ou basique

provoque la complexation des ions métalliques qui ne sont alors plus disponibles pour les réactions enzymatiques. De plus, la saturation des perméases en ions en fonction du pH perturbe la perméabilité membranaire et les échanges transmembranaires (Mescle & Zucca 1996). Toute modification du pH_e entraine également une modification du pH intracellulaire (pH_i) par échange de protons *via* des transporteurs. Celle-ci peut alors inhiber le fonctionnement de certaines enzymes cytoplasmiques et la production d'ATP. Des pH_i bas peuvent aussi dénaturer les molécules d'ADN ou des protéines (Cotter & Hill 2003; Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017).

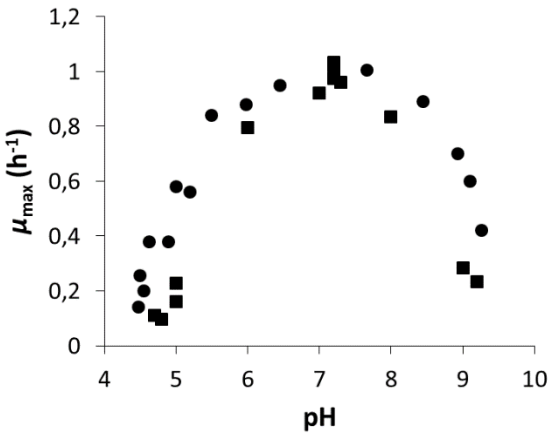


Figure I.26. *Evolution du taux de croissance (μ_{max}) en fonction du pH. Exemple de L. monocytogenes. Données de Le Marc et al. 2002 (ronds) et extraites de la base de données ComBase (carrés) (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017)*

Néanmoins, dans la mesure du possible, la bactérie peut maintenir son pH_i relativement constant et les variations de pH_i ne sont pas aussi importantes que les variations de pH_e. Dans la plupart des milieux alimentaires, le pH_e est acide, neutre ou légèrement alcalin et le pH_i est supérieur au pHe, ce qui permet le fonctionnement de la force proton-motrice et la génération d'énergie (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Les acides forts et les acides faibles ont un mode d'action antimicrobien différent. Lorsque les acides forts (comme l'acide chlorhydrique) sont introduits dans le milieu, ils se dissocient instantanément et n'ont donc un effet antimicrobien qu'à travers la diminution du pH_e. Lorsque les acides faibles (acides propionique, acétique, sorbique, lactique, citrique) sont introduits dans le milieu et que le pH extracellulaire est inférieur au pH intracellulaire, une partie reste sous la forme non-dissociée qui peut traverser passivement la membrane et atteindre le cytoplasme bactérien. Le pH y étant plus élevé, l'acide se dissocie et libère un proton dans le cytoplasme bactérien (***Figure I.27***). L'acidification du cytoplasme a de nombreuses conséquences : les fonctions enzymatiques, l'ADN et les protéines sont endommagées et l'efflux nécessaire de protons consomme de grandes quantités d'ATP,

conduisant à une perte d'énergie, une inhibition de la croissance voire la mort cellulaire (Lambert & Stratford 1999; Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). La majorité des acides organiques a une action uniquement lié à la forme non dissociée mais il a été montré que l'acide sorbique par exemple pouvait avoir une activité antimicrobienne *via* leur forme dissociée (Eklund 1983; Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Le mécanisme d'action des formes dissociées serait complexe et pourrait être due à une inhibition de certaines étapes de formation de l'enveloppe et de la division cellulaire, du transport des substrats à travers la membrane et de certaines enzymes clés (Sofos *et al.* 1986). Ainsi, pour une même diminution de pH_e, les acides faibles sont plus efficaces que les acides forts (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017).

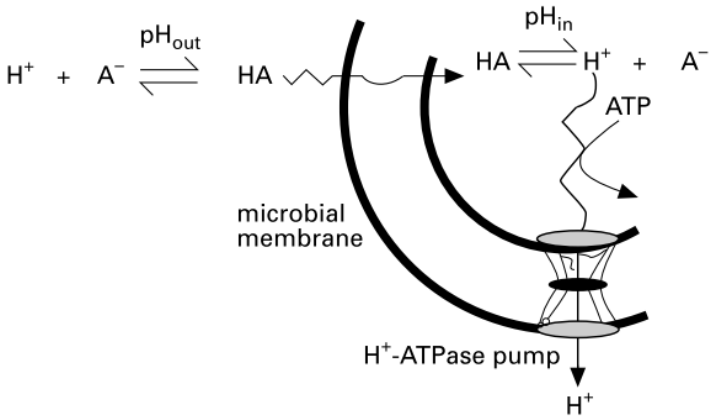


Figure I.27. *Mode d'action des acides faibles et importance de la forme non dissociée (Lambert & Stratford 1999)*

I.2.2.2.1.3. L'activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) est un facteur qui définit la disponibilité en eau d'un milieu : c'est un nombre sans dimension compris entre 0 (eau liée) à 1 (eau libre). C'est un moyen de maitrise de la croissance microbienne car la multiplication cellalaire nécessite de l'eau disponible (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Contrairement à l'effet de la température ou du pH, la courbe représentant le taux de croissance en fonction de l'activité de l'eau n'est pas une courbe en cloche: l'a_{wopt} est très proche voire identique à l'$a_w$max. L'$a_w$min est dépendante du microorganisme considéré: l'a_{wmin} est comprise dans l'intervalle 1-0,95 pour de nombreux bacilles à Gram négatif, *Clostridium botulinum* et les spores bactériennes ; 0,95-0,91 pour de nombreuses bactéries à Gram positif, *Salmonella* et *Fusarium* ; 0,87-0,80 pour *Staphylococcus aureus* et de nombreuses moisissures ; 0,80-0,65 pour les moisissures dites xérotolérantes ou xérophiles. Aucun développement microbien n'est possible en dessous de 0,6 (Branger *et al.* 2007; Leyral & Vierling 2007). L'impact de ce facteur est lié au fait que l'eau libre participe

aux nombreuses réactions biologiques (Mescle & Zucca 1996), permet l'ionisation des molécules, la polarisation des membranes ainsi que l'hydratation et l'activité des protéines et acides nucléiques (Branger *et al.* 2007). Dans un milieu à faible activité de l'eau, la pression osmotique du milieu extérieur est supérieure à celle du cytoplasme et l'eau s'échappe alors de la cellule pour rétablir un équilibre osmotique (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Différents moyens de conservation sont associés à une baisse d'a_w : le séchage, la lyophilisation, la déshydratation, la déshydratation osmotique, le confisage, le salage, le saumurage et la congélation-surgélation (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017).

I.2.2.2.1.4. Les conservateurs

Un autre facteur important de maitrise de la croissance microbienne dans les aliments est l'utilisation de conservateurs, molécules aux propriétés antimicrobiennes dont il existe plusieurs familles. Tout d'abord, il y a les acides organiques et leurs sels dont le mode d'action a été détaillé précédemment : l'acide sorbique (E200) et les sorbates de sodium, potassium et calcium (E201-203), l'acide benzoïque (E210), les benzoates et p-hydroxybenzoates (E211-219), l'acide propionique (E280) et les propionates (E281-283), l'acide acétique (E260) et les acétates (E261-263) (Carocho *et al.* 2014; Silva & Lidon 2016). Ils sont principalement utilisés dans les aliments à pH acide. Les nitrates et nitrites (E249-252) sont couramment utilisés pour inhiber la croissance de *C. botulinum* dans les aliments à base de viande crue (Silva & Lidon 2016; Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Leur effet antimicrobien est principalement dû à l'inhibition des protéines fer-soufre (ferredoxine) nécessaires au métabolisme énergétique de *C. botulinum* (Cammack *et al.* 1999; Milkowski *et al.* 2010). Le dioxyde de souffre (E220) et les sulfites (E221-224 et 226-228) sont principalement utilisés dans l'élaboration du vin (Silva & Lidon 2016). Il existe également des conservateurs naturels : c'est le cas des huiles essentielles, dont certaines sont autorisées dans les aliments comme composés aromatiques par l'Union Européenne (UE 2012). Les plus utilisées sont les huiles d'écorce d'agrume, de menthe poivrée, d'eucalyptus et de citronnelle (Carson & Hammer 2011). Les principaux freins à leur utilisation sont leur fort pouvoir aromatique et leur faible solubilité dans l'eau (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Ces huiles essentielles sont généralement des mélanges complexes d'une centaine de petites molécules volatiles dont les natures chimiques sont très variées : terpènes (monoterpènes, diterpènes, sesquiterpènes) et phénylpropanoïdes (acides cinnamiques, aldéhydes cinnamiques, coumarines, flavonoïdes) (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Parmi ces molécules, les composés phénoliques simples, tels que les carvacrol, thymol et eugénol sont généralement les plus efficaces (Holley & Patel 2005). D'autres constituants

des huiles essentielles non phénoliques sont également très efficaces : *p*-cymene, carvone, cinnamaldehyde, terpinene (Burt 2004). Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est principalement dû à leurs propriétés d'hydrophobicité et au faible poids moléculaire de leurs constituants qui peuvent s'intercaler dans la membrane bactérienne (Burt 2004). Les mécanismes d'action antimicrobiens des composés phénoliques seront plus amplement détaillés dans le paragraphe I.2.3.1.

L'activité antimicrobienne de conservateurs sur une souche peut correspondre soit à une activité inhibitrice de croissance soit à une activité bactéricide. La première est caractérisée par la détermination de la **concentration minimale inhibitrice (CMI)**, c'est à dire la concentration au-delà de laquelle la croissance de la souche est totalement inhibée (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Un autre paramètre important à considérer dans ce cas est la concentration non inhibitrice (CNI), concentration en dessous de laquelle le composé n'a aucun effet sur la croissance du microorganisme. L'activité bactéricide correspond à la capacité de conservateurs à inactiver, voire à détruire, les microorganismes. Elle peut être évaluée par la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB). Selon la norme européenne EN 1040, la CMB est la plus petite concentration capable d'entrainer la réduction de 5 $\log_{10}$ d'une population de 10^8 cellules/mL en 5 min à 20°C (CE 1997).

L'efficacité de différentes familles de conservateurs peut être comparée. Par exemple, il a été montré que les composés purs issus d'huiles essentielles présentaient des CMI vis-à-vis de *Salmonella* Typhimurium environ 10 fois plus faibles que les acides organiques (Nazer *et al.* 2005) et environ 500 fois plus faibles que leurs sels (Guillier *et al.* 2007).

I.2.2.2.2. Les modèles secondaires pour déterminer le taux de croissance

Les modèles secondaires permettent de décrire l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres des modèles primaires de croissance, à savoir la phase de latence et le taux de croissance. Deux approches distinctes existent : les facteurs environnementaux peuvent être pris en compte simultanément dans des modèles polynomiaux ou l'impact de chaque facteur peut être modélisé de façon indépendante avant que l'ensemble des facteurs soit combiné dans une approche progressive dite de « gamma concept » (Guillier *et al.* 2017).

Les **modèles polynomiaux** sont des modèles empiriques faciles à ajuster aux données expérimentales. Ils utilisent généralement des polynômes de second degré incluant les interactions entre les facteurs et un terme d'erreur (équation 2). Ils sont caractérisés par un grand nombre de paramètres n'ayant aucune signification biologique et ne sont pas extrapolables en dehors des plages expérimentales. Ils restent néanmoins très utilisés (Guillier *et al.* 2017).

$\mu_{max} = a_1 + a_2.T + a_3.pH + a_4.[NaCl] + a_5.T.pH + a_6.T.[NaCl] + a_7.pH.[NaCl] + a_8.T^2 + a_9.pH^2 + a_{10}.[NaCl]^2 + \varepsilon$ (équation 2)

Un exemple d'application est illustré en ***Figure I.28***. Il s'agit d'un modèle pour décrire le taux de croissance de *L. monocytogenes* en fonction de la concentration en composés phénoliques et en sel (Hwang 2007).

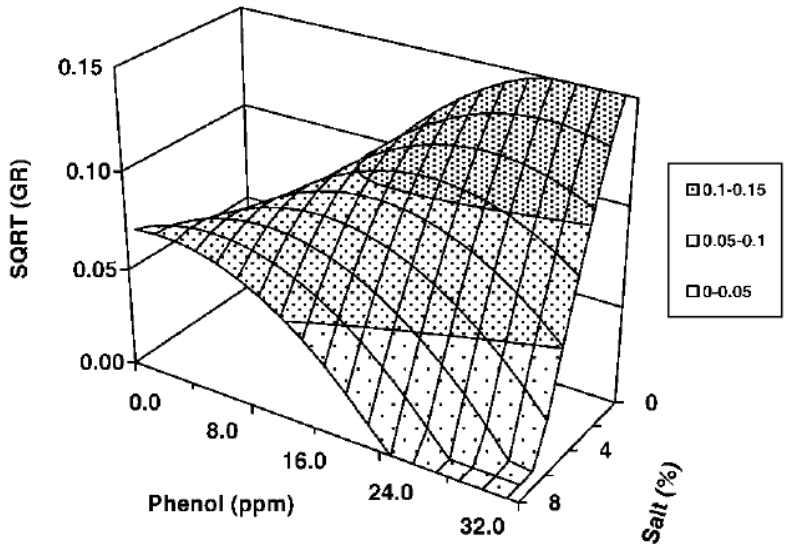


Figure I.28. *Surface de réponse du taux de croissance de L. monocytogenes dans du saumon contenant 0 à 8% de sel et 0 à 34 ppm de composés phénolique à 4°C (Hwang 2007)*

L'approche progressive ou de « **gamma concept** », initiée par Zwietering *et al.* consiste à étudier et à modéliser l'impact de chaque facteur environnemental séparément puis à construire, à partir de ces modules simples, un modèle complet incluant l'effet de tous les facteurs environnementaux (Zwietering *et al.* 1990; Guillier *et al.* 2017). Contrairement aux modèles polynomiaux, le nombre de paramètres est plus faible et ces derniers ont presque tous des significations biologiques. Tous les facteurs influants sont considérés comme indépendants. L'effet de chaque facteur sur le taux de croissance peut être représenté par une fraction du taux de croissance optimal. En conditions non optimales, l'impact de chaque facteur réduit le taux de croissance optimal selon une fonction « gamma » (équation 3) (Guillier *et al.* 2017) :

$\mu_{max} = \mu_{opt} . \gamma(T) . \gamma(pH) . \gamma(a_w)$ (équation 3)

Les fonctions gammas peuvent être des modèles de type racine carrée et/ou des modèles cardinaux et leur équation dépend de la forme de la courbe (Guillier *et al.* 2017).

Les **modèles cardinaux** ont été proposés par Rosso *et al.* (1995). Ils permettent de décrire l'influence d'un facteur uniquement avec ses valeurs cardinales (min, opt, max), qui ont une signification biologique. Les modèles pour le pH et la température sont illustrés par la ***Figure I.29*** et les équations 4 et 5.

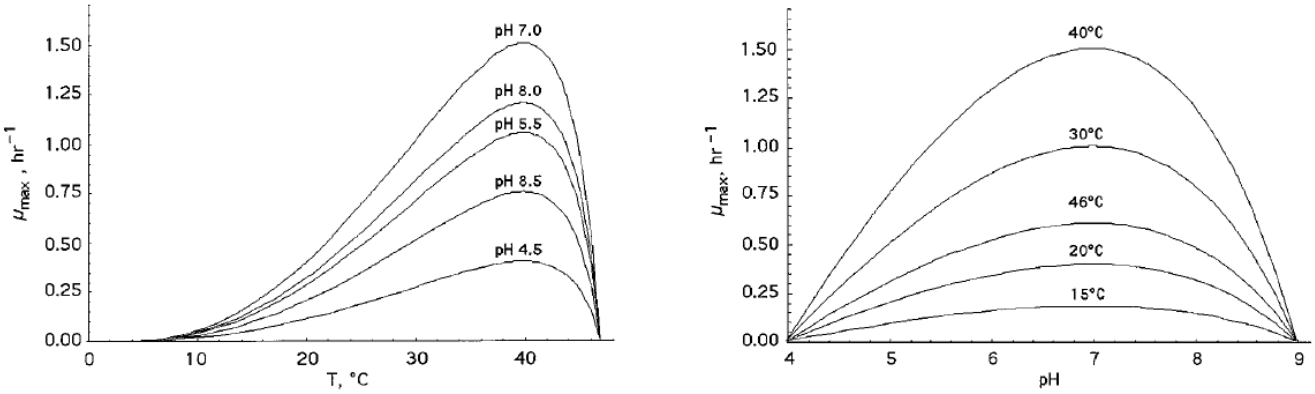


Figure I.29. *Influence de la température et du pH sur le modèle cardinal (Rosso et al. 1995)*

$$\gamma(T) = \frac{(T-T_{max})(T-T_{\min})^2}{(T_{opt}-T_{min})[(T_{opt}-T_{min})(T-T_{opt})-(T_{opt}-T_{max})(T_{opt}+T_{min}-2T)]} \quad \text{(équation 4)}$$

$$\gamma(pH) = \frac{(pH-pH_{max})(pH-pH_{\min})}{(pH_{opt}-pH_{min})(pH-pH_{opt})-(pH_{opt}-pH_{max})(pH_{min}-T)} \quad \text{(équation 5)}$$

Les modèles racine carrée ont été initialement proposés pour la température par Ratkowsky *et al.* (1982) car les auteurs avaient observé une relation linéaire entre la racine du taux de croissance et la température. Ces dernières années, ils ont été largement élargis à d'autres facteurs environnementaux (Guillier *et al.* 2017).

Par exemple, le modèle de **Lambert et Pearson** (équation 6 et ***Figure I.30***) est très utilisé pour estimer les CMI et CNI d'un composé antimicrobien (Guillier *et al.* 2007).

$$\sqrt{\mu_{max}(c)} = \sqrt{\mu_{max}(c=0).\,g(c)} \quad (6)$$

$$g(c) = \exp\left(-\left[\frac{c}{CMI/\exp\left(\frac{\ln(CNI/CMI)}{-e}\right)} \right]^{\left[\frac{-e}{\ln(CNI/CMI)}\right]} \right)$$

Avec c la concentration en antimicrobien, μ_{max} le taux maximal de croissance, CNI la concentration non inhibitrice et CMI la concentration minimale inhibitrice.

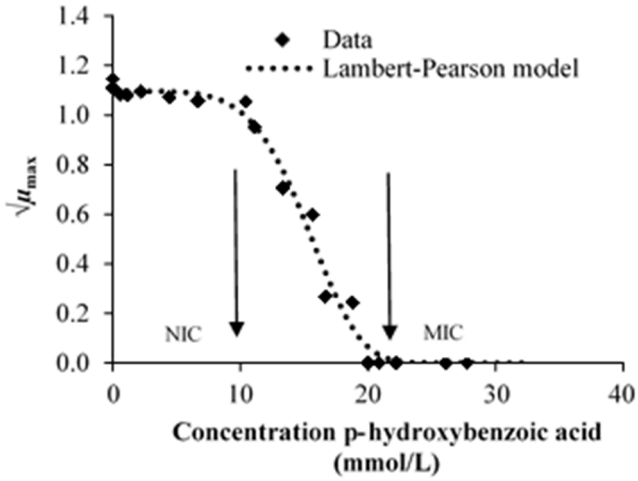


Figure I.30. *Application du modèle de Lambert et Pearson à des données de taux de croissance de L. monocytogenes obtenues dans le cadre de cette thèse pour déterminer la CNI (concentration non inhibitrice, NIC en anglais) et la CMI (concentration minimale inhibitrice, MIC en anglais) de l'acide p-hydroxybenzoïque*

I.2.3. L'activité antimicrobienne des composés phénoliques

I.2.3.1. Mécanismes d'action antimicrobiens des composés phénoliques

Les mécanismes antimicrobiens des composés phénoliques sont encore loin d'être entièrement compris. Il existe une disparité entre les différentes classes de composés : les phénols simples ont des mécanismes d'action relativement bien connus, au contraire des acides phénoliques et des flavonoïdes. La complexité des modes d'action de certaines molécules vient du fait qu'elles peuvent avoir plusieurs cibles cellulaires et que celles-ci ne sont pas indépendantes : ainsi, l'atteinte d'une cible peut avoir des conséquences sur d'autres fonctions physiologiques (Burt 2004; Cushnie & Lamb 2005).

I.2.3.1.1. Intercalation dans la membrane bactérienne

La première cible cellulaire des composés phénoliques est la double couche de phospholipides de la membrane bactérienne, dans laquelle certains ont la capacité de pénétrer.

Lorsqu'une molécule, telle que le carvacrol, **s'intercale dans la membrane**, l'espace entre les chaînes d'acides gras des phospholipides s'agrandit, ce qui induit une diminution des

interactions de van der Waals entre elles. La membrane est alors perméabilisée, fluidifiée et son rôle structurel est perturbé. La perméabilisation de la membrane peut entraîner des fuites d'ions tels que le potassium (Ultee *et al.* 2002) ou les phosphates, d'ATP (Helander *et al.* 1998), de macromolécules comme le ribose, le glutamate de sodium (Juven *et al.* 1994), les nucléotides ou les protéines (Raccach 1984). Plus généralement, cette perméabilisation de la membrane peut conduire à la dissipation des gradients ioniques, dont celui de pH ce qui ferait chuter la force motrice essentielle à la synthèse de l'ATP (Ultee *et al.* 2002). En général, la dissipation des gradients ioniques entraîne une inhibition des processus essentiels et éventuellement la mort des cellules bactériennes (Ultee *et al.* 2002). Une fuite du contenu cytoplasmique a également été démontré suite à l'action de nombreuses familles de composés phénoliques: les phénols simples (Burt 2004), les flavan-3-ols (épigallocatéchine gallate, épicatéchine) (Ikigai *et al.* 1993), les antioxydants phénoliques synthétiques comme le BHA, le BHT (Raccach 1984), et les acides phénoliques (Borges *et al.* 2013). Par exemple, il a été montré que l'acide gallique et l'acide férulique avaient des effets irréversibles sur les propriétés de la membrane, induisant notamment une rupture locale ou la formation de pores dans les membranes cellulaires avec une fuite de constituants intracellulaires (Borges *et al.* 2013).
Lors de leur intercalation dans la membrane, les composés phénoliques peuvent aussi perturber le rôle des **protéines membranaires** en interagissant avec elles, notamment les enzymes telles que l'ATPase, ce qui perturberait le métabolisme énergétique. La présence de ces composés dans la membrane pourrait également modifier les interactions lipides-protéines (Burt 2004).

Il est acquis depuis longtemps que l'**hydrophobicité** (ou lipophilie) d'un composé est un des paramètres explicatifs de son activité antimicrobienne (Hansch & Fujita 1964). Le caractère lipophile d'un composé est classiquement décrit par le logarithme de son coefficient de partage (P) dans un mélange composé d'octanol et d'eau ($\log P_{oct/w}$). Plus la concentration retrouvée dans la phase d'octanol est élevée, plus le coefficient de partage du composé est grand. Un composé ayant un degré d'hydrophobicité élevé pourrait plus facilement entrer en interaction avec les phospholipides hydrophobes de la membrane bactérienne et aurait ainsi une plus grande activité antimicrobienne (Hansch & Fujita 1964; Ramos-Nino *et al.* 1996; Weber & de Bont 1996). Cependant, l'intercalation d'un composé dans une membrane bactérienne est différente de la distribution d'un composé dans un mélange octanol/eau : c'est pourquoi certains auteurs ont déterminé d'autres coefficients de partage : par exemple, entre une membrane (liposomes) et un tampon ($\log P_{m/t}$) (Ultee *et al.* 2002). Dans cette dernière étude, le $P_{m/t}$ du carvacrol est inférieur à son $P_{oct/w}$ car les liposomes sont plus hydrophiles que l'octanol. Selon

la littérature, certaines valeurs spécifiques d'hydrophobicité permettraient une activité antimicrobienne optimale : un composé avec un $logP_{oct/w}$ supérieur à 3 pourrait pénétrer profondément dans les membranes (Weber & de Bont 1996) alors qu'un logP supérieur à 4 (en fonction du composé et de l'organisme testé) n'entraînera pas toujours une augmentation de l'efficacité antimicrobienne (Vermuë *et al.* 1993).

I.2.3.1.2. Pénétration des composés phénoliques jusqu'au cytoplasme

Certains composés phénoliques, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, peuvent traverser la membrane bactérienne et atteindre le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, plusieurs phénomènes peuvent se produire.

I.2.3.1.2.1. Acidification du cytoplasme

Les acides phénoliques pourraient agir comme des acides faibles (I.2.2.2.1.2). Lorsque leur forme indissociée traverse la membrane et atteint le cytoplasme bactérien, elle se dissocie en libérant un proton. Cette acidification du cytoplasme entraîne une altération des fonctions enzymatiques et/ou des molécules structurelles ainsi qu'une perte d'énergie nécessaire à l'efflux des protons (Lambert & Stratford 1999; Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017).

L'efficacité des acides faibles est d'autant plus grande que la proportion d'acide non dissociée est grande et celle-ci dépend du pH du milieu et du pKa de l'acide. Un pH bas et un pKa élevé sont donc deux paramètres importants à considérer pour avoir une efficacité optimale (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017).

De nombreux auteurs font l'hypothèse que les acides phénoliques pourraient agir grâce à ces deux mécanismes combinés : effet sur l'intégrité de la membrane bactérienne et acidification du cytoplasme (Ramos-Nino *et al.* 1996; Sánchez-Maldonado *et al.* 2011). Un modèle a été construit pour prédire le comportement antibactérien des acides phénoliques en fonction du paramètre de lipophilie (logK) et de l'effet de l'ionisation (pKa) de l'acide phénolique. Ce modèle confirme que l'efficacité antimicrobienne est d'autant plus élevée que le logK est élevé, mais également que le pKa est élevé car la proportion d'acide non dissocié serait plus grande (Ramos-Nino *et al.* 1996).

Dans l'étude de Campos *et al.* (2009), l'ajout d'un acide organique simple (acide l-lactique) est comparé avec l'addition d'acide férulique et d'acide gallique sur les bactéries lactiques du vin. L'acide organique ne provoque pas de sortie accrue de potassium des cellules bactériennes alors

que cet efflux est observé en présence d'acides phénoliques. Les auteurs concluent donc que l'efflux n'était pas dû à l'acidification du cytoplasme mais bien à un effet complémentaire de déstructuration membranaire.

Les formes non dissociées des acides seraient plus susceptibles d'interagir avec la membrane bactérienne que les formes dissociées car celles-ci sont chargées négativement. Même s'il a déjà été montré que certains acides, comme l'acide sorbique, pouvait avoir une activité antimicrobienne *via* leur forme dissociée (Eklund 1983; Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017), il est à noter que l'effet des formes dissociées des acides phénoliques n'a jamais été étudié dans la littérature.

L'acidification du cytoplasme est une hypothèse qui a été également émise pour les phénols simples et notamment pour le carvacrol. Les phénols non dissociés traverseraient la membrane bactérienne et libèreraient un proton du groupe hydroxyle à l'intérieur du cytoplasme. Le phénol recouvrerait sa forme non dissociée en s'associant avec un ion potassium (ou un autre cation) du cytoplasme. La molécule résultante serait transportée à travers la membrane vers l'environnement externe, où le cation serait libéré pour être remplacé par un nouveau proton (Ultee *et al.* 2002).

I.2.3.1.2.2. Perturbation du métabolisme

Concernant les flavonoïdes, deux principaux mécanismes d'action antimicrobiens ont été rapportés en plus de la perturbation de l'intégrité membranaire : l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques et l'inhibition du métabolisme énergétique (Cushnie & Lamb 2005; Cushnie & Lamb 2011).

Concernant l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, les auteurs ont suggéré :

- que l'anneau B des flavonoïdes pourrait interagir avec l'empilement des bases d'acide nucléique (Mori *et al.* 1987)
- que certains flavonoïdes comme la quercétine pourraient se lier à la sous-unité GyrB de l'ADN gyrase d'*E. coli*, une protéine essentielle à la réplication des chromosomes circulaires (Plaper *et al.* 2003)
- que certains flavonoïdes pourraient inhiber des enzymes clés pour la synthèse de l'ADN telles que la topoisomérase et/ou de la dihydrofolate réductase (Bernard *et al.* 1997).

L'inhibition de cette synthèse pourrait également être accompagnée d'une dégradation de l'ADN comme montré chez *B. subtilis* et *E. coli* à cause de l'auto-oxydation du composé phénolique générant des espèces radicalaires toxiques pour les bactéries (Brudzynski *et al.* 2012).

L'inhibition du métabolisme énergétique serait causé par une inhibition de l'enzyme NADH-cytochrome C réductase (Haraguchi *et al.* 1995) et à une inhibition de l'ATP synthétase (Chinnam *et al.* 2010).

Enfin, conséquence de la dissociation de l'acide, l'augmentation de la concentration en formes dissociées de l'acide organique faible dans le cytoplasme peut provoquer l'augmentation de l'osmolarité et des perturbations métaboliques, ce qui augmente l'activité antimicrobienne (Rajkovic *et al.* 2010). Ce phénomène pourrait avoir lieu pour les acides phénoliques.

I.2.3.1.3. Autres effets indirects des composés phénoliques

I.2.3.1.3.1. Chélation des métaux

Les métaux comme le zinc et le cuivre sont des micronutriments essentiels à la croissance des bactéries. Certains composés phénoliques ont des propriétés chélatrices de métaux bien connues (structures *ortho*-diphénoliques), ce qui pourrait être un des mécanismes antimicrobiens indirects des composés phénoliques (Daglia 2012). Néanmoins, ce type de mécanisme reste peu probable dans un environnement alimentaire où les nutriments ne manquent pas.

I.2.3.1.3.2. Atténuation de la virulence bactérienne

Il a été rapporté que certains flavonoïdes seraient capables d'atténuer la virulence de certaines bactéries pathogènes *via* l'inhibition de récepteurs impliqués dans les signaux de quorum-sensing, d'enzymes telles que la sortase, l'uréase, *via* la neutralisation de toxines bactériennes, ou encore *via* l'inhibition de la sécrétion de facteurs de virulence (Cushnie & Lamb 2011). Concernant *L. monocytogenes*, la protéine listeriolysin O (LLO) est un facteur de virulence de la bactérie lui permettant de s'échapper des phagosomes et de se libérer dans le cytoplasme des cellules hôtes (Pamer 2004). Kohda *et al.* (2008) ont montré que des concentrations sub-inhibitrices d'épigallocatéchine gallate inhibaient la croissance de *L. monocytogenes* dans des macrophages notamment parce que ce flavonoïde empêchait la LLO de se lier à la membrane lipidique.

Ce phénomène d'atténuation de la virulence est complémentaire des propriétés antimicrobiennes et pourraient constituer une approche innovante d'utilisation des flavonoïdes pour maîtriser la sécurité microbiologique des produits.

I.2.3.2. Efficacité antimicrobienne des composés phénoliques

De très nombreux composés phénoliques présentent des activités antimicrobiennes (Bouarab-Chibane *et al.* 2018a). Les principales familles concernées sont les phénols simples (Burt 2004), les acides phénoliques (Ramos-Nino *et al.* 1996; Cueva *et al.* 2010; Sánchez-Maldonado *et al.* 2011), et les flavonoïdes (Cushnie & Lamb 2011; Cetin-Karaca & Newman 2015). D'autres familles, telles que les tannins (condensés et hydrolysables) et les néolignans, présentent également des activités antimicrobiennes mais plus anecdotiques (Daglia 2012).

Il est relativement difficile de comparer toutes les études réalisées sur l'activité antimicrobienne des composés phénoliques car elles sont souvent réalisées sur des microorganismes différents : bactéries, virus, moisissures et pour les bactéries, sur des espèces et souches différentes. De plus, les techniques utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne peuvent être différentes : méthode par dilution en bouillon de culture ou méthode par diffusion en agar. Pour cette étude bibliographique, nous avons privilégié les études réalisées sur *L. monocytogenes* par dilution en bouillon de culture pour être au plus proche de nos conditions expérimentales, puis nous avons élargi aux études réalisées sur d'autres bactéries à Gram positif, éventuellement à Gram négatif avec les méthodes par dilution puis dans certains cas par diffusion sur agar. L'objectif était d'avoir une vision relativement globale sur les composés phénoliques les plus actifs en fonction de leur famille.

Même si peu d'études comparent l'efficacité des composés entre différentes familles, les tendances globales montrent que les phénols simples sont les composés phénoliques les plus efficaces (Burt 2004; Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012) et que les acides phénoliques et les flavonoïdes ont des efficacités relativement comparables (Saavedra *et al.* 2010; Özçelik *et al.* 2011; Daglia 2012; Pacheco-Ordaz *et al.* 2018).

Dans la famille des **phénols simples**, les activités antimicrobiennes du carvacrol, du thymol et de l'eugénol retrouvés dans les huiles essentielles de plantes sont les plus décrits dans la littérature (Burt 2004). D'après les études réalisées en bouillon de culture sur des bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*) l'ordre d'efficacité serait le suivant : carvacrol ≥ thymol > eugénol avec des ordres de grandeur de CMI de quelques mmol/L (Cosentino *et al.* 1999; Pol & Smid 1999; Lambert *et al.* 2001; Burt 2004; Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012; Gavaric *et al.* 2015). Des résultats similaires sont rapportés pour des bactéries à Gram négatif (*Salmonella* Typhimurium) (Nazer *et al.* 2005; Guillier *et al.* 2007). Parmi les phénols simples, les activités antimicrobiennes du tyrosol, de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine retrouvés dans l'industrie de l'huile d'olive sont également rapportées (Tripoli *et al.* 2005; Lee & Lee 2010; Araújo *et al.* 2015).

Dans la famille des **acides phénoliques**, les composés les plus décrits dans la littérature pour leur activité antimicrobienne sur bactéries à Gram positif (*S. aureus, L. monocytogenes, B. cereus*) et négatif (*C. jejuni, E. coli, P. fluorescens, P. aeruginosa*) confondues sont les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique (acides hydroxybenzoïques) et les acides *p*-coumarique, caféique, férulique et chlorogénique (acides hydroxycinnamiques) (Ramos-Nino *et al.* 1996; Murphy Cowan 1999; Wen *et al.* 2003; Tripoli *et al.* 2005; Rodríguez Vaquero *et al.* 2007; Gañan *et al.* 2009; Lee & Lee 2010; Cueva *et al.* 2010; Merkl *et al.* 2010; Saavedra *et al.* 2010; Sánchez-Maldonado *et al.* 2011; Daglia 2012; Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012; Makwana *et al.* 2015). Contrairement aux phénols simples, l'activité antimicrobienne de ces composés est moins connue et il est plus difficile d'établir un classement global d'efficacité. Il a néanmoins été rapporté plusieurs fois que l'acide gallique était moins efficace que d'autres acides hydroxybenzoïques (Ramos-Nino *et al.* 1996; Rodríguez Vaquero *et al.* 2007; Sánchez-Maldonado *et al.* 2011; Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012), avec notamment des CMI vis-à-vis de *Bacillus cereus* de 21 mmol/L alors qu'elle est de 2 à 8 mmol/L pour les acides *p*-hydroxybenzoique et protocatéchique (Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012). Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide chlorogénique apparaît comme le moins efficace de sa sous-famille envers *L. monocytogenes* (Wen *et al.* 2003; Saavedra *et al.* 2010), avec une CMI supérieure à 30 mmol/L alors que les acides *p*-coumarique, caféique et férulique ont des CMI d'environ 15-20 mmol/L (Wen *et al.* 2003). De manière plus anecdotique, les activités antimicrobiennes de l'acide sinaptique sur *C. jejuni* (Gañan *et al.* 2009), de l'acide rosmarinique sur *S. aureus* (Moreno *et al.* 2006), de l'acide gentisique sur *L. monocytogenes* (Merkl *et al.* 2010) et de l'acide carnosique sur *S. aureus* (Moreno *et al.* 2006; Horiuchi *et al.* 2007) ont été rapportées.

Dans la très grande famille des **flavonoïdes**, de nombreuses sous-familles ont été identifiées comme présentant des activités antimicrobiennes : les flavan-3-ols, les flavanones, les flavones, les flavonols, les isoflavones, les isoflavonones, les isoflavans et les chalcones (Cushnie & Lamb 2005). Plus particulièrement, les composés les plus souvent décrits sont : l'apigénine, la galangine, la pinocembrine, la ponciretine, la genkwenanine, la sophroflavone G et ses dérivés, la naringine et la naringénine, l'épigallocatéchine gallate et ses dérivés, la lutéoline et la lutéoline-7-glucoside, la quercétine, la 3-O-methylquercétine et les dérivés glycosylés de la quercétine, le kaempférol et ses dérivés (Cushnie & Lamb 2005). La généralisation des données obtenues est encore plus difficile que dans les autres familles car les composés sont très nombreux et les résultats souvent contradictoires (Cushnie & Lamb 2005). Nous avons donc choisi de nous focaliser sur les flavonoïdes également identifiés dans la littérature pour leurs

propriétés antioxydantes. Dans la sous-famille des flavan-3-ols, l'épigallocatéchine et l'épigallocatéchine gallate sont plus efficaces que la catéchine et l'épicatéchine pour inhiber la croissance de *S. mutans* (Sakanaka *et al.* 1989) et de *S. aureus* (Yam *et al.* 1997), les premiers ayant des CMI de l'ordre du mmol/L. Chez les flavanones, l'ériodictyol est plus efficace pour limiter le développement de *L. innocua* que la naringénine et la naringine (Mandalari *et al.* 2007). Chez les flavones, la lutéoline et l'apigénine sont des molécules antimicrobiennes efficaces vis-à-vis de *S. aureus* avec des CMI inférieures à 0,5 mmol/L (Sato *et al.* 2000). Chez les flavonols, les composés tels que le kampférol, la morine, la myricétine, la quercétine et la rutine ont été étudiées à plusieurs reprises pour leur activité antimicrobienne (El-Gammal & Mansour 1986; Nishino *et al.* 1987; Tsuchiya *et al.* 1996; Rauha *et al.* 2000; Arima & Danno 2002; Rodríguez Vaquero *et al.* 2007; Ulanowska *et al.* 2007). Le kaempférol est un composé efficace vis-à-vis du développement de *S. aureus* et *B. subtilis* (Ulanowska *et al.* 2007) avec une CMI maximale de 1,4 mmol/L estimée sur différentes souches de *S. aureus* (Tsuchiya *et al.* 1996). En revanche, il a été démontré dans plusieurs études que la rutine ne présentait aucun effet antimicrobien sur *S. aureus* et *B. cereus* (El-Gammal & Mansour 1986; Ng *et al.* 1996; Rauha *et al.* 2000) même si une étude réalisée par diffusion sur agar n'exclue pas une efficacité antimicrobienne vis-à-vis de *L. monocytogenes* (Rodríguez Vaquero *et al.* 2007).

I.2.3.3. Facteurs interférant dans les aliments

I.2.3.3.1. Influence de la structuration des aliments sur le développement bactérien

Même si elles sont actuellement peu nombreuses, les études portant sur l'influence de la structure et de la composition de la matrice alimentaire sur le comportement bactérien suscitent de plus en plus d'intérêt, notamment en microbiologie prévisionnelle (Dens & Van Impe 2001; Mertens *et al.* 2009). De manière générale, les paramètres de croissance sont modifiés dans les milieux alimentaires complexes par rapport aux milieux de culture. Il s'agit le plus souvent d'une diminution du taux et du rendement de croissance, que l'on soit en milieu émulsionné (Brocklehurst *et al.* 1995; Wilson 2002) ou gélifié (Meldrum *et al.* 2003; Aspridou *et al.* 2014). Les effets observés sont d'origine multiple.

Les matrices alimentaires sont des systèmes structurés (présence de composés structurants de type gélifiants et épaississants) et/ou multiphasiques (présence de gouttelettes lipidiques), enrichis de différents ingrédients. Cette structuration peut avoir de nombreux effets directement ou indirectement sur la répartition de la contamination, le mode de croissance de la bactérie,

les propriétés de surface de la bactérie et leur tolérance à l'inactivation (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017).

Tout d'abord, la présence d'éléments structurants ou de phases additionnelles peut imposer aux bactéries des contraintes physiques qui peuvent modifier leur distribution et leur mode de croissance dans le système (Jongenburger *et al.* 2012). Cette hétérogénéité de répartition de la contamination peut mener à des mauvaises estimations des niveaux de contamination et une baisse de fiabilité des analyses microbiologiques : ainsi, certaines parties du système peuvent être complètement stériles alors que d'autres seraient fortement contaminées. De plus, dans un système en présence d'éléments structurants, alors que le milieu devient solide ou semi-solide, la croissance bactérienne passe de l'état planctonique à l'état colonial (***Figure I.31***) (Wilson 2002; Antwi *et al.* 2006). Ce phénomène peut également se produire dans des émulsions comprenant plus de 80% de phase lipidique (Brocklehurst *et al.* 1995; Parker *et al.* 1995). En effet, la croissance s'effectuant dans la phase aqueuse ou à l'interface phase aqueuse/phase lipidique, un fort pourcentage d'huile engendre des zones aqueuses non jointives dans lesquelles les bactéries sont piégées et ne peuvent se développer que sous forme de colonies (Naïtali & Dubois-Brissonnet 2017). Dans un milieu structuré modélisant un fromage, des macro-colonies ont pu être observées (rayon > 200 µm), associées à des microgradients de pH, de substrat protéique, d'O_2 et de CO_2, qui sont probablement dus à la limitation des phénomènes de diffusion autour et à l'intérieur de la macro-colonie (Jeanson *et al.* 2015). La croissance sous forme de macrocolonies dans les systèmes alimentaires pourrait alors avoir des conséquences multiples. Tout d'abord, comme dit précédemment, elle peut engendrer un manque de fiabilité des analyses microbiologiques. Mais surtout, la physiologie des bactéries se développant sous forme de communautés microbiennes est très différente de celle des bactéries planctoniques (Bridier *et al.* 2011). Ces bactéries vivant en communauté sont bien connues pour avoir une physiologie particulière pouvant notamment engendrer une augmentation de leur tolérance à la désinfection (Bridier *et al.* 2011). Ce phénomène pourrait également apparaître suite à la croissance des bactéries dans des systèmes alimentaires complexes. Une première étude a d'ailleurs montré que la croissance de *L. monocytogenes* en émulsion a provoqué une augmentation de sa tolérance vis-à-vis de deux désinfectants couramment utilisées en industrie alimentaire (Naïtali *et al.* 2009).

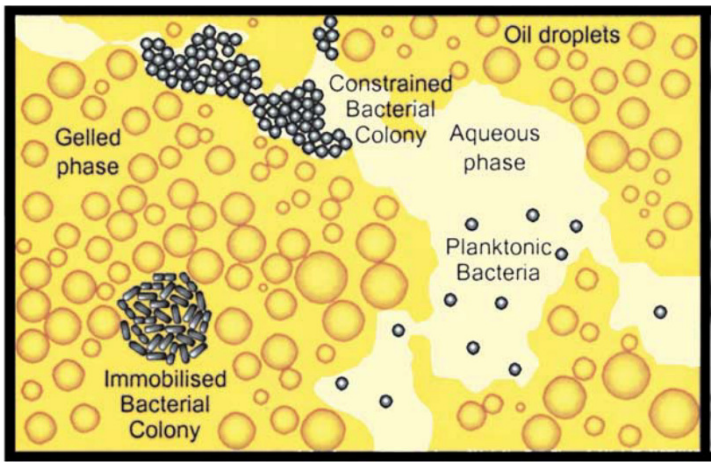


Figure I.31. *Représentation schématique montrant les différents environnements possibles de croissance bactérienne dans un échantillon de fromage : les bactéries planctoniques en phase aqueuse et les colonies bactériennes dans la phase gélifiée (Parker et al. 1998; Wilson 2002)*

Dans le cas particulier des systèmes émulsionnés, il est important également de s'intéresser à l'impact de la présence d'huile et de certains lipides au contact des bactéries car celle-ci peut modifier la physiologie et même la croissance des bactéries. Il a par exemple été montré que l'hydrophobicité de surface de deux souches de *L. monocytogenes* augmente lors de sa croissance en émulsion avec 80% d'huile, ce phénomène étant plus marqué à pH acide qu'à pH neutre (Naïtali *et al.* 2009). De plus, il a été montré que la croissance de *B. cereus* était favorisée à basse température en présence d'acides gras insaturés exogènes (de Sarrau *et al.* 2013). Même si les mécanismes mis en jeu restent encore mal connus, il semblerait que les bactéries soient capables d'utiliser ces acides gras alimentaires exogènes pour réguler la fluidité de leurs membranes, notamment lorsque la température baisse et que leur métabolisme devient moins efficace.

I.2.3.3.2. Interférences de la structuration des aliments sur l'activité de composés antimicrobiens

Les nombreuses études réalisées sur des aliments réels ont montré que l'utilisation d'antimicrobiens naturels tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles était une approche encourageante dans de très nombreux produits alimentaires : fruits et légumes frais et transformés, produits laitiers, boissons, produits carnés (Davidson *et al.* 2015). Mais malheureusement, beaucoup de ces composés montrent une activité moindre dans les aliments en comparaison de leurs excellentes activités antimicrobiennes en milieu de culture : il faut donc augmenter les concentrations. Cette perte d'activité en milieu complexe a été constatée pour de nombreuses famille d'antimicrobiens, dont les acides organiques (lactates, acetates,

sorbates, benzoates) (Hwang *et al.* 2011; Morey *et al.* 2014), les parabènes (esters alkyliques d'acide *p*-hydroxybenzoique) (Baranowski & Nagel 1984), les composés phénoliques (phénylpropanoïdes, acides phénoliques et terpènes phénoliques) (Calo *et al.* 2015), les acides gras estérifiés avec des composés phénoliques ou des acides aminés (arginate laurique) (Porto-Fett *et al.* 2010). Les molécules antimicrobiennes introduites dans l'aliment se retrouvent en interaction avec une multitude de composants au sein d'un aliment. Parmi toutes les interactions possibles, deux sont particulièrement pertinentes pour expliquer la baisse d'efficacité dans les aliments comme : celle avec les lipides et celle avec les protéines et polysaccharides chargés (Weiss *et al.* 2015). Ces interactions se font principalement par l'intermédiaire de liaisons non-covalentes : interactions électrostatiques et hydrophobes (Bouarab-Chibane *et al.* 2018b; Bouarab-Chibane *et al.* 2018c). Les interactions hydrophobes expliqueraient notamment que certains composés migrent préférentiellement dans la phase lipidique où ils ne seraient plus accessibles aux microorganismes, localisés en phase aqueuse (Weiss *et al.* 2015).

Au-delà de ces interactions, la taille des gouttelettes lipidiques semble être un autre facteur influant sur l'efficacité antimicrobienne des composés phénoliques en émulsion. Terjung *et al.* (2012) ont montré que l'activité antimicrobienne de l'eugénol et du carvacrol était plus importante dans les émulsions présentant une taille de gouttelettes plus élevée. En parallèle, ils ont montré que la concentration des antimicrobiens en phase aqueuse augmentait avec la taille des gouttelettes et que le carvacrol et l'eugénol se localiseraient préférentiellement à l'interface des gouttelettes d'huile. Ainsi, ils émettent deux hypothèses explicatives :

- lorsque la taille des gouttelettes diminue, la surface interfaciale augmente et davantage de composés sont localisés à l'interface, d'où une meilleure efficacité
- en présence de plus petites gouttelettes, le surfactant serait localisé en grande majorité à l'interface, ce qui laisserait en phase aqueuse moins de micelles permettant la solubilisation des composés phénoliques (***Figure I.32***) (Terjung *et al.* 2012).

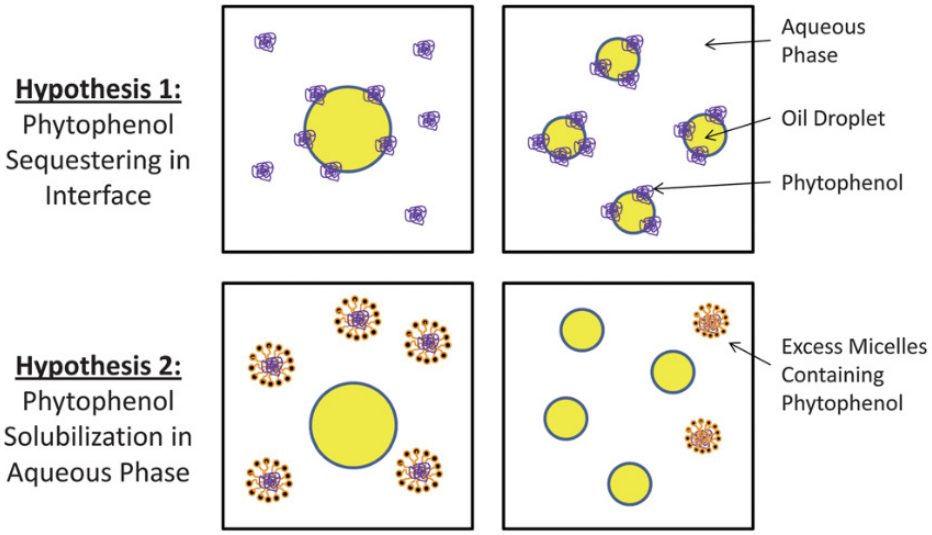


Figure I.32. *Représentation schématique montrant les différentes hypothèses expliquant une efficacité plus importante des antimicrobiens dans des émulsions à plus grand diamètre de gouttelettes (Terjung et al. 2012)*

Mais il existe relativement peu d'études sur l'activité antimicrobienne des composés phénoliques dans des systèmes émulsionnés contenant des quantités d'huile proches des sauces alimentaires. En revanche, de nombreuses études portent sur les nano-émulsions d'huiles essentielles, constituées de très fines gouttelettes (de l'ordre du nanomètre) d'huile essentielle hydrophobe, dispersées dans le milieu aqueux. Ces nano-émulsions présentent souvent des problèmes de stabilité physique dus au vieillissement d'Oswald qui favorise la coalescence de ces gouttelettes d'huile essentielles. L'utilisation de molécules tensio-actives peut améliorer la stabilisation des nano-gouttelettes mais peut avoir des conséquences positives ou négatives sur l'efficacité des composés antimicrobiens (Gaysinsky *et al.* 2005b; Hammer & Carson 2011; Donsì & Ferrari 2016). Plusieurs auteurs proposent d'incorporer à ces nano-émulsions de petites quantités de triglycérides pour éviter cette déstabilisation physique mais leur introduction provoque dans une grande majorité des cas une diminution de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (Chang *et al.* 2012). Dans ce type d'études, les composés antimicrobiens concernés sont généralement les phénols simples (thymol, eugénol et carvacrol).

Chapitre II – Action antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques en milieux modèles

II.1. INTRODUCTION

Ce chapitre regroupe l'ensemble des études réalisées sur l'activité antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques en **milieux modèles**.

La première étude fait l'objet de l'**article 1 "Phenolic compounds can delay the oxidation of polyunsaturated fatty acids and the growth of *Listeria monocytogenes*: structure-activity relationships"** (II.2) et a deux objectifs principaux. Le premier objectif consiste à confirmer les activités antioxydante et antimicrobienne d'une série de composés phénoliques identifiés dans la littérature, puis à sélectionner trois d'entre eux pour la suite de l'étude en milieu alimentaire plus complexe. Le deuxième objectif vise à mettre en évidence et comprendre les relations qui existent entre la structure chimique des composés phénoliques et leur activité antioxydante ou antimicrobienne, ainsi qu'à évaluer les similitudes et/ou différences rencontrées entre les deux types d'action.

Les méthodes mises en œuvre en milieux modèles étant automatisées, elles permettent d'évaluer l'activité d'un grand nombre de composés. Les molécules testées ont été choisies selon trois critères : i) leur activité antioxydante et/ou antimicrobienne est reconnue selon les données disponibles dans la littérature scientifique, ii) elles appartiennent à différentes familles phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, phénols simples, α-tocophérol) et iii) leurs structures chimiques permettent de mettre en évidence le rôle de groupements chimiques spécifiques dans l'efficacité mesurée.

L'activité antioxydante est mesurée à l'aide du « test AAPH », test qui présente l'avantage de mettre en œuvre un substrat lipidique rencontré dans la plupart des produits alimentaires, l'acide linoléique (C18:2, ω_6). Son oxydation est initiée par l'AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) et l'apparition des produits d'oxydation est suivie par mesure des diènes conjugués (mesure spectrophotométrique à 234 nm). Le retard d'apparition des produits d'oxydation (temps d'inhibition) est évalué en présence de chaque composé phénolique, introduit à différentes concentrations. Les courbes effet-dose établies permettent à la fois de comparer l'efficacité des antioxydants entre eux mais aussi d'identifier des groupes de composés présentant des comportements cinétiques similaires.

L'activité antimicrobienne des composés est évaluée à l'aide du suivi des courbes de croissance de *Listeria monocytogenes* dans un lecteur automatique de densité optique (600 nm)

en microplaque (Bioscreen C), en présence des composés phénoliques choisis et à différentes concentrations. A partir des courbes de croissance, les paramètres du modèle de Gompertz sont déterminés (principalement le μ_{max}, taux de croissance). L'évolution du taux de croissance en fonction de la concentration du composé est ensuite modélisée à l'aide du modèle de Lambert-Pearson afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et non inhibitrice (CNI) pour chaque composé.

La deuxième étude fait l'objet de l'**article 2 "Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: deciphering the mechanisms of action using three different models"** (II.3) et a pour objectif de décrire et comprendre les différents mécanismes d'action antimicrobiens des acides phénoliques en utilisant une démarche de modélisation. En effet, l'activité antimicrobienne des acides phénoliques peut être due à l'effet de l'acide sur la diminution du pH du milieu et à l'action des formes non-dissociées et dissociées des acides sur la bactérie.

La méthodologie utilisée pour les expérimentations est la même que celle décrite précédemment: il s'agit de suivre la **cinétique de croissance** de *Listeria monocytogenes* par densité optique en milieu de culture en présence des acides phénoliques à différentes concentrations et ici à différents pH ajustés. Pour chaque acide, on obtient un jeu de données avec différents taux de croissance, qui dépendent du pH et des concentrations de formes non-dissociées et dissociées des acides. Une démarche de **modélisation mathématique**, élaborée en collaboration avec Laurent Guillier (Anses), permet de décrire l'impact des différents facteurs (pH, forme non-dissociée, forme dissociée) sur le taux de croissance de *Listeria monocytogenes* et ainsi de mieux comprendre le mécanisme d'action des acides phénoliques.

II.2. ARTICLE 1 – "PHENOLIC COMPOUNDS CAN DELAY THE OXIDATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND THE GROWTH OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS"

Publication acceptée dans ***Journal of the Science of Food and Agriculture*** *en avril 2018*

Aurélia Pernin[ab], Florence Dubois-Brissonnet[b]*, Stéphanie Roux[a], Marine Masson[a], Véronique Bosc[a], and Marie-Noëlle Maillard[a]

[a] Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

[b] Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

* Corresponding author: florence.dubois@agroparistech.fr

II.2.1. Abstract and keywords

Background: Phenolic compounds present a potential solution to ensure food quality and safety. Indeed, they can limit oxidation reactions and bacterial growth in food products. Although their antioxidant mechanisms of action are well known, their antibacterial ones are less well understood, especially in light of their chemical structures. The aim of this study was first to quantify both aspects of a series of natural phenolic compounds and then link these activities to their chemical structure.

Results: We evaluated antioxidant activity by measuring the capacity of phenolic compounds to delay free linoleic acid oxidation caused by the action of a hydrophilic azo-radical initiator (AAPH). We evaluated antibacterial activity by measuring the growth inhibition of *Listeria monocytogenes* and determining the non-inhibitory and minimum inhibitory concentrations for each compound. Compounds with *ortho*-diphenolic structures were the best antioxidants, whereas those belonging to the simple phenol category were the best antibacterial compounds.

Conclusions: The physico-chemical properties of the compounds influenced both activities, but not in the same way. The chemical environment of the phenolic group and the presence of delocalization structures are the most important parameters for antioxidant activity, whereas the partition coefficient, logP, is one of the most important factors involved in antibacterial activity.

Keywords: phenolic compounds, antioxidant, AAPH, antibacterial, *Listeria monocytogenes*, structure-activity

II.2.2. Introduction

Over the last decade, the fatty acids' profile of food products has been modified to respect nutritional recommendations. The proportion of saturated fatty acids has considerably decreased in favor of monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids, in particular those of the omega-3 family (INRA & ANSES 2013). However, these changes can limit food quality and safety. Indeed, the increase in the number of double bonds in fatty acids in food products leads to their higher oxidability during processing and storage. Oxidation reactions produce off-flavors due to the generation of volatile compounds, decrease nutritional quality by the partial loss of essential fatty acids and co-oxidation of vitamins, and increase the chemical risk by the generation of potentially toxic compounds during heating (cyclic monomers, polymers, furans, 4-hydroxynonenal) (Jacobsen *et al.* 2008; Cuvelier & Maillard 2012). Moreover, recent studies have shown that the growth of pathogenic Gram-positive microorganisms, such as *Staphylococcus aureus* or *Bacillus cereus*, may be favored in the presence of exogenous unsaturated fatty acids (UFA). The mechanisms are not fully understood, but it has been reported that these bacteria can incorporate exogenous UFA in their membranes to regulate their fluidity when fatty acid synthesis is blocked by an FSAII inhibitor (Brinster *et al.* 2010) or impaired by low temperatures (de Sarrau *et al.* 2013). Under these conditions, pathogenic microorganisms can grow and reach infectious doses faster than expected, causing potential food safety issues in food products.

One solution to limit these phenomena is to use molecules with both antioxidant and antibacterial properties, such as phenolic compounds, which are widely found in plants or present in by-products from agro-industry. Several studies have reported the antioxidant and antibacterial properties of phenolic compounds. The antioxidant mechanisms of phenolic compounds are quite well understood and are based on the ability of phenolic groups to release an electron or a hydrogen to a lipid radical. The phenolic radical formed is more stable than the lipid radical, due to the presence of delocalization structures (Berset 2006). Fewer studies have focused on the antibacterial activity of phenolic compounds. Solely the mechanism of action of simple phenols is well described. They act by partitioning of the molecule into the membrane phospholipid layers, inducing the leakage of cell components and bacterial death (Burt 2004). The antibacterial activity of several phenolic acids and flavonoids has already been reported, but their mechanism of action is not fully understood (Daglia 2012).

We aimed to quantify both antioxidant and antibacterial activities of a series of natural phenolic compounds and investigate structure-activity relationships to determine their potential to ensure

food quality and safety. Molecules were selected based on their antioxidant and/or antibacterial activity reported in published studies (Burt 2004; Berset 2006; Kancheva & Kasaikina 2012) and their structures, which covered a broad range of chemical families, making it possible to study the role of specific chemical groups in their effectiveness. *Listeria monocytogenes* was used as the bacterial model because it is a ubiquitous Gram-positive pathogen which is widespread in the environment and a potential contaminant at all stages of the food chain (Buchanan *et al.* 2017). We tested the ability to delay oxidation with linoleic acid, because it is highly reactive and representative of PUFAs found in most food products.

II.2.3. Materials and methods

II.2.3.1. Chemical reagents

2,2'-azobis(2-amidinopropane) dichloride (AAPH), linoleic acid (purity > 98%), sodium dihydrogen phosphate dihydrate, sodium phosphate dibasic dodecahydrate, and sodium borate were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Absolute ethanol was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), boric acid from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France), 1 mol.L^{-1} sodium hydroxide and acetone from Carlo Erba (Fontenay-aux-Roses, France), and Tween 20 from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

II.2.3.2. Bacterial strain and growth conditions

The strain used in this study was *Listeria monocytogenes* CNL 895805, serotype ½, isolated from sheep's brain. It was graciously provided by P. Velge (INRA, Nouzilly) (Van Langendonck *et al.* 1998) The strain, stored in cryovials at -80°C, was resuscitated in two successive subcultures in tryptic soy broth (TSB, Biomérieux, France) at 30°C before each experiment.

II.2.3.3. Phenolic compounds

p-Hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, gallic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, thymol, α-tocopherol, (-)-epicatechin, naringenin, kaempferol, and quercetin were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Eugenol was purchased from Janssen (Beerse, Belgium), carvacrol from Fluka (Buchs, Switzerland), and eriodictyol, apigenin, luteolin, and rutin from Extrasynthèse (Genay, France). Chemical structures are shown ***Figure II.1***. The partition coefficients (logPs) of the compounds

were found on the ChemSpider website. The predicted $logP_{o/w}$ from ACD/Labs Percepta Platform PhysChem Module were used.

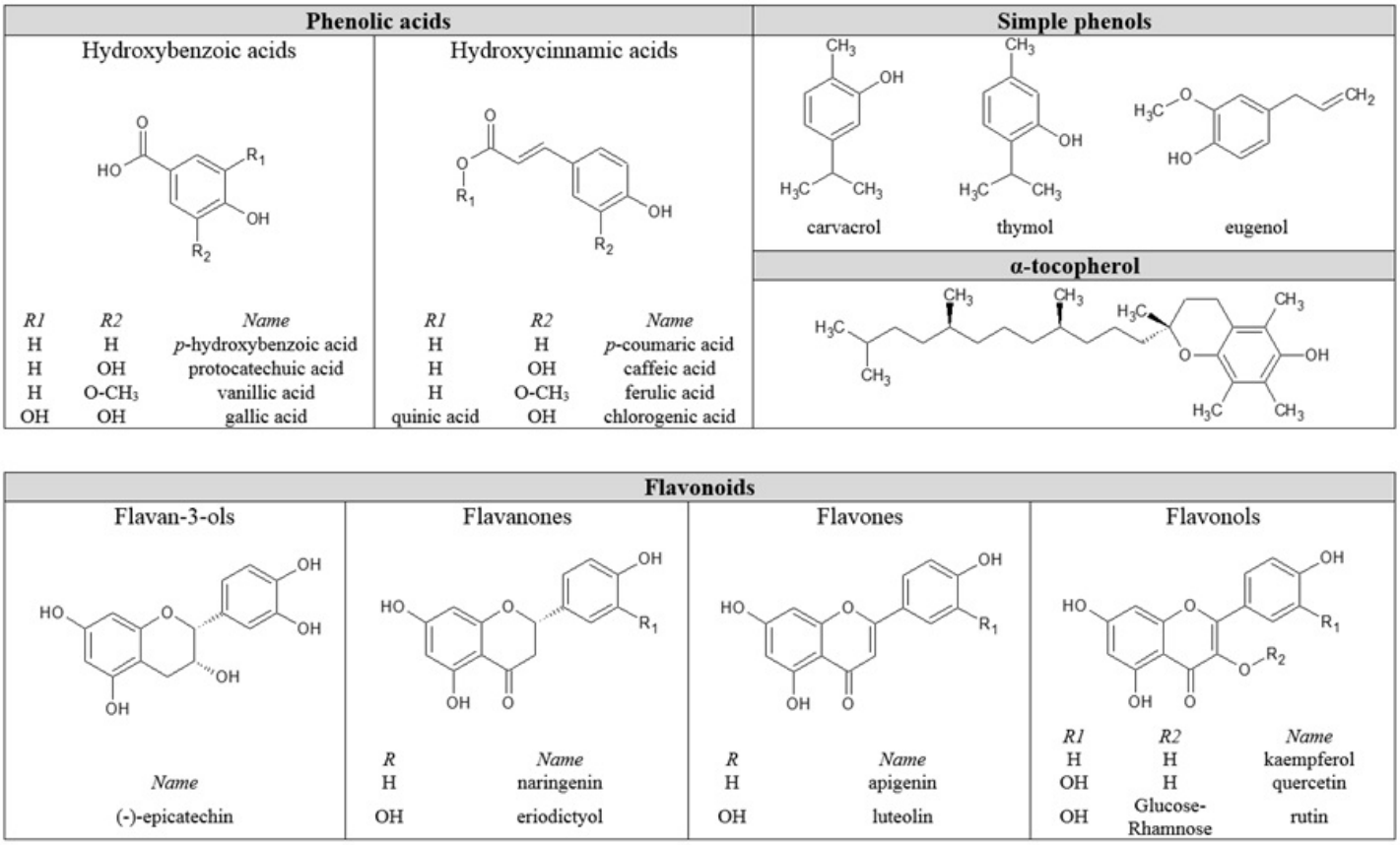


Figure II.1. *Chemical structures of the studied phenolic compounds*

For the evaluation of antioxidant activity, stock solutions of phenolic compounds were prepared by dissolution in absolute ethanol. For the evaluation of antibacterial activity, phenolic compounds were prepared according to various protocols we elaborated, depending on their solubility in the culture medium. *p*-Hydroxybenzoic, protocatechuic, gallic, and chlorogenic acid powders were directly dissolved in the culture medium. Vanillic, *p*-coumaric and ferulic acids, carvacrol, thymol, and eugenol were first dissolved in acetone, which was evaporated under nitrogen flow after addition to the culture medium. Caffeic acid, (-)-epicatechin, naringenin, and eriodictyol were first dissolved in acetone/distilled water (80/20 (v/v)) and the acetone evaporated under nitrogen flow. Bacterial growth controls were carried out to ensure the absence of inhibitory activity of trace amounts of acetone after evaporation.

II.2.3.4. Evaluation of antioxidant activity

Antioxidant activity was evaluated according to a method previously described by Peyrat-Maillard *et al.* with minor modifications (Peyrat-Maillard *et al.* 2003). The test involves a

multiphasic system and consists of measuring the capacity of phenolic compounds to delay the oxidation of linoleic acid. Conjugated diene hydroperoxides were generated by the action of a hydrophilic diazo initiator (AAPH, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) on free linoleic acid and were followed by spectrophotometry at 234 nm (Corongiu & Banni 1994) with a double-beam spectrophotometer (Spectrophotometer Specord 210 Plus, Analytik Jena, Germany).

A mixture containing 2.81 mL phosphate buffer (0.05 mol.L^{-1}, pH 7.4), 30 µL substrate solution (0.016 mol.L^{-1} 98% linoleic acid, 4.89 mmol.L^{-1} Tween 20, 20 mmol.L^{-1} sodium hydroxide in borate buffer (0.05 mol.L^{-1}, pH 9.0)), and 10 µL freshly prepared ethanolic solution of the phenolic compound were added in a spectrophotometric cuvette and incubated at 37°C for 5 min. At least five concentrations of antioxidant were tested from 0 to 9 µmol.L^{-1} for (-)-epicatechin, to 10 µmol.L^{-1} for eriodictyol, apigenin, luteolin, kaempferol, quercetin, and rutin, 12 µmol.L^{-1} for caffeic acid and chlorogenic acid, 20 µmol.L^{-1} for protocatechuic acid, ferulic acid, and α-tocopherol, 30 µmol.L^{-1} for eugenol and naringenin, 35 µmol.L^{-1} for gallic acid, 40 µmol.L^{-1} for vanillic acid, 50 µmol.L^{-1} for *p*-hydroxybenzoic acid and *p*-coumaric acid, and 70 µmol.L^{-1} for carvacrol and thymol. The maximum concentrations tested were chosen to reach equivalent antioxidant effectiveness between compounds or their solubility threshold. At least three independent experiments were conducted for each phenolic compound. Then, 150 µL AAPH solution (0.04 mol.L^{-1} in phosphate buffer 0.05 mol.L^{-1}, pH 7.4) was added. The absorbance was measured at 234 nm for at least 5 h *vs* a control containing the same solution, except the substrate, which was replaced by 30 µL borate buffer (0.05 mol.L^{-1}, pH 9.0).

The antioxidant potential of a phenolic compound is defined by its effective concentration to delay oxidation for one hour (EC_{1h}), relative to a control without antioxidant, and is expressed in µmol.L^{-1}.h^{-1}: the lower this value, the stronger the antioxidant. The EC_{1h} was determined by first plotting the concentration of conjugated dienes ($C=A_{234nm}/(l.\varepsilon)$, with l = 1 cm and ε =27 000 L.mol^{-1}.cm^{-1} (Corongiu & Banni 1994)) as a function of time for several concentrations of a given phenolic compound. Then, the time to reach a given concentration of conjugated dienes (arbitrarily chosen to be 18.5 µmol.L^{-1}) was determined (t_{Ci}) for each concentration of antioxidant. The difference between this time (t_{Ci}) and the time necessary to reach the same concentration with the control (t_{C0}) was calculated ($\Delta t_{Ci} = t_{Ci} - t_{C0}$). Δt_{Ci} was then plotted as a linear function of the concentration of the antioxidant and the slope calculated. The effective concentration to delay oxidation for one hour (EC_{1h}) corresponds to the inverse of this slope. For statistical purposes, the delayed oxidation times ($\Delta t_{Ci} = t_{Ci} - t_{C0}$) were directly used. An analysis of covariance (ANCOVA) with phenolic compound and concentration effects and with

a phenolic compound*concentration interaction was applied using XLSTAT 18.06 (Addinsoft, Paris, France). If significant effects were revealed ($p < 0.05$), an estimated mean for the delayed oxidation time was calculated and compared using the Newman Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%) to define groups of phenolic compounds with similar antioxidant behavior.

II.2.3.5. Evaluation of antibacterial activity

Antibacterial activity was evaluated by growth inhibition of *L. monocytogenes* in tryptic soy broth (TSB) medium using a method previously described with minor modifications (Guillier *et al.* 2007). Bacterial growth was followed in an automatic spectrophotometer (Bioscreen C, Labsystems, Helsinki, Finland) by measuring Optical Density (OD) at 600 nm for 72 h in two 100-well microplates. Two hundred microliters of TSB pH 7.2, with or without phenolic compounds, was added to each well. The final concentrations of the phenolic compounds in the wells varied from 0 to 2.5 $mmol.L^{-1}$ for carvacrol and thymol, to 2.6 $mmol.L^{-1}$ for eriodictyol, 2.7 $mmol.L^{-1}$ for naringenin, 8 $mmol.L^{-1}$ for eugenol, 9.4 $mmol.L^{-1}$ for (-)-epicatechin, 20 $mmol.L^{-1}$ for *p*-coumaric acid, 30 $mmol.L^{-1}$ for *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, caffeic, and ferulic acids, 35 $mmol.L^{-1}$ for chlorogenic acid, and 36 $mmol.L^{-1}$ for gallic acid. The maximum concentrations tested were chosen to obtain total growth inhibition or the solubility threshold. Five to 40 concentrations, prepared from at least two different solutions, were tested per compound. Each well was inoculated with a standardized inoculum at 1% (v/v from the second subculture: approximately 10^6 $CFU.mL^{-1}$) and the microplates incubated at 30°C with slow and continuous shaking. At least two growth curves were acquired for each concentration. The pH values of the TSB after the addition of various concentrations of phenolic compounds were measured with a pH-meter (SI Analytics lab 870, Mainz, Germany) in an independent experiment. The inhibitory activity is described by the minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC). The MIC is the concentration at which no bacterial growth is recorded and the NIC that below which the compound has no inhibitory activity. These values are expressed in $mmol.L^{-1}$: the lower the MIC, the stronger the antibacterial effect. These values were obtained after two modeling steps. First, the maximum specific growth rates (μ_{max}) were estimated from the growth kinetics by fitting the modified Gompertz model (Guillier *et al.* 2007). Second, the MIC and NIC were determined for each phenolic compound by plotting growth rates transformed by square-root as a function of the concentration and modeling μ_{max} with the Lambert Pearson model (Lambert and Pearson 2000). The solver of Microsoft Excel® (2013) was used to minimize the sum of squares and allowed

estimation of the model parameters. The standard deviations (SD) of model parameters and sums of squares were calculated with SolverAid, a complementary macro (de Levie 2012).

II.2.4. Results and discussion

II.2.4.1. Characterization of antioxidant behavior

We evaluated the antioxidant activity of the selected phenolic compounds by measuring their capacity to delay free linoleic acid oxidation ***(Table II.1)***. Many of the tested molecules had similar antioxidant behavior to that of the well-known food antioxidant α-tocopherol, which also has a phenolic group. Phenolic compounds belonging to flavan-3-ols, flavonols, and hydroxycinnamic derivatives, with an *ortho*-diphenolic structure, had the highest antioxidant potential. The results highlight the strong relationship between chemical structure and antioxidant activity. The model obtained by ANCOVA was significant ($F_{39,225} = 331.3$, $p < 0.0001$). The concentration effect was significant ($p < 0.0001$), with the delayed oxidation time ($\Delta t_{Ci} = t_{Ci} - t_{C0}$) increasing proportionally with the concentration of the compound, whereas the phenol effect was not significant ($p = 0.310$), the intercept being equal for all phenolic compounds. The interaction effect of the phenolic compound*concentration was also significant: the slope of the regression curve was associated with the nature of the phenolic compound.

Table II.1. *Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds: effective concentration to delay oxidation and non-inhibitory and minimum inhibitory concentrations for L. monocytogenes.*

Phenolic compounds	Antioxidant activity		Antibacterial activity	
	EC_{1h} ($\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$)	Groups identified with Newman Keuls comparison	NIC ± SD ($mmol.L^{-1}$)	MIC ± SD ($mmol.L^{-1}$)
Phenolic acids				
caffeic acid	1.2	CD	13.76 ± 0.50	18.03 ± 1.21
chlorogenic acid	1.2	D	18.11 ± 0.81	33.44 ± 0.54
protocatechuic acid	2.0	F	19.50 ± 0.74	24.63 ± 0.32
ferulic acid	2.2	FG	5.04 ± 0.35	13.60 ± 0.31
gallic acid	3.8	H	22.55 ± 1.17	31.70 ± 0.60
vanillic acid	8.5	J	8.93 ± 0.50	21.30 ± 0.38
p-coumaric acid	28.5	K	4.61 ± 0.49	15.44 ± 0.54
p-hydroxybenzoic acid	239.6	K	10.27 ± 0.56	17.35 ± 0.29
Simple phenols				
eugenol	2.2	G	2.88 ± 0.20	5.62 ± 0.13
thymol	8.0	IJ	0.78 ± 0.04	1.31 ± 0.05
carvacrol	8.1	IJ	0.33 ± 0.10	0.95 ± 0.07
Flavonoids				
quercetin	0.8	A	nd	nd
(-)-epicatechin	1.0	B	2.34 ± 0.30	> 9.44
rutin	1.1	BC	nd	nd
luteolin	1.2	D	nd	nd
eriodictyol	1.5	E	0.23 ± 0.30	> 2.58
kaempferol	4.8	HI	nd	nd
apigenin	43.6	K	nd	nd
naringenin	267.7	K	0.12 ± 0.11	1.85 ± 0.38
α-tocopherol (referent)	2.4	G	nd	nd

For antioxidant activity, compounds are divided into groups (with letters) for which there is no significant difference in the estimated delay for oxidation, according to the Newman Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%). For antibacterial activity, standard deviations are associated with NIC and MIC values. nd: not determined.

We observed three different kinetic behaviors when the production of conjugated dienes was measured during linoleic acid oxidation induced by the azo-initiator AAPH. Kaempferol, vanillic acid, and protocatechuic acid production illustrate the three kinetic behaviors ***(Figures***

II.2a, 2b and 2c), each including various phenolic families. Several studies have reported such kinetic behaviors, but the corresponding mechanisms have not been completely elucidated (Roche *et al.* 2005; Foti 2007; Laguerre *et al.* 2007). The first group of antioxidants belonged to chain breakers (Roche *et al.* 2005) and included kaempferol ***(Figure II.2a)***, caffeic acid, chlorogenic acid, gallic acid, α-tocopherol, luteolin, quercetin, and rutin. The second group of antioxidants, considered to be retarders (Roche *et al.* 2005), was composed of vanillic acid ***(Figure II.2b)***, *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, apigenin, carvacrol, naringenin, and thymol. The third group of antioxidants, including protocatechuic acid ***(Figure II.2c)***, ferulic acid, (-)-epicatechin, eriodictyol, and eugenol, showed intermediate behavior. Chain-breakers induce a lag-time phase, during which the lipidic substrate is not oxidized until complete consumption of the antioxidant, but is then oxidized with a peroxidation rate reaching the same value as the control without antioxidant (Foti 2007). Conversely, retarders reduce the peroxidation rate (Laguerre *et al.* 2007) without inducing a distinct lag-phase ***(Figure II.2b)*** and, according to our study, need to be used at higher concentrations to preserve linoleic acid from oxidation. Indeed, phenolic compounds that act as retarders all showed a lower antioxidant potential, with $EC_{1h} > 8$ µmol.L^{-1}.

Kinetic models have been presented in the literature (Roche *et al.* 2005; Foti 2007) to help explain these two types of behavior. According to Foti (2007), an antioxidant should show effective chain-breaker behavior if lipid peroxyl radicals $LOO^{\bullet}$ react faster with antioxidants AH ($LOO^{\bullet} + AH \rightarrow LOOH + A^{\bullet}$) than unsaturated fatty acids L'H ($LOO^{\bullet} + L'H \rightarrow LOOH + L'^{\bullet}$), suggesting a higher kinetic constant for the first reaction and thus implying a lag period (Foti 2007). For retarders, kinetic constants should be similar, leading to the absence of a lag phase, as the antioxidant is slowly consumed. In reaction systems involving AAPH, Roche *et al.* suggested that, in addition to inhibiting propagation by scavenging lipid radicals $LOO^{\bullet}$, antioxidants should also be able to scavenge the azo-initiator radicals $ROO^{\bullet}$ ($ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$) (Roche *et al.* 2005). Thus, antioxidants should inhibit the initiation step of lipid oxidation ($ROO^{\bullet} + LH + O_2 \rightarrow ROOH + LOO^{\bullet}$) (Roche *et al.* 2005). Phenolic compounds which efficiently inhibit both initiation and propagation of oxidation are described as chain-breakers; their kinetic curves show a lag phase until complete consumption of the antioxidant (Roche *et al.* 2005). In contrast, compounds which efficiently inhibit initiation, but not propagation, are described as retarders (Roche *et al.* 2005). Their kinetics do not show a lag phase and they essentially scavenge azo-initiator radicals (Roche *et al.* 2005).

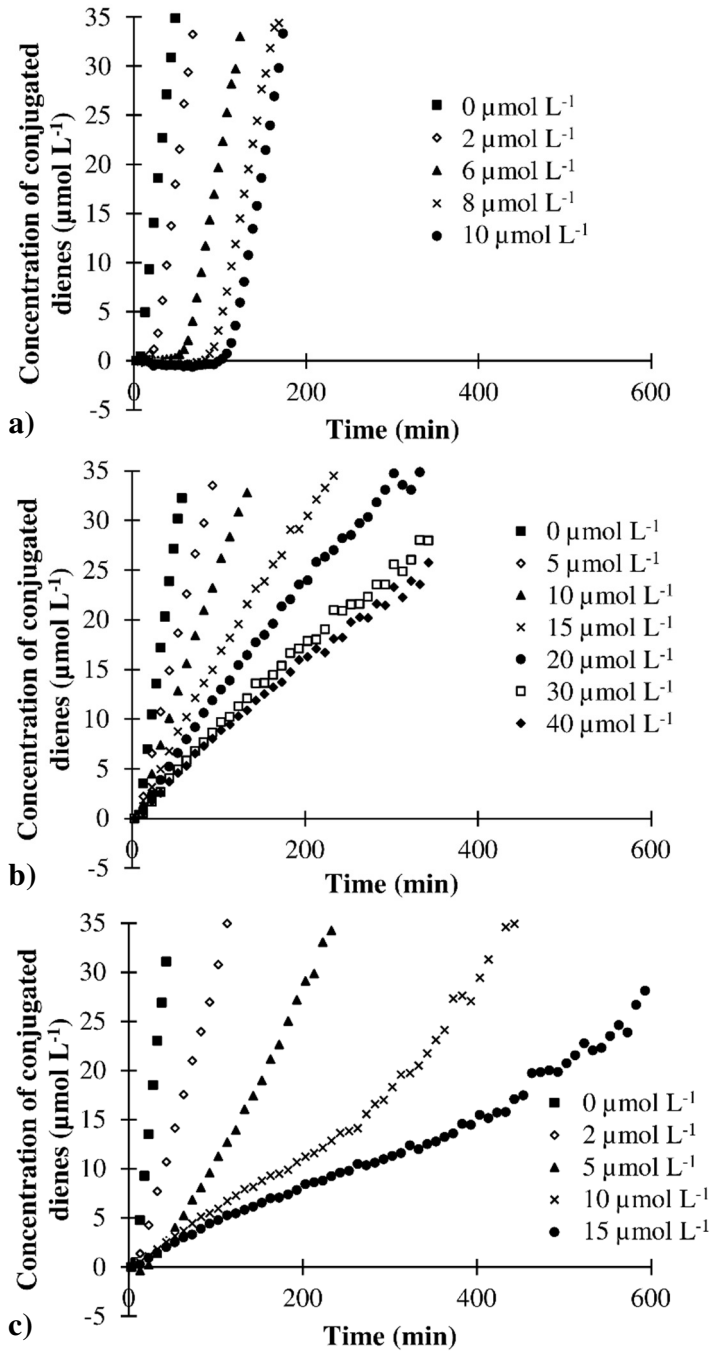


Figure II.2. *Kinetics of linoleic acid oxidation in an AAPH system (followed by conjugated dienes measurement) in the presence of various concentrations of antioxidants with three different behaviors: kaempferol, representative of chain breakers (a), vanillic acid, representative of retarders (b), and protocatechuic acid, representative of compounds with an intermediate behavior (c)*

According to Foti (2007), the values of the kinetic constant of the reaction $LOO^{\bullet} + AH \rightarrow LOOH + A^{\bullet}$ should be linked to specific chemical characteristics of the antioxidant molecules, such as: the bond dissociation energy (BDE) of the phenolic group; the steric hindrance effect

of chemical structures near the phenolic group of phenolic antioxidants; and the presence of specific chemical structures, including catechol groups (Foti 2007). Indeed, Liu and Wu (2009) demonstrated that the spin-densities of the O• atom in antioxidant radicals could provide an explanation for the difference of the antioxidant effects among various compounds with small structural differences (Liu & Wu 2009). Thus, chemical structure plays an important role in antioxidant activity. The kinetic constant values can also be linked to the location of the phenolic compound in a multiphasic system. In the AAPH system, as in the present study, lipid radicals are located in micelles of linoleic acid, whereas azo-initiator radicals are solubilized in the aqueous phase, thus adding an additional parameter to be taken into account (Roche *et al.* 2005; Kancheva & Kasaikina 2012). These studies highlight the lack of a well-defined classification between chain-breakers and retarders. The differences in the shapes of the curves may not only be due to differences in the mechanism of action of the antioxidant, but also the kinetic constants of a complex set of reactions occurring in multiphasic systems in which partitioning of the compounds must be taken into account.

II.2.4.2. Characterization of the antibacterial behavior

We evaluated the inhibitory activity of the phenolic compounds against the growth of *L. monocytogenes* through the modeling of growth curves and determination of two characteristic parameters for each compound, the MIC and NIC ***(Table II.1)***. The method used here offers two advantages relative to semi-quantitative determination of the MIC: a standard deviation is associated to the MIC value and a complementary parameter (the NIC) is provided to better characterize the activity.

Simple phenols had the highest inhibitory effect, as previously described (Burt 2004). Flavonoids also showed high inhibitory activity (naringenin) when their level of solubility allowed performance of the assay. MICs of flavonoids for *L. monocytogenes* and other Gram-positive bacteria have been estimated in the literature, but the results are inconsistent (Tsuchiya *et al.* 1996; Mandalari *et al.* 2007; Cetin-Karaca & Newman 2015).

Although less effective than phenols, phenolic acids also showed good activity ***(Table II.1)***. The most effective were *p*-coumaric and ferulic acids. The least effective were chlorogenic and gallic acids. MICs obtained in the present study for several phenolic acids were of the same order of magnitude as those obtained against *L. monocytogenes* in two other studies (Wen *et al.* 2003; Rodríguez Vaquero *et al.* 2007).

The NIC provides additional useful information concerning the activity of the phenolic compound ***(Table II.1 and Figure II.3)***. Simple phenols and flavonoids were effective at very

low concentrations, as shown for eugenol and naringenin ***(Figure II.3)***. Other compounds were effective from a NIC that was slightly higher, as demonstrated for *p*-coumaric, ferulic ***(Figure II.3)***, or vanillic acid. Finally, the NIC was much higher for many phenolic acids, including *p*-hydroxybenzoic acid and protocatechuic acid ***(Figure II.3)***, as well as gallic, caffeic, and chlorogenic acids. These behaviors show that some compounds were active from the lowest tested concentration, whereas the concentration of others needed to reach a certain threshold before reducing the bacterial growth rate.

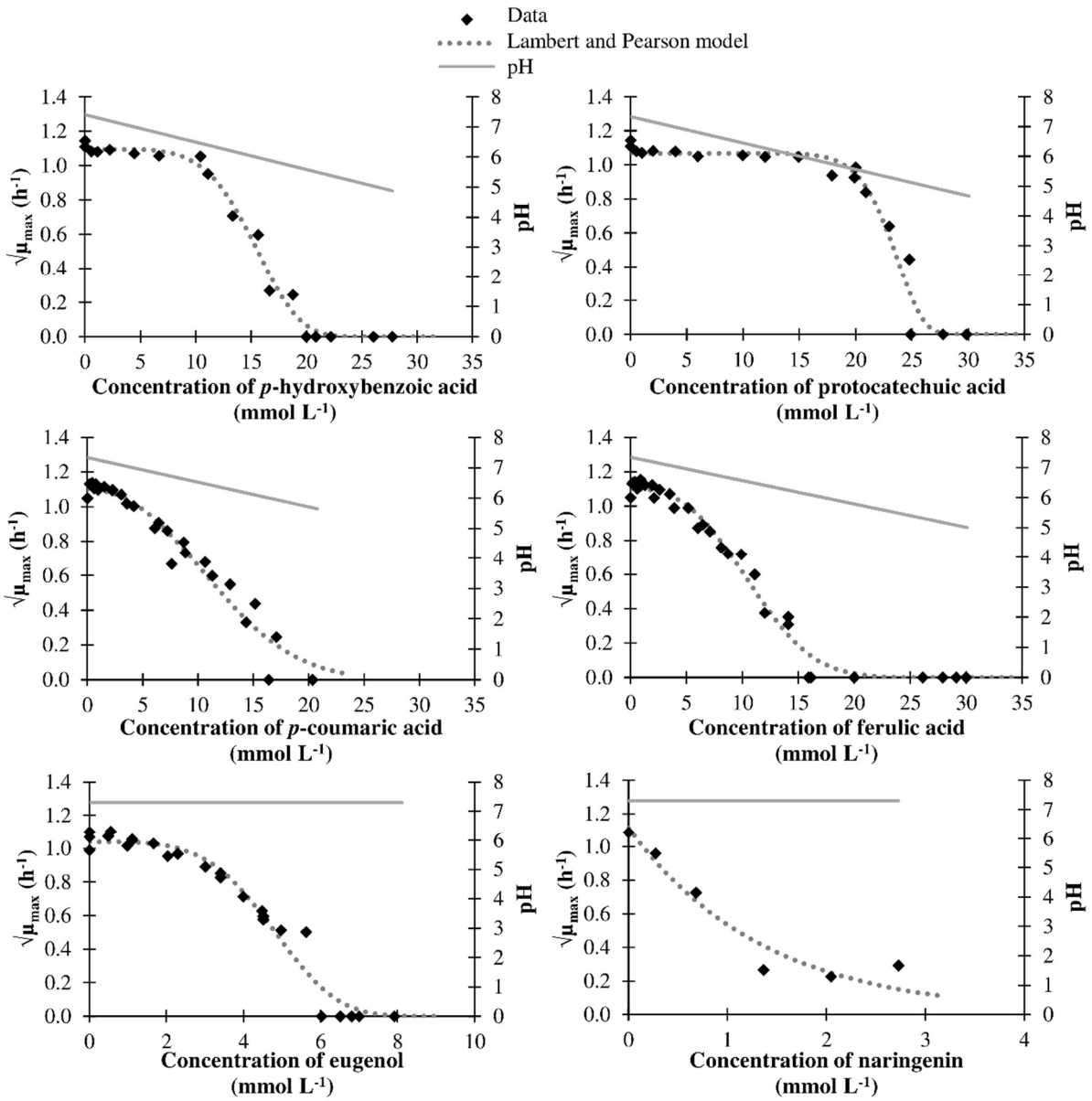


Figure II.3. *Effect of increasing concentrations of phenolic compounds on the growth of L. monocytogenes (data fitted with the Lambert-Pearson model) and broth pH*

The mechanism of action of simple phenols has been very-well described (Burt 2004). The most studied simple phenols are eugenol, thymol, and carvacrol, which are found in aromatic plants and recovered in high concentrations in essential oils and hydrosols (Burt 2004; Nazer *et al.* 2005; Verma *et al.* 2011). These compounds intercalate into the phospholipid layers of the bacterial membrane and disturb the van der Walls interactions between the lipid acyl chains, leading to the disruption of phospholipid packing and membrane integrity (Burt 2004). Consequently, ion gradients are disrupted and vital constituents, such as ions and macromolecules, are released, leading to bacterial death (Helander *et al.* 1998; Ultee *et al.* 1999; Ultee *et al.* 2002). It has been suggested in the literature that some specific values for lipophilicity parameters are associated with antibacterial activity (Ultee *et al.* 2002): a compound with a partition coefficient in octanol-water ($logP_{o/w}$) above 3 can deeply partition into membranes, whereas a $logP_{o/w}$ above 4 does not always result in higher antibacterial effectivity. Indeed, the ranking of antibacterial efficacy may be related to logP (the logP of carvacrol, thymol, and eugenol are 3.28, 3.28, and 2.20, respectively). The NIC threshold also appeared to be quite low for these three compounds ***(Figure II.3)***, reflecting intercalation into the membrane at low concentrations.

The mechanisms of action for the antibacterial properties of flavonoids are not yet fully understood. However, as naringenin has a logP similar to that of carvacrol and thymol (3.19), it is possible that naringenin has an antibacterial action similar to that of simple phenols, in accordance with the results of Tsuchiya *et al.* (Tsuchiya *et al.* 1996). Other mechanisms of action for flavonoids, including inhibition of nucleic acid synthesis and energy metabolism, have also been reviewed (Cushnie & Lamb 2005). For these compounds, small NICs reflect high activity at the lowest concentration ***(Figure II.3)***.

Antibacterial mechanisms of phenolic acids are not fully understood due to their complex multifactorial activity. First, the decrease in pH due to the introduction of the phenolic compound into the medium can have a simple and direct impact on growth. Moreover, organic acids can act by a very well-known antibacterial mechanism through the penetration of their non-dissociated form into the cell and acidification of the cytoplasm, leading to K^+ efflux and cell death. The ionization rate of the molecule is fundamental and depends on both pH and the pKa: for the same pH, the higher the pKa, the higher the proportion of the non-dissociated form. The partition coefficients of phenolic acids may also contribute to their antibacterial activity, as some logPs can be as high as 2.43 for *p*-coumaric acid. Gallic and ferulic acids have been reported to irreversibly change the properties of bacterial membranes (Borges *et al.* 2013). Regarding the five phenolic acids with a high NIC (as shown for *p*-hydroxybenzoic and

protocatechuic acids in ***Figure II.3***), the effective concentrations appeared to correlate with a pH below 6 when dissociation of acids had probably overcome the buffering capacity of the medium. In contrast, the three phenolic acids with a very low NIC were effective at pH > 6 (as shown for *p*-coumaric and ferulic acids in ***Figure II.3***), probably reflecting a mechanism of action that is less dependent on acid dissociation.

The possibility that phenolic acids may act as antibacterial compounds through combined mechanisms is supported by several studies (Ramos-Nino *et al.* 1996; Campos *et al.* 2009). Ramos-Nino *et al.* could predict the antibacterial behavior of the phenolic acid as a function of the lipophilicity parameter (logK), as well as the effect of the acid dissociation constant (pKa) (Ramos-Nino *et al.* 1996). However, the logP cannot explain all the differences we observed for phenolic acids; *p*-coumaric and ferulic acids have different partition coefficients (2.43 and 1.64 respectively) and a similar pKa, but had similar antibacterial activity.

Further studies are needed to exhaustively explore the impact of extracellular pH, undissociated acid activity, and logP on the complex antibacterial mechanism of action of phenolic acids.

II.2.4.3. Structure-activity relationships

We assessed the antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds with various structures ***(Figure II.1, Table II.1)***, allowing us to describe some structure-activity relationships for both types of activities.

The formation of catechol groups by adding a second hydroxyl group in the *ortho*-position on the aromatic ring of phenolic acids (caffeic acid *vs p*-coumaric acid, protocatechuic acid *vs p*-hydroxybenzoic acid) or the B ring of flavonoids (eriodictyol *vs* naringenin, luteolin *vs* apigenin, quercetin *vs* kaempferol) significantly improved the antioxidant potential. Such higher antioxidant activity is due to stabilization by the catechol groups of their corresponding radicals by intramolecular hydrogen bonding or the regeneration of a catechol group, in parallel with quinone formation, from two catechol radicals (Cuvelier *et al.* 1992; Brand-Williams *et al.* 1995; Rice-Evans *et al.* 1997; Peyrat-Maillard *et al.* 2003; Rösch *et al.* 2003; Bendary *et al.* 2013; Lin *et al.* 2014; Chen *et al.* 2015). In contrast, adding a third hydroxyl group (gallic acid *vs* protocatechuic acid) slightly decreased the antioxidant potential, which may have been due to higher steric hindrance. Concerning antibacterial activity, adding a second or third hydroxyl group to the phenolic ring of phenolic acids increased the MIC. This has also been reported for several bacteria, including *Bacillus cereus* (Wen *et al.* 2003; Merkl *et al.* 2010; Sánchez-Maldonado *et al.* 2011; Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012), although it cannot be generalized for all strains or species. Such addition of phenolic functions tended to decrease the partition

coefficient (e.g. 1.42 for caffeic acid *vs* 2.43 for *p*-coumaric acid), suggesting that the compound may be less easily partitioned into the lipophilic bacterial membrane, thus having lower antibacterial activity (Ramos-Nino *et al.* 1996).

We obtained similar results in our study for flavonoids, for which eriodictyol (flavanone with a catechol group on the B ring), appeared to be less effective against *L. monocytogenes* than naringenin, its corresponding molecule with only one OH group ***(Table II.1)***. This result supports the assumption that the decrease in lipophilicity induced by the addition of a hydroxyl group hinders the correct intercalation of the compound in the membrane (the logP of eriodictyol is 2.59 *vs* 3.19 for naringenin), as for phenolic acids. However, further studies are necessary to evaluate the impact of hydroxylation of the B ring on the antibacterial activity of flavonoids (Murphy Cowan 1999; Cushnie & Lamb 2005), as contradictory results have been reported in the literature (Mandalari *et al.* 2007).

The presence of a methoxyl group in the *ortho* position of a phenolic group (vanillic acid *vs p*-hydroxybenzoic acid and ferulic acid *vs p*-coumaric acid) significantly increased antioxidant activity, as *ortho* substitution with the electron donor methoxyl group increases the stability of the produced radical (Cuvelier *et al.* 1992; Maillard *et al.* 1996; Liu & Wu 2009). This had a small and variable effect on antibacterial activity, as already shown for cinnamic acids in the literature (Wen *et al.* 2003; Sánchez-Maldonado *et al.* 2011).

Esterification of caffeic acid by quinic acid, leading to chlorogenic acid, did not have any significant influence on the antioxidant potential, because the catechol group is still available. However, it resulted in an increase in the MIC, as reported in the literature (Peyrat-Maillard *et al.* 2003; Wen *et al.* 2003; Saavedra *et al.* 2010). The addition of quinic acid decreased the partition coefficient (from 1.42 to -0.36) and increased steric hindrance, probably conferring lower penetration of the compound into the membrane.

The presence of alkyl groups in the *ortho* or *para* position of the phenolic group (carvacrol and thymol) did not have any significant influence on the antioxidant potential, confirming published data (Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012). These two isomers have generally similar activities on many species, but some strains or species may be more sensitive to carvacrol, as was *L. monocytogenes* in the present study (Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012).

The addition of a cinnamic group (caffeic acid *vs* protocatechuic acid and ferulic acid *vs* vanillic acid) to the aromatic ring significantly increased both antioxidant and antibacterial activities. The capacity to stabilize the phenoxyl radical by resonance had a large effect on the antioxidant activity (Cuvelier *et al.* 1992; Brand-Williams *et al.* 1995; Rice-Evans *et al.* 1996; Peyrat-Maillard *et al.* 2003; Chen *et al.* 2015). The increase in antibacterial activity may be related to

the increased partition coefficient, due to the addition of a cinnamic group (Rodríguez Vaquero *et al.* 2007; Sánchez-Maldonado *et al.* 2011).

For flavonoids, any chemical modifications that lead to higher resonance of the molecules, thus improving the stability of the phenoxyl radicals, increased the antioxidant activity, similar to the addition of a cinnamic group on phenolic acids (Maillard *et al.* 1996; Rice-Evans *et al.* 1996; Pietta 2000; Heim *et al.* 2002; Peyrat-Maillard *et al.* 2003) ; the presence of a double bond in the 2,3-position of the C ring (luteolin *vs* eriodictyol), the addition and/or availability of a hydroxyl group in the 3-position, in combination with the double bond in the 2,3 position of the C ring (kaempferol *vs* apigenin, quercetin *vs* luteolin or rutin), or the presence of a ketone in the 4-position conjugated with the double bond in the 2,3 position of the C ring (quercetin *vs* epicatechin) ***(Table II.1)***. The impact of this type of chemical structure in flavonoids on antibacterial activity could not be tested due to solubility issues.

II.2.5. Conclusions

The chemical structure of phenolic compounds may have an opposite impact on antioxidant and antibacterial activities. These differences are attributable to completely different mechanisms of action between the two activities. The two main structural parameters that improve antioxidant activity are the chemical environment of the phenolic group and the presence of delocalization structures.

The partition coefficient may be one of the main parameters that influence antibacterial activity; in many cases, the higher the logP, the higher the bacterial growth inhibition. This is in accordance with the antibacterial activity being driven by a high lipophilicity parameter for optimized intercalation into the bacterial membrane. Nevertheless, our structure comparisons show that logP is not the only parameter to explain the compound's multifactorial antibacterial effectiveness. Finally, a series of phenolic compounds with both activities could be selected, based on these results, to conduct further studies in more complex food systems, including emulsions. The double activity of phenolic compounds can be applied in the food industry by using a mix of phenolic compounds, such as plant extracts or agro-industrial by-products, to take advantage of their complementary effects.

II.3. ARTICLE 2 – "INHIBITORY ACTIVITY OF PHENOLIC ACIDS AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES*: DECIPHERING THE MECHANISMS OF ACTION USING THREE DIFFERENT MODELS"

*Publication acceptée dans **Food Microbiology** en décembre 2018*

Aurélia Pernin[a,b], Laurent Guillier[c], and Florence Dubois-Brissonnet[a]*

[a] Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

[b] Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

[c] ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Laboratory of Food Safety, 94700, Maisons-Alfort, France

* Corresponding author: florence.dubois@agroparistech.fr

II.3.1. Abstract and keywords

Phenolic compounds are well known for their antimicrobial activity. They may provide an interesting solution to ensure food safety by preventing the growth of foodborne pathogens while addressing the wishes of consumers for the use of natural preservatives in food and favoring the reuse of agro-industry byproducts. However, their mechanism of action is still not very well understood. Here, we aimed to decipher the complex mechanism of action of eight phenolic acids by decomposing their effects, such as the general effect of the decrease of extracellular pH ($\gamma(pH)$) and specific inhibitory effects of the undissociated ($\gamma(A_u)$) and dissociated ($\gamma(A_d)$) forms. We thus developed three different models and applied them to a dataset of *Listeria monocytogenes* growth rates experimentally obtained in the presence of various concentrations of phenolic acids at several pHs. The model that best fits the dataset was selected for each phenolic acid to explore the potential mechanisms. The results show that the antimicrobial activity is mainly due to the effect of the undissociated forms, except for chlorogenic and gallic acids, for which the antimicrobial activity is mainly due to a decrease in extracellular pH. In addition, the dissociated forms of *p*-coumaric and ferulic acids show significant inhibitory activity.

Keywords: phenolic, antimicrobial, Gamma concept, undissociated form, dissociated form

II.3.2. Introduction

Listeria monocytogenes is a ubiquitous, wide spread, highly environmentally resistant (soil, lakes, rivers, etc.) soil bacterium that can contaminate food at all stages of the food chain (Anses 2011). It causes listeriosis, which affects humans and animals and occurs mainly as an invasive form (Anses 2011). Since the 90's, the prevalence of *L. monocytogenes* in many food categories has been reduced due to improved control measures (Buchanan *et al.* 2017). However, the rate of illness has remained constant over the last decade and recent outbreaks have challenged control measures (Allerberger & Wagner 2010; Buchanan *et al.* 2017). Ready-to-eat food, meat, fish, and dairy products, as well as fruits and vegetables, are the predominant vehicles involved in the main listeriosis outbreaks (Rodríguez-López et al. 2018).

The use of preservatives can help to inhibit microbial growth or inactivate pathogenic bacteria. However, this approach is increasingly challenging due to the emergence of bacterial resistance, mistrust of consumers towards chemical additives, and regulatory constraints that reduce the list of protective ingredients. Thus, there is renewed interest in several families of natural antimicrobials (Weiss *et al.* 2015; Sorrentino *et al.* 2018). Simple phenols, such as eugenol, thymol, and carvacrol, are found in aromatic plants and recovered in high concentrations in essential oils and hydrosols. They intercalate into the phospholipid layers of the bacterial membrane and disturb the van der Waals interactions between the lipid acyl chains, leading to the disruption of phospholipid packing and membrane integrity (Burt 2004). Consequently, ion gradients are disrupted and vital constituents, such as ions and macromolecules, are released, leading to bacterial death.

Organic acids act by a very well-known antimicrobial mechanism through the penetration of their undissociated form into the cell and acidification of the cytoplasm leading cell death. Phenolic acids are of interest due to their natural plant-based origin, their presence in large quantities in byproducts of the fruit, wine and cereal industries and their demonstrated global antimicrobial activity. We previously evaluated the inhibitory activity of several phenolic acids against *Listeria monocytogenes* as a function of their total concentration (Pernin *et al.* 2018). However, very few studies have focused on deciphering the various effects of their inhibitory activity, which can be similar to those of organic acids and/or simple phenols (Sorrentino *et al.* 2018).

We reasoned that the total inhibitory activity is a combination of the following effects: *i)* decreased pH in the presence of phenolic acids which directly inhibits growth, *ii)* the inhibitory effect of the undissociated acid form, and *iii)* the inhibitory effect of the dissociated acid form.

Each acid form could potentially either intercalate into the phospholipid membrane or cross the membrane and decrease the intracellular pH and/or interact with cellular constituents.

Here, we aimed to decipher the complex mechanism of action of phenolic acids by decomposing the various inhibitory effects. We thus developed three different models using the Gamma concept approach (Zwietering *et al.* 1992; Lambert & Bidlas 2007). These models aim to describe the proportion of inhibition due to the three potential effects. The eight phenolic acids (*p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, gallic, vanillic, *p*-coumaric, caffeic, ferulic and chlorogenic acids) studied were chosen based on their efficiency in our previous study (Pernin *et al.* 2018). The model that best fits the dataset was selected for each phenolic acid to explore the potential mechanisms.

II.3.3. Materials and methods

II.3.2.1. Chemical reagents

Hydrochloric acid (1 mol/L), sodium hydroxide (1 mol/L), and acetone were purchased from Carlo Erba (Fontenay-aux-Roses, France).

II.3.2.2. Bacterial strain

The strain used in this study was *Listeria monocytogenes* CNL 895805, serotype ½ a, isolated from sheep brain. It was graciously provided by P. Velge (INRA, Nouzilly) (Van Langendonck *et al.* 1998). Before each experiment, the strain, stored in cryovials at -80°C, was resuscitated in two successive subcultures in tryptic soy broth (TSB, Biomérieux, France) at 30°C.

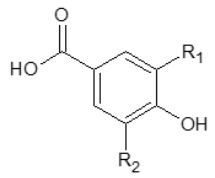
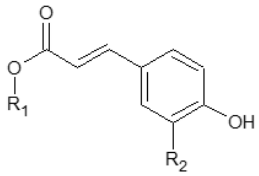
II.3.2.3. Phenolic compounds

p-Hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, gallic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, and chlorogenic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). The chemical structures and physicochemical parameters (pKa, logP) are provided in ***Table II.2***.

Stock solutions of the phenolic compounds were prepared according to specific protocols depending on their ability to be solubilized in the culture medium. *p*-Hydroxybenzoic, protocatechuic, gallic, and chlorogenic acids powders were directly dissolved in the culture medium. Vanillic, *p*-coumaric, and ferulic acids were first dissolved in acetone, which was evaporated under nitrogen flow after addition to the culture medium. Caffeic acid was first dissolved in acetone/distilled water (80/20 (v/v)) and the acetone evaporated under nitrogen

flow. Bacterial growth controls were carried out to ensure the absence of inhibitory activity of trace acetone after evaporation.

Table II.2. *Chemical structures and physico-chemical parameters of the eight studied phenolic acids*

Phenolic acid	R1	R2	Name	pKa (ChemIDPlus, PubChem)	logP of undissociated form, determined at pH=1.7 (Chemicalize)	logP of dissociated form, determined at pH=8.0 (Chemicalize)
Hydroxybenzoic acids 	H	H	*p*-hydroxybenzoic acid	4.54	1.33	-1.95
	H	OH	protocatechuic acid	4.26	1.02	-2.35
	H	O-CH_3	vanillic acid	4.51	1.17	-2.19
	OH	OH	gallic acid	4.40	0.72	-2.73
Hydroxycinnamic acids 	H	H	*p*-coumaric acid	4.64	1.83	-1.58
	H	OH	caffeic acid	4.62	1.53	-1.98
	H	O-CH_3	ferulic acid	4.58	1.67	-1.81
	quinic acid	OH	chlorogenic acid	2.66	-0.28	-3.79

II.3.2.4. Growth in the presence of phenolic compounds at various pHs

The growth of *L. monocytogenes* was followed in TSB containing one of the eight phenolic acids at various pHs. The phenolic acids were added at various concentrations in either neutral TSB pH 7.2 (7.1-7.4) or acidic TSB pH 5.5 (5.5-5.7). pH 7.2 is the native pH of TSB and it is optimal for *L. monocytogenes* growth (Anses, 2011). pH 5.5 allows to increase the concentrations of undissociated forms of acids without decreasing too much the growth rate of *L. monocytogenes*. After solubilization of the phenolic acid at the target concentration in TSB 7.2, the pH was adjusted to 7.2 (7.2a) with 1 mol/L sodium hydroxide or not adjusted (7.2na) (Pernin *et al.* 2018). Similarly, TSB 5.5 was adjusted to a pH of 5.5 (5.5a) or not adjusted (5.5na). The pH of each culture medium was measured with an SI Analytics lab 870 pH-meter (Mainz, Germany) in an independent experiment. Gallic, caffeic, and chlorogenic acids were not tested in TSB 7.2a because the medium became brown after pH adjustment, probably due to oxidation.

The final concentration of the phenolic compounds in TSB varied from 0 to at least 30 mmol/L. For some compounds, the minimal inhibitory concentration was not achieved due to solubility issues. Eight to 64 concentrations prepared from at least two different stock solutions were

tested per compound for each series of experiments and a total of 47 to 146 assays were conducted for each compound.

The largest possible range of conditions was tested to allow the best adjustment of the models: total acid concentration, concentration of undissociated or dissociated forms, and pH. Series 7.2na covered pH ranges from 7.2 to 3.2 (0-10 mmol/L of the undissociated form and 0-20 mmol/L of the dissociated form) and series 5.5na, 5.5 to 4.0 (0-15 mmol/L of the undissociated form and 0-10 mmol/L of the dissociated form). Series 7.2a and 5.5a were set to the pH of the initial TSB batch, around 7.2 and 5.5, respectively. The concentration of the undissociated form was close to zero and that of the dissociated form from 0 to 30 mmol/L for series 7.2a. The corresponding values for the series 5.5a were from 0 to 1.5 mmol/L and 0-25 mmol/L.

TSB at pH adjusted from 3 to 7 with 1 mol/L hydrochloric acid was prepared to evaluate the effect of pH on bacterial growth in the absence of the phenolic acids. In total, 15 pHs were tested in two independent experiments.

TSB of each series was inoculated at 1% (v/v from the second subculture; approximately 10^6 CFU/mL) with a standardized inoculum. Two hundred microliters of inoculated TSB from each series was added to the wells of 100-well microplates which were incubated at 30°C with slow continuous shaking. Bacterial growth was followed in an automatic spectrophotometer (Bioscreen C, Labsystems, Helsinki, Finland) by measuring the optical density (OD) at 600 nm for 72 h. In total, 1408 growth kinetics were acquired.

II.3.2.5. Determination of the growth rate

Maximum specific growth rates (μ_{max}) of *L. monocytogenes* were estimated from the growth kinetics by fitting the modified Gompertz model (Guillier *et al.* 2007; Pernin *et al.* 2018). The standard deviations of the model parameters and sum of squares were calculated using the complementary macro SolverAid (de Levie 2012).

II.3.2.6. Modeling the effect of different acid forms on the growth rate

The effect of phenolic acids on the growth rate of *L. monocytogenes* was modelled using the Gamma concept approach (Zwietering *et al.* 1992; Lambert & Bidlas 2007). The effects of pH and undissociated and dissociated forms of the acid were taken into account (equation 7).

$$\mu_{max} = \mu_{ref} \cdot \gamma(pH) \cdot \gamma(A_u) \cdot \gamma(A_d) \qquad \text{(equation 7)}$$

where:

μ_{ref} is the *L. monocytogenes* maximum specific growth rate at 30°C in TSB at optimal pH and without phenolic acid and γ(pH) describes the pH effect as described in equation 8 (Presser *et al.* 1997).

$$\gamma(pH) = 1 - \frac{10^{pH_{min}}}{10^{pH}} \qquad \text{(equation 8)}$$

The pH_{min} value was set to 4.24 (Augustin *et al.* 2005).

$\gamma(A_u)$ describes the effect of the undissociated form as described in equation 9 (Presser *et al.* 1997).

$$\gamma(A_u) = \left(1 - \frac{A_{tot}}{MIC_u \cdot (1+10^{pH-pKa})}\right)^{\alpha} \qquad \text{(equation 9)}$$

where MIC_u is the minimum inhibitory concentration of the undissociated form of the acid, α is a shape parameter, and A_{tot} is the concentration of total acid.

$\gamma(A_d)$ describes the effect of the dissociated form as described in equation 10 (Presser *et al.* 1997).

$$\gamma(A_d) = \left(1 - \frac{A_{tot}}{MIC_d \cdot (1+10^{pKa-pH})}\right) \qquad \text{(equation 10)}$$

where MIC_d is the minimum inhibitory concentration of the dissociated form of the acid.

Three different models are proposed.

In model #1, pH is the only factor taken into account and μ_{ref} is the only parameter to estimate (equation 11).

$$\mu_{max} = \mu_{ref} \cdot \gamma(pH) \qquad \text{(equation 11)}$$

In model #2, pH and A_u are the factors taken into account and μ_{ref}, MIC_u and α are the parameters to estimate (equation 12).

$$\mu_{max} = \mu_{ref} \cdot \gamma(pH) \cdot \gamma(A_u) \qquad \text{(equation 12)}$$

In model #3, pH, A_u and A_d are the factors taken into account and μ_{ref}, MIC_u, α and MIC_d are the parameters to estimate (equation 13).

$$\mu_{max} = \mu_{ref} \cdot \gamma(pH) \cdot \gamma(A_u) \cdot \gamma(A_d) \qquad \text{(equation 13)}$$

II.3.2.7. Statistical approach

The model parameters were fitted with Excel solver according to minimization of the residual sum of square errors (RSS) for the tested mathematical model. The three models were compared according to the Bayesian information criterion (BIC) (equation 14)

$$BIC = n \cdot ln\left(\frac{RSS}{n}\right) + k \cdot \ln(n) \qquad \text{(equation 14)}$$

where n is the number of experimental points and k the number of parameters of the model.

II.3.4. Results and Discussion

II.3.4.1. Characterization of the models

Modeling with the Gamma concept approach (Lambert & Bidlas 2007) allowed quantification of the relative importance of each impact factor. It is here difficult to show a graphical representation of the whole dataset of observed and predicted growth rates because there are four relevant impact factors: pH, A_{tot}, A_u, A_d. Thus, we show in ***Figure II.4*** the predicted μ_{max} as a function of the observed μ_{max} for each phenolic acid. It illustrates that the chosen models fit well the datasets whatever the compound.

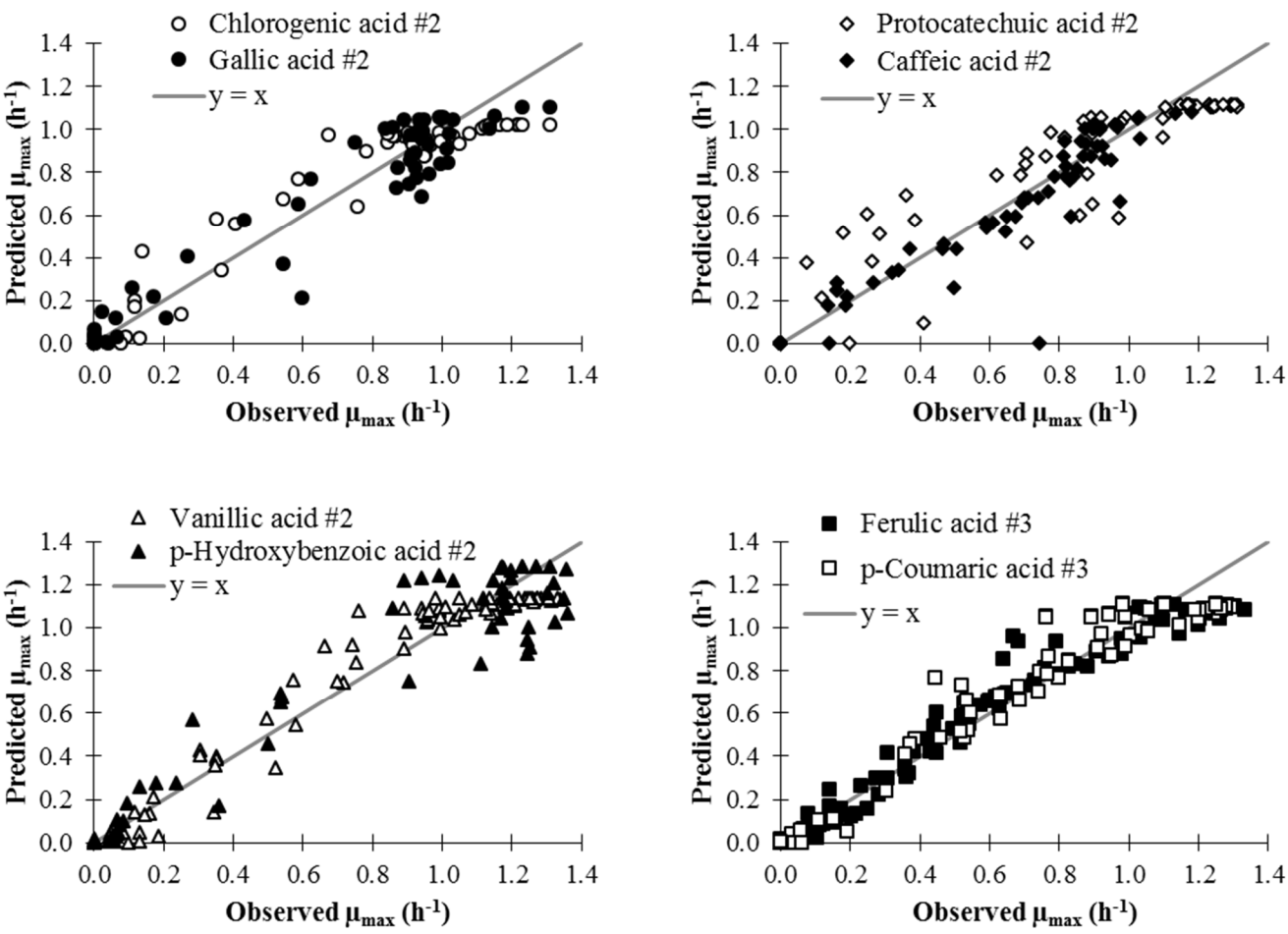
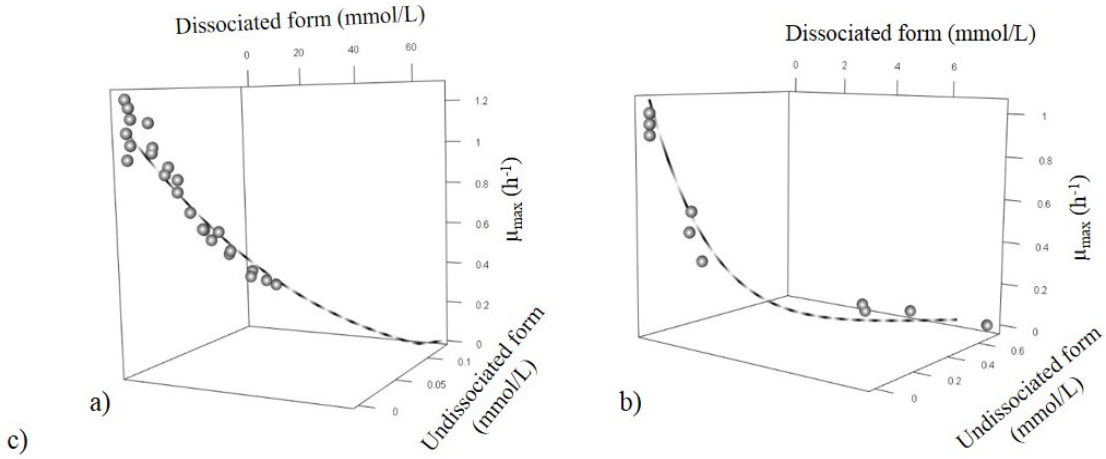


Figure II.4. *Representation of the predicted μ_{max} as a function of the observed μ_{max} for the eight phenolic acids and their best fitting models (#3 for ferulic and p-coumaric acids, #2 for the others)*

Moreover, ***Figure II.5*** shows how the models and the Gamma concept approach work. It gives more details about the fitness of model #3 applied to the ferulic acid dataset ***(Figures II.5a and b)***. The growth rates obtained with various concentrations are represented as a function of the concentrations of the undissociated and dissociated forms for two pHs (5.6 and 7.3). A given concentration of total acid at a given pH corresponds to a concentration of the undissociated and dissociated forms, together with an observed and a predicted μ_{max} ***(Figure II.5c)***. The model provides a value for the reduction of μ_{max} independently associated with the undissociated form, dissociated form, and pH. For example, when ferulic acid is introduced at 0.91 mmol/L in TSB adjusted to pH 5.6, the growth rate μ_{max} is divided by 1/0.57 (that is, 1/γ) due to the undissociated form, 1/0.99 due to the dissociated form, and 1/0.96 due to the decrease in pH, relative to the growth rate in the absence of the phenolic acid. In this example, the

antimicrobial effect of the undissociated form is far more predominant than that of the dissociated form and pH ***(Figure II.5c)***.



c)

Total **ferulic acid** (mmol/L)	Undissociated acid form (mmol/L)	Dissociated acid form (mmol/L)	pH	Observed μ_{max} (h^{-1})	Reduction associated to undissociated form $\gamma(A_u)$	Reduction associated to dissociated form $\gamma(A_d)$	Reduction associated to pH $\gamma(pH)$	Predicted μ_{max} (**model #3**) $\mu_{ref} \cdot \gamma(A_d) \cdot \gamma(A_u) \cdot \gamma(pH)$
0.00	0.00	0.00	7.3	1.25	1.00	1.00	1.00	1.11
0.60	0.00	0.60		1.21	0.99	0.99		1.09
5.13	0.01	5.12		1.01	0.94	0.92		0.96
10.26	0.02	10.24		0.82	0.88	0.84		0.82
15.14	0.03	15.11		0.64	0.81	0.76		0.69
20.29	0.04	20.25		0.52	0.76	0.68		0.57
25.65	0.05	25.60		0.41	0.73	0.60		0.48
30.28	0.06	30.22		0.36	0.66	0.52		0.38
0.00	0.00	0.00	5.6	0.99	1.00	1.00	0.96	1.06
0.91	0.08	0.83		0.45	0.57	0.99		0.60
5.18	0.45	4.73		0.07	0.02	0.93		0.02
8.23	0.72	7.51		0.00	0.00	0.88		0.00

Figure II.5. *Fitted complete model #3 with an example of the partial dataset of ferulic acid at pH 7.3 (a) and at pH 5.6 (b) and associated table of gammas for the undissociated form, dissociated form and pH (c)*

When ferulic acid is introduced at 30.28 mmol/L in TSB adjusted to pH 7.3, the growth rate μ_{max} is divided by 1/0.66 due to the undissociated form and 1/0.52 due to the dissociated form. The antimicrobial effect of the dissociated form is here almost the same as that of the undissociated form. The pH has no effect (γ = 1.00), as this pH is optimal for the growth of *L. monocytogenes*. Such tables, which set the three Gamma values for all concentrations of each phenolic acid help in understanding the relative impact of each factor in the inhibition of bacterial growth.

We compared the BICs obtained for each of the three models for each phenolic acid ***(Table II.3)***: the lower the BIC, the better the model fits the dataset.

Table II.3. *Estimated parameters and BIC for the three models and the eight phenolic acids*

Phenolic acids	pH_{min}	Models										
		#1		#2				#3				
		μ_{ref}	BIC	μ_{ref}	α	MIC_u	BIC	μ_{ref}	α	MIC_u	MIC_d	BIC
Chlorogenic acid	4.24	0.95	- 228	1.03	6.34	2.55	- 241	1.04	6.33	2.55	6420.34	- 237
p-Coumaric acid		0.34	- 157	1.11	3.69	0.94	- 450	1.11	3.70	0.94	72.43	- 530
Caffeic acid		0.41	- 166	1.08	1.00	1.06	- 476	1.04	0.64	0.91	66 356.72	- 372
Gallic acid		0.84	- 173	1.10	9.39	46.88	- 230	1.11	9.35	47.10	1 000.00	- 225
Vanillic acid		0.48	- 177	1.14	8.20	3.24	- 552	1.16	7.70	3.09	424.09	- 549
Protocatechuic acid		0.76	- 169	1.12	1.00	2.12	- 309	1.18	4.21	5.07	20 718.84	- 297
p-Hydroxybenzoic acid		0.48	- 121	1.29	11.11	3.30	- 337	1.29	10.17	3.06	41 176.98	- 333
Ferulic acid		0.25	- 133	1.06	8.00	1.20	- 485	1.11	8.55	1.26	63.52	- 536

The use of the Gamma concept approach together with the calculated BIC allows adjustment of the number of parameters to that which is most relevant. The parsimony principle (Ross & Dalgaard 2004) states that "models should have no more parameters than are required to describe the underlying behavior studied. Too many parameters can lead to a model that fits the error in the data, *i.e.* generates a model that is specific to a particular set of observations". We thus deleted parameters that did not improve the BIC.

In models #2 and #3, a shape parameter describing the slope of the curve $\mu = f(A_u)$ at low concentrations is estimated for each phenolic acid ***(Table II.3)***. It accounts for the potential non-linear shape of the decrease in μ when the concentration of the undissociated form increases. The implication of the α parameter value for each phenolic acid and its relation to the antimicrobial mechanism will be discussed in section II.3.3.2.2.

To our knowledge, there is no other description in the literature of a model that takes into account the undissociated and dissociated forms in the inhibitory activity of phenolic acids. A very small number of studies have attempted to model the antimicrobial activity of phenolic acids, such as that of Ramos-Nino *et al.* (1996), which linked the inhibitory activity of phenolic acids with their logP and pKa. In contrast, more studies have attempted to model the antimicrobial activity of organic acids. They have used various types of models, such as principle component analysis (Hsiao & Siebert 1999; Nakai & Siebert 2003) or multivariate linear regression (George *et al.* 1996). However, only a few have studied the effect of the dissociated forms (Eklund 1983; Eklund 1985; Presser *et al.* 1997). Eklund proposed a mathematical model to calculate the effect of the undissociated and dissociated forms of sorbic, benzoic, and propionic acid on several microorganisms (Eklund 1983; Eklund 1985). In this model, the specific effect of each form was calculated from the measured MIC of the total form of the organic acid at different pHs (from pH 4.6 to 7.6).

The model of Presser *et al.* (1997) is closer to ours. These authors modeled growth rates of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration, taking into account a suboptimal pH term, an undissociated organic acid term, and a dissociated organic acid term. A shape parameter, α, for the undissociated acid term was added in our study, together with application of the parsimony principle, by combining the Gamma concept approach and calculation of the BIC.

II.3.4.2. Hypothesis on the antimicrobial mechanism based on the best-fitting model

Model #2 fits the best for caffeic, chlorogenic, gallic, *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, and vanillic acids. Model #3 fits the best for *p*-coumaric acid and ferulic acid ***(Table II.3)***. Model #1 never provided a best fit. Thus, considering only decreases in extracellular pH cannot completely describe the dataset for any of the tested phenolic acids.

II.3.4.2.1. Decreasing extracellular pH: the main antimicrobial mechanism of action for chlorogenic and gallic acids

Although the best-fitting model for chlorogenic acid and gallic acid was model #2 ***(Table II.3)***, the calculated MIC_u are extremely high, above the solubility thresholds of these two compounds. At pH 5.5, 1,766.72 mmol/L total chlorogenic acid and 637.06 mmol/L gallic acid would be needed to reach the MIC_u, at least 16-fold higher than that for protocatechuic acid. Thus, even if the undissociated forms of chlorogenic acid and gallic acid significantly decreased the growth rate, their effect was very small relative to that of other phenolic acids. In addition, the datasets of the bacterial growth rates obtained as a function of pH for various concentrations of chlorogenic and gallic acids clearly overlap to those obtained for hydrochloric acid ***(Figure II.6a)***. Moreover, at adjusted pH 5.5, increasing the concentration of chlorogenic or gallic acids did not have any visible impact on growth rates ***(Figure II.6b)***. Similarly, Wen *et al.* (2003) showed that chlorogenic acid had no antimicrobial activity on *L. monocytogenes* at pH 5.5 adjusted. Indeed, the mode of action for these two acids is mainly due to the decrease of extracellular pH.

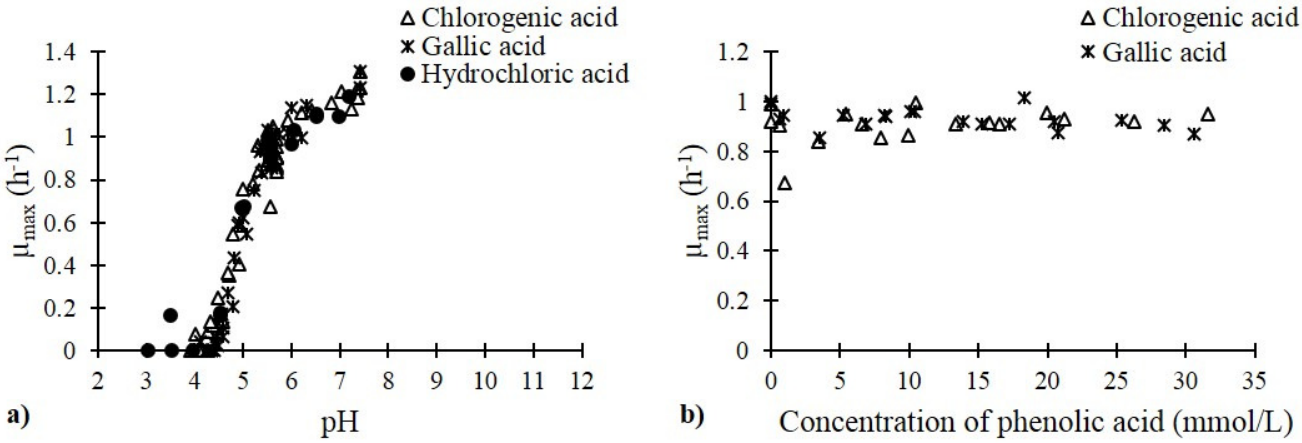


Figure II.6. *L. monocytogenes growth rates (a) as a function of pH in the presence of various concentrations of chlorogenic and gallic acids compared to those at different pHs adjusted with hydrochloric acid and (b) as a function of concentrations of chlorogenic and gallic acids at pH 5.5a*

In order to better illustrate the mechanism of action of these acids, we compared the growth rates in the presence of gallic acid to those in presence of vanillic acid. Addition of either acid to the culture medium to a total acid concentration of 10 mmol/L reduced the pH to approximatively 4.6. However, according to the MIC_u and pKa values, $\gamma(pH) = 0.54$ and $\gamma(A_u) = 0.43$ for gallic acid and $\gamma(pH) = 0.58$ and $\gamma(A_u) = 0.00$ for vanillic acid. The inhibitory effect of the undissociated form was significant for gallic acid but limited to a reduction by 1/0.43. In contrast, it was far more predominant for vanillic acid, as it completely inhibited growth.

Most published studies do not separate the specific inhibitory effect due to the undissociated form and the decrease of extracellular pH. However, chlorogenic acid and gallic acid have been shown to be relatively ineffective antimicrobials among phenolic acids (Wen *et al.* 2003; Saavedra *et al.* 2010; Sánchez-Maldonado *et al.* 2011; Gutiérrez-Larraínzar *et al.* 2012; Pernin *et al.* 2018).

Several hypotheses can be formulated to explain the lack of antimicrobial activity of the undissociated acid form of chlorogenic and gallic acids. First, their high steric hindrance, especially that of chlorogenic acid, could limit their penetration through the membrane even if Ramos-Nino *et al.* (1996) showed that this parameter was not relevant to describe the antimicrobial efficiency of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids. Second, their low partition coefficient could limit their partition into the bacterial membrane ***(Table II.2)***. However, organic acids are highly active while they have low partition coefficient (Hirshfield *et al.* 2003; Lu *et al.* 2011). In addition, several studies have demonstrated an antimicrobial effect of the undissociated form of chlorogenic acid and gallic acid at the membrane level (Lou

et al. 2011; Borges *et al.* 2013). Gallic acid was shown to modify the membrane hydrophobicity and charge of *L. monocytogenes* and to cause local ruptures or pore formation in the cell membranes (Borges *et al.* 2013). Chlorogenic acid induces outer membrane modifications and loss of membrane integrity of *Streptococcus pneumonia*e and *Shigella dysenteriae* (Lou *et al.* 2011).

II.3.4.2.2. The antimicrobial effect of the undissociated forms: the main antimicrobial mechanism of action for caffeic, vanillic, protocatechuic and p-hydroxybenzoic acids

Most of the phenolic acids tested, namely caffeic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, and vanillic acid, best fit with model #2, with realistic MIC_u values ***(Table II.3)***. The comparison of phenolic acids with different α shape parameters resulted in different profiles ***(Figure II.7)***. Some acids, such as protocatechuic acid and caffeic acid, display a linear antimicrobial effect when concentration of undissociated form of phenolic acids increase (α = 1). In contrast, phenolic compounds with α >1 have a steeper slope, as shown for vanillic acid (α = 8.20) and *p*-hydroxybenzoic acid (α = 11.11) in model #2 represented at pH 5.5 ***(Figure II.7)***. The higher the value of α (>1), the higher the effect of an additional molecule at low concentrations. Compounds with α = 1, such as caffeic and protocatechuic acids, have very close chemical structures (2 OH groups on the phenolic ring; ***Table II.2***). Differences between α could be due to differences in the ability of these phenolic acids to penetrate through or accumulate in the bacterial membrane. This is the first report characterizing a shape parameter α for the effect of undissociated forms of phenolic acids. This parameter can be a key factor in choosing an antimicrobial agent that will be highly active at very low concentrations.

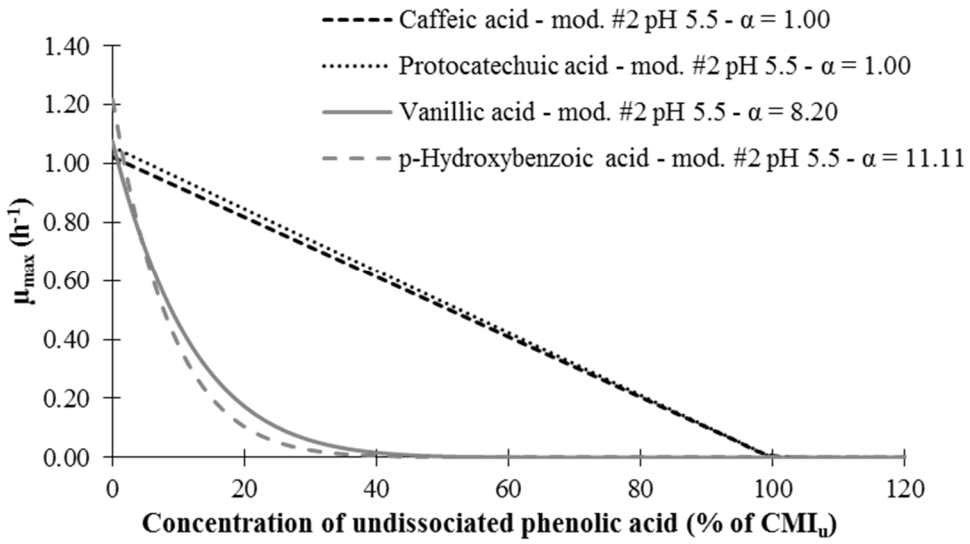


Figure II.7. *L. monocytogenes growth rates as a function of concentration of undissociated acid at pH 5.5, for four phenolic acids with the best fitting model #2*

II.3.4.2.3. Phenolic acids with a dissociated form that is significantly antimicrobial

Model #3 best fits the *p*-coumaric acid and ferulic acid datasets. The antimicrobial effect of the undissociated form and decrease in the extracellular pH cannot explain the entire mode of action. The introduction of ferulic acid at 30.28 mmol/L in TSB adjusted to pH 7.3, divided the growth rate μ_{max} by 1/1.00 due to the pH, 1/0.66 due to the undissociated form, and 1/0.52 due to the dissociated form relative to that of the control ***(Figure II.5c)***. Similarly, introduction of *p*-coumaric acid at 31.55 mmol/L in TSB adjusted to pH 7.4 divided the growth rate by 1/0.78 due to the undissociated form and 1/0.57 due to the dissociated form relative to that of the control. There are several examples for *p*-coumaric acid and ferulic acid in which $\gamma(A_d)$ was close to or even lower than $\gamma(A_u)$. Under specific conditions, the inhibitory effect of the dissociated form predominates over that of the undissociated form and pH. In contrast, $\gamma(A_d)$ never dropped below 1.00 for *p*-hydroxybenzoic, caffeic, or protocatechuic acids or below 0.93 for vanillic acid when model #3 was applied to other phenolic acids. *p*-Coumaric and ferulic acids are therefore the most efficient antimicrobials at pH 7.2, relative to the other phenolic acids, due to their dissociated form which plays a significant role in decreasing the growth rate. Nevertheless, their MIC_d values, calculated for pH 7.2, are very high, 72.63 and 63.67 mmol/L, respectively, which is above their solubility threshold. These results show that *p*-coumaric acid and ferulic acid can be efficient antimicrobial agents, even close to neutral pH, and this feature is important for the choice of compounds in several applications.

This is the first report of the inhibitory efficacy of the dissociated form of a phenolic acid. The MIC_d for *p*-coumaric acid and ferulic acid against *L. monocytogenes* are 10-times lower than

the average order of magnitude found in the literature for organic acids on several bacteria: lactate (800-1250 mmol/L (Presser *et al.* 1997)), propionate (380-830 mmol/L (Eklund 1985)), benzoate (90-200 mmol/L (Eklund 1985)), and sorbate (50-400 mmol/L (Eklund 1983)).

Only a few hypothesis has been previously proposed concerning the potential antimicrobial mechanism of action of the dissociated form of organic acids such as effects on cell wall and membrane, inhibition of substrate transport or of key enzymes in the case of sorbates (Sofos *et al.* 1986). Interestingly, *p*-coumaric and ferulic acids share similarities in their chemical structures. They both contain a cinnamic group between the phenolic ring and the carboxylic function and have only one OH group on their phenolic ring ***(Table II.2)***. Thus, it is possible that specific chemical structures interact with the bacterial membrane or specific receptors. Moreover, the logPs of *p*-coumaric and ferulic acids at pH 8.0 (where ~ 100% of the acid is dissociated) are the highest among phenolic compounds: -1.58 and -1.81, respectively ***(Table II.2)***. Their « higher » partition coefficient may favor interaction with the bacterial membrane, even if these values are far from the optimal logP values described for this activity (Ultee *et al.* 2002). Further studies are needed to better understand the antimicrobial mechanism of action of the dissociated forms of both organic and phenolic acids.

II.3.5. Conclusion

We present here an original modeling approach which allows a better understanding of the mechanism of action of eight phenolic acids. It quantifies the role of the three different antimicrobial factors (decrease in extracellular pH, the undissociated acid form, the dissociated acid form). The results allowed classification of these phenolic acids into three categories ***(Figure II.8)***. First, chlorogenic acid and gallic acid mainly inhibit the growth of *L. monocytogenes* through their ability to decrease extracellular pH, the molecules themselves having a low antimicrobial activity on bacterial growth. Second, caffeic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, and vanillic acid exert antimicrobial behavior mainly through the ability of their undissociated form to inhibit the growth of *L. monocytogenes*. Third, *p*-coumaric acid and ferulic acid similarly exert antimicrobial behavior through their undissociated form, but their dissociated form also shows significant antimicrobial activity. These results will help in choosing the most relevant antimicrobial compounds based on product characteristics, particularly pH.

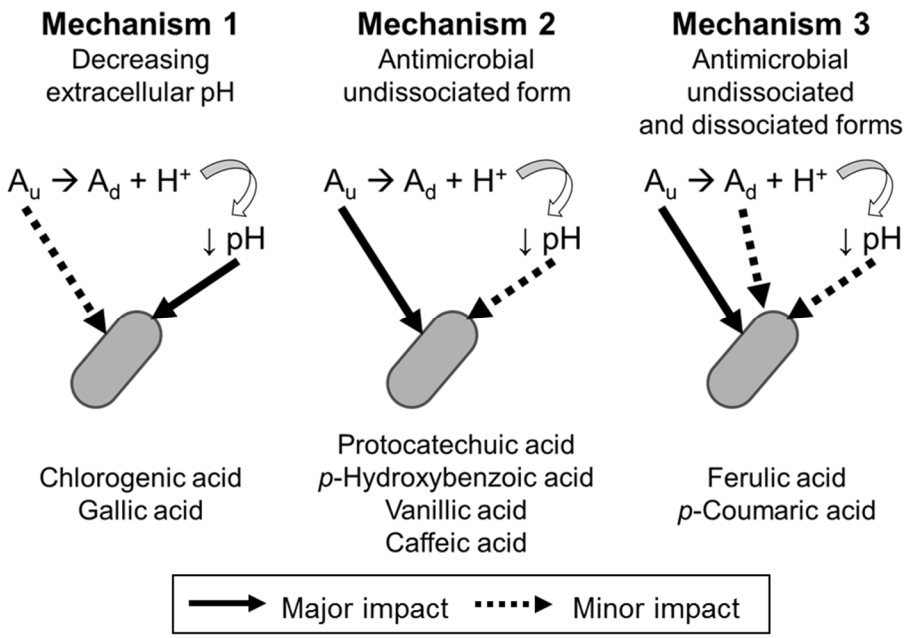


Figure II.8. *Schematic representation of phenolic acid classification into three categories depending on different antimicrobial factors involved in bacterial growth inhibition*

II.4. POINTS A RETENIR

- Les composés ont été classés en fonction de leurs activités antioxydante et antimicrobienne. Les composés présentant la meilleure activité antioxydante sont la quercétine, la (-)-épicatéchine, la rutine, la lutéoline, l'acide caféique et l'acide chlorogénique. Les composés présentant la meilleure activité antimicrobienne sont le carvacrol, le thymol et la naringénine. L'**eugénol** et l'**acide férulique** ont été sélectionnés pour la suite de l'étude pour trois raisons : *i)* ils présentent des potentiels antioxydant et antimicrobien intéressants, *ii)* leurs structures chimiques sont proches (groupement O-CH_3 en *ortho* de la fonction phénol), *iii)* ils se différencient par une fonction acide, qui est importante dans l'expression de l'activité antimicrobienne. L'**α-tocophérol** a également été retenu car il s'agit d'un antioxydant efficace et présent dans les huiles, mais son activité antimicrobienne n'a pas pu être évaluée au cours de cette étude en milieu modèle en raison de son insolubilité dans le milieu de culture.
- Les résultats obtenus confirment ceux de la littérature sur la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur activité antioxydante ainsi que sur leurs mécanismes d'action. Les structures ***ortho*-diphénoliques** et les structures favorisant la **délocalisation** des radicaux phénoxyles améliorent le comportement antioxydant des composés. Les antioxydants testés peuvent être regroupés selon l'allure de leur cinétique réactionnelle : **briseurs de chaîne**, **retardateurs** ou **combinaison** des deux.
- Des hypothèses sont proposées pour expliquer la relation mise en évidence entre la structure des composés et leur activité antimicrobienne ainsi que les mécanismes d'action mis en jeu, ce qui a été assez peu étudié dans la littérature. En particulier, une première approche montre que l'addition de **groupements hydroxyles** et une faible **hydrophobicité** semblent diminuer le pouvoir antimicrobien des composés testés.
- **Trois modèles**, développés pour mieux comprendre le mécanisme d'action des acides phénoliques, montrent que leur capacité à inhiber la croissance de *L. monocyogenes* s'explique par une conjonction de la diminution du **pH extracellulaire** et de l'action des **formes non-dissociées** et **dissociées** des acides. La plupart des acides phénoliques ont une activité antimicrobienne principalement dépendante de la concentration en forme non dissociée des acides. L'acide gallique et l'acide chlorogénique se distinguent, avec une activité antimicrobienne majoritairement due à la diminution du pH extracellulaire ; les acides *p*-coumarique et férulique montrent également une particularité avec une activité antimicrobienne significative de leurs formes dissociées.

- Des différences et similarités ont été établies entre les deux activités des composés phénoliques. En particulier, les relations entre la structure chimique des molécules et l'activité antioxydante ou antimicrobienne présentent des **oppositions**. Par ailleurs, les concentrations efficaces sont d'**ordres de grandeur** très différents pour les deux activités : µM pour l'activité antioxydante et mM pour l'activité antimicrobienne.

Chapitre III – Action antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques en émulsions riches en lipides insaturés

III.1. INTRODUCTION

Ce chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus dans des **systèmes complexes émulsionnés** sur les activités antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques choisis sur la base des études effectuées en milieu modèle dans la première partie de la thèse : l'acide férulique, l'eugénol et l'α-tocophérol. L'acide férulique et l'eugénol sont sélectionnés pour explorer les deux types d'activité car *i)* ils présentent des potentiels antioxydant et antimicrobien intéressants, *ii)* leurs structures chimiques sont proches (groupement O-CH_3 en *ortho* de la fonction phénol), *iii)* ils se différencient par une fonction acide, qui est importante dans l'expression de l'activité antimicrobienne. Trop hydrophobe pour être testé comme antimicrobien, l'α-tocophérol est cependant conservé comme antioxydant car il est naturellement présent dans la plupart des matières grasses alimentaires végétales et animales, et son utilisation est autorisée dans les aliments en tant qu'additif (règlement européen (CE) n°1333/2008).

La mise en place de ces études nécessite au préalable une **réflexion sur les paramètres de formulation à utiliser pour développer un système d'étude pertinent**. Celui-ci doit tout d'abord être réaliste par rapport aux milieux alimentaires, mais assez simplifié pour pouvoir interpréter les phénomènes observés. Ses paramètres de composition et de structure doivent pouvoir être connus et maîtrisés. Enfin, il doit permettre à la fois l'étude des activités antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques. Ainsi (***Figure III.0***) :

i) Toutes les émulsions sont formulées avec de l'**huile de poisson** (thon) riche en DHA. Le choix de cette huile vise à répondre aux recommandations nutritionnelles, et la teneur de 300 g d'huile par kg d'émulsion permet au système d'être représentatif de sauces salades commerciales.

ii) Deux émulsifiants sont utilisés : les **protéines de lactosérum** et le **Tween 80**. Le choix des protéines de lactosérum s'explique par leur utilisation courante dans les aliments. Leur mise en œuvre nous impose de travailler à pH neutre afin d'éviter leur précipitation partielle à pH acide (proche de leur pI) et donc l'agrégation des gouttelettes lipidiques conduisant à un système instable. Le Tween 80, polysorbate souvent utilisé en microbiologie et contenant un acide gras monoinsaturé (acide oléique), est choisi en complément afin de permettre l'étude de l'activité antimicrobienne de l'acide férulique à pH acide. Il a été

préféré au Tween 40, pourtant constitué d'un acide gras saturé (acide palmitique) qui n'interviendrait pas dans les réactions d'oxydation, car une étude préliminaire réalisée au laboratoire a montré son activité antimicrobienne vis-à-vis de *L. monocytogenes*. La concentration en protéines retenue est de 10 g/kg d'émulsion, ce qui permet de s'assurer, par le calcul, que l'ensemble de l'interface des gouttelettes lipidiques est couverte. Le diamètre moyen des gouttelettes est compris entre 1 et 2 µm (après optimisation de la durée de l'étape d'émulsification) et stable sur la durée de l'étude. La concentration en Tween 80 utilisée est de 5 g/kg d'émulsion (teneur maximale autorisée en alimentaire). Elle permet de couvrir la totalité de l'interface et d'obtenir également un diamètre moyen des gouttelettes lipidiques compris entre 1 et 2 µm.

iii) La composition de la **phase aqueuse** varie selon que l'on veuille suivre l'oxydation des lipides ou le développement microbien. Dans le cas de l'étude sur l'activité antioxydante, elle doit être la plus simple possible afin d'éviter toute réaction secondaire qui pourrait interférer avec la réactivité des composés phénoliques. Elle est constituée d'**eau** et de **sorbate de potassium** pour limiter le développement des moisissures. Les composés phénoliques sont introduits en concentrations équimolaires, correspondant à une teneur moyenne en tocophérols dans les huiles alimentaires (1000 mg/kg). Les études complémentaires visant à mieux comprendre l'influence de la viscosité du milieu sur l'oxydation des lipides sont menées sur des émulsions dont la phase aqueuse est épaissie par de la **gomme de guar** (3 et 6 g/kg de phase aqueuse), avec adaptation du protocole d'émulsification pour éviter une chute brutale de la viscosité lors de l'utilisation de la sonde à ultrasons (dépolymérisation probable de la gomme de guar). Dans le cas de l'étude sur l'activité antimicrobienne, les bactéries doivent pouvoir se développer dans la phase aqueuse. Ainsi, celle-ci est constituée d'un **milieu de culture** stérile (TSB) et les concentrations en composés phénoliques sont ajustées en fonction des efficacités de chaque composé. Les émulsions sont ensuite ensemencées avec un inoculum standardisé de manière à obtenir une concentration de 10^{-1} *L. monocytogenes*/mL de phase aqueuse avant incubation.

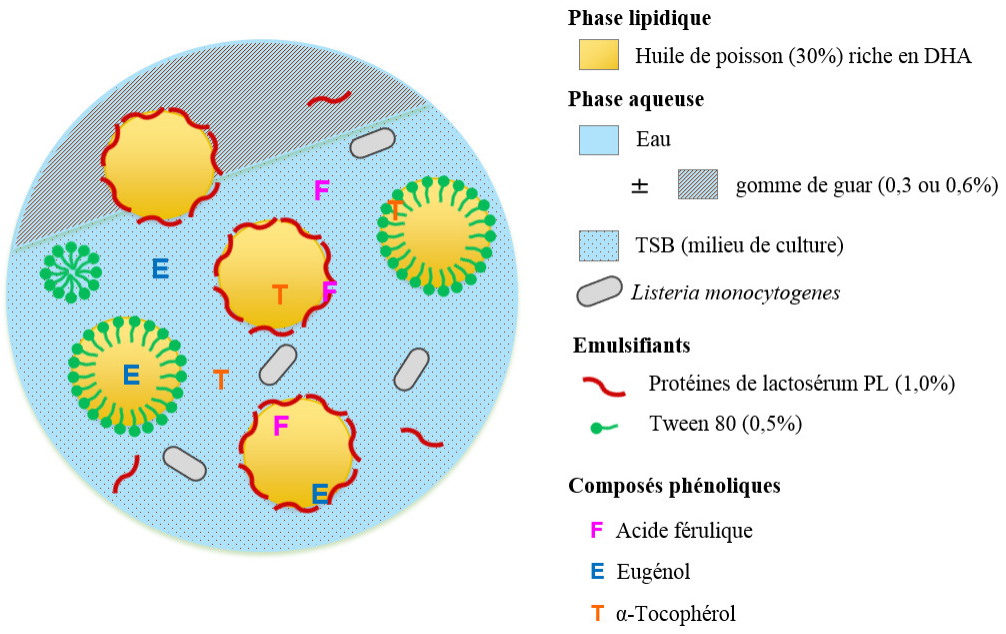


Figure III.0. *Représentation schématique des émulsions étudiées avec différents paramètres de formulation et de structure*

Les émulsions sont conservées à **25°C**, sous **agitation lente**, pendant un temps suffisamment long pour observer les phénomènes tout en conservant les paramètres de structure : de 4 à 16 jours pour le suivi de l'oxydation lipidique, de 1 à 3 jour(s) pour le suivi de la croissance bactérienne. La disponibilité en oxygène étant un paramètre important à maîtriser lorsque l'on étudie l'oxydation des lipides, l'émulsion est répartie après fabrication dans plusieurs petits flacons (36 mL) qui sont fermés hermétiquement, puis prélevés un par un pour chaque point du suivi cinétique. Pour l'étude de la croissance microbienne, chaque suivi cinétique est fait à partir d'un seul flacon de taille plus importante (150 mL) dans lequel des prélèvements réguliers sont effectués.

La première partie de ce chapitre fait l'objet de l'**article 3** intitulé **" Lipid oxidation in oil-in-water emulsions rich in omega-3: effect of aqueous phase viscosity, emulsifiers, and antioxidants "** (III.2). Cette étude a deux objectifs principaux : déterminer l'influence de la viscosité de la phase aqueuse sur l'oxydation des lipides en émulsion et caractériser l'activité antioxydante de trois composés phénoliques introduits seuls (acide férulique, eugénol, α-tocophérol) ou en mélange (eugénol + α-tocophérol) vis-à-vis de l'oxydation des lipides dans des émulsions formulées avec deux types d'émulsifiants. L'oxydation des lipides est suivie par plusieurs marqueurs réactionnels : l'oxygène (pression partielle en oxygène dans l'espace de

tête et dans la masse), les acides gras (concentrations mesurées après extraction de la phase lipidique des émulsions), les hydroperoxydes - marqueurs primaires de l'oxydation - et les aldéhydes - marqueurs secondaires - (concentrations mesurées dans l'huile extraite). Les composés phénoliques (eugénol et α-tocophérol) sont également suivis au cours des cinétiques réactionnelles (concentrations mesurées dans l'huile extraite) et quelques produits d'oxydation de l'α-tocophérol sont analysés par une méthode UHPLC-PDA-MS développée dans le cadre de la thèse. Les émulsions formulées sont enfin caractérisées par des méthodes physico-chimiques : distribution du diamètre des gouttelettes (granulométrie) et viscosité.

La deuxième étude de ce chapitre fait l'objet de l'**article 4** intitulé **" Ferulic acid and eugenol have different abilities to maintain their inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in emulsified systems "** (III.3). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'acide férulique et de l'eugénol, d'abord en présence d'émulsifiants, puis dans les systèmes complexes émulsionnés. Les suivis de croissance ont été réalisés par dénombrements avec dilutions sériales et dépôts de microspots sur milieu gélosé solide. L'ensemencement initial des systèmes a été optimisé afin que la phase de croissance exponentielle ait lieu pendant la journée.

III.2. ARTICLE 3 – "LIPID OXIDATION IN OIL-IN-WATER EMULSIONS RICH IN OMEGA-3: EFFECT OF AQUEOUS PHASE VISCOSITY, EMULSIFIERS, AND ANTIOXIDANTS"

Publication acceptée dans ***European Journal of Lipid Science and Technology***
en mars 2019

Aurélia Pernin, Véronique Bosc, Paola Soto, Even Le Roux, and Marie-Noëlle Maillard*

Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France.
*Corresponding author: marie-noelle.maillard@agroparistech.fr

III.2.1. Abstract and keywords

Phenolic compounds offer a solution to limit oxidation and bacterial growth in food products. Our study aimed to better understand the impact of compositional and structural parameters of o/w emulsions on oxidative stability in several realistic models, composed of fish oil, an aqueous phase supplemented or not with guar gum, and whey proteins or Tween 80 as emulsifiers. Some systems included phenolic antioxidants, alone or in mixture (α-tocopherol, eugenol, ferulic acid). The presence of guar gum slightly delayed oxidation by limiting oxygen transfer from the headspace to the emulsion and within the different compartments of the emulsion. Moreover, oxidation was lower in emulsions formulated with whey proteins, due to their potent interference with oxidation reactions. Ferulic acid showed no antioxidant activity. Eugenol and α-tocopherol were efficient in emulsions formulated with whey proteins due to their localization in the reactional system and therefore their proximity to oxidation sites.

Practical applications: These results can find practical applications in protecting essential omega-3 fatty acids with natural phenolic antioxidants in food emulsions. They would also contribute to limit the use of additives in food by promoting synergistic actions of phenolic compounds with complementary antioxidant mechanisms. At least, they could offer a sustainable valorization of by-products from agro-industry by producing ingredients rich in phenolic compounds, not only having antioxidant properties but also antibacterial effects.

Keywords: fish oil, omega-3 fatty acids, phenolic compound, eugenol, ferulic acid, α-tocopherol, guar gum, whey protein, Tween 80

III.2.2. Introduction

Over the last decade, nutritional recommendations have led to a decrease in the proportion of saturated fatty acids (SFA) in favor of monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA, in particular, those of the omega-3 family) ones in food products (FAO 2010; INRA & ANSES 2013). Thus long-chain PUFA, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), have gained interest due to their positive health effects, especially their beneficial role in fetal development, neurodevelopment, and in limiting neurodegenerative and cardiovascular disorders (Duttaroy 2016). They are only found in fatty fishes, such as salmon, tuna, mackerel, herring and sardines (Anses 2017), but can be incorporated into processed food products as ingredients. However, such incorporation has negative consequences and can limit food quality and safety. Effectively, these long chain omega-3 PUFA are more sensitive to oxidation that can produce off-flavors, decrease nutritional quality, and potentially increase the chemical risk (Jacobsen *et al.* 2008; Cuvelier & Maillard 2012). In addition, recent studies have shown that the growth of some pathogenic Gram-positive microorganisms in food may be favored at low temperature in the presence of exogenous unsaturated fatty acids, increasing potential food safety issues (de Sarrau *et al.* 2013). These phenomena can be limited using molecules with antioxidant and antimicrobial activities. However, the synthetic nature of many food-grade antioxidants (BHA, BHT, TBHQ) and antimicrobials (nitrates, benzoates, sulfites, sorbates) has led to consumer concerns (Carocho & Ferreira 2013).

In this context, finding natural molecules with both antioxidant and antimicrobial activity in food systems appears to be a necessity. Phenolic compounds, widely found in plants and byproducts from agro-industry, appear to be good candidates, as they are well known for their antioxidant and/or antimicrobial activities (Brewer 2011; Gyawali & Ibrahim 2014). We recently studied the antioxidant and antimicrobial efficiencies of a series of phenolic compounds in simple model media and showed that most present opposite behavior in terms of the two activities (Pernin *et al.* 2018); only a few showed both antioxidant and antimicrobial activities, *i.e.* ferulic acid and eugenol. However, studies need to be performed to test their activity in realistically complex food systems (*i.e.* oil-in-water (o/w) emulsions that mimic, for example, food sauces) in the presence of an endogenous molecule, regularly found in edible oils, that has antioxidant properties, *i.e.* α-tocopherol. From a commercial point of view, it is important to study lipid oxidation in dispersed food systems, as most oils are not consumed in their bulk form but are dispersed throughout food products as droplet particles, for example, in

dairy products, processed meats, dressings, dips, beverages, desserts, yogurts, and sauces (Decker *et al.* 2017).

Many studies have assessed oxidation of such systems and their protection by antioxidants (Medina *et al.* 2012; Jacobsen 2015; Ghorbani Gorji *et al.* 2016; Qiu *et al.* 2017). Nevertheless, to control these phenomena and offer safe and healthy products, studies should not only focus on the efficiency of the antioxidants but also a thorough understanding of the associated chemical mechanisms that occur when many compounds interact in food systems (Decker *et al.* 2017). In particular, there is an important need to better understand the impact of compositional and structural parameters of o/w emulsions rich in essential long-chain PUFA of the omega-3 family, not only in the oil phase, but also in the aqueous phase and the interface, which can influence lipid oxidation (Berton-Carabin *et al.* 2014). Industrial food products, such as sauces, are also regularly supplemented with thickening agents, such as polysaccharides, which are incorporated into the aqueous phase. Although several studies are available on the effect of polysaccharides, such as xanthan, pectin, carrageenan, and sodium alginate, on lipid oxidation in emulsions (Shimada *et al.* 1996; Kishk & Al-Sayed 2007; Chen *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2016), the underlying mechanisms are not fully understood. For example, the specific impact of guar gum, a common food polysaccharide corresponding to the ground endosperm of seeds of natural strains of the guar plant, *Cyamopsis tetragonoloba* (family: Leguminosae) (EFSA ANS Panel *et al.* 2017), has not been deeply studied. The interest of guar gum lies in its neutral charge, which can limit chemical interactions with other compounds, allowing the study of the specific impact of viscosity on lipid oxidation. In addition the oil/water interface has been described for decades as the critical area where the oxidation of lipids occurs (Labuza & Dugan Jr 1971). More recently, the role of emulsifiers has been emphasized, not only on lipid oxidation but also on the partitioning and activity of antioxidants (Decker *et al.* 2017). The lack of understanding in this field, such as the impact of emulsifiers on the physicochemical properties of lipid droplets or the location and reactivity of pro- and antioxidants, has been raised by Decker *et al.* (2017) as one of the main hurdles in predicting antioxidant efficiency in o/w emulsions.

Here, we studied systems composed of a fish oil phase (30% w/w), containing 250 g/kg of DHA, an aqueous phase supplemented with guar gum (0 to 0.6% w/w to reach a range of viscosities similar to that of food products), and whey proteins as emulsifying molecules widely used in the food industry or Tween 80 as a reference emulsifier, reported in many published studies. A part also contained phenolic antioxidants, added alone or as a mixture (eugenol, ferulic acid, α-tocopherol). The behavior of these complex systems during storage at 25°C was

analyzed using several physico-chemical markers (oxygen partial pressure, hydroperoxides, aldehydes, antioxidants) and the parameters that influence lipid oxidation (viscosity of the aqueous phase, nature of the emulsifier used, phenolic compounds added alone or as a mixture) are discussed.

III.2.3. Materials and methods

III.2.3.1. Materials

Eugenol, α-tocopherol, ferulic acid, α-tocopherol quinone, potato starch, *p*-anisidine, 2,4-decadienal, methyl heptadecanoate, a mixture of fatty acid methyl esters (Supelco FAME 37), alumina, and petroleum ether 35-60°C (analytical grade) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Hydrochloric acid (analytical grade), sodium hydroxide (analytical grade), tetrahydrofuran (THF; HPLC grade), heptane (HPLC grade), isopropanol (HPLC grade), isooctane (optical spectroscopy grade), glacial acetic acid (analysis grade), sodium thiosulfate, potassium iodide, methanol (HPLC and LC/MS grade), acetonitrile (LC/MS grade), and water (LC/MS grade) were purchased from Carlo Erba (Fontenay-aux-Roses, France). Potassium sorbate and lichropur ammonia solution (25% in water, LC/MS grade) were purchased from Merck (Fontenay-sous-Bois, France), and leucine encephalin (LC/MS grade) from Waters (Guyancourt, France). Ultrapure Water was purified using the Millipore Simplicity System (France). Whey proteins (ProLacta 95) were purchased from Lactalis (Laval, France), Tween 80 from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), guar gum from Cargill (Redon, France) and fish oil (tuna, Omegavie® 5/25 TG flavorless Qualitysilver®) from Polaris (Quimper, France). Prior to use, tuna oil was purified of polar compounds by filtrating 400 g oil through 200 g activated alumina (activation for 4 h at 200°C and cooling in a desiccator filled with dried silica) two times in a Büchner funnel coupled with a vacuum pump at 970 mbar. The stripped oils were verified to be free of tocopherols (III.2.3.2.2.6) and stored under nitrogen at -20°C for a maximum of one week before use.

Table III.1. *Overview of the various systems studied*

	Ingredient Concentration	**Stripped fish oil** 300 g/kg of emulsion	**Whey proteins** 10 g/kg of emulsion	**Tween 80** 5 g/kg of emulsion	**Potassium Sorbate** 5 g/kg of emulsion	**Guar gum** 3 g/kg of aqueous phase	**Guar gum** 6 g/kg of aqueous phase	**Ferulic acid** 0.7 mmol/kg of emulsion	**α-Tocopherol** 0.7 mmol/kg of emulsion	**Eugenol** 0.7 mmol/kg of emulsion	Kinetic duration (days)
Oil-in-water emulsions (O/W)	O/W_WP-C	✓	✓		✓						7
	O/W_WP-g3	✓	✓		✓	✓					
	O/W_WP-g6	✓	✓		✓		✓				
	O/W_T80-C	✓		✓	✓						
	O/W_WP-F	✓	✓		✓			✓			
	O/W_WP-T	✓	✓		✓				✓		12
	O/W_T80-T	✓		✓	✓				✓		
	O/W_WP-E	✓	✓		✓					✓	16
	O/W_T80-E	✓		✓	✓					✓	
	O/W_WP-T+E	✓	✓		✓				✓	✓	
Biphasic systems (O+W)	O+W_WP-C	✓	✓		✓						7
	O+W_WP-g6	✓	✓		✓		✓				
	O+W_T80-C	✓		✓	✓						
Aqueous solutions (W)	W_WP		✓		✓						25
	W_T80			✓							
	W_g3				✓	✓					7
	W_g6				✓		✓				
Oil (O)	O_C	✓									7
	O_T80	✓		✓							

III.2.3.2. Methods

III.2.3.2.1. Preparation of the emulsions and storage conditions

Ten different emulsified systems (O/W) were prepared to study the mechanisms of lipid oxidation and protection by antioxidants (***Table III.1***). In addition, nine other systems (three biphasic systems (O+W), four aqueous solutions (W), and two oils (O)) were prepared to complete our studies of the phenomenon (***Table III.1***).

III.2.3.2.1.1. Preparation of the aqueous phases of the emulsions

The aqueous phases for emulsions, with whey proteins as emulsifier (O/W_WP-X, with X=C for the control emulsion, F for the emulsion with ferulic acid, T with tocopherol, E with eugenol, and T+E with tocopherol and eugenol), were prepared by dispersing whey proteins in ultrapure water with moderate magnetic stirring for 4 h at room temperature, filtering this solution through a 0.22-µm filter (Stericup® and Steritop®, Merck Millipore, Massachusetts), and adding potassium sorbate (final concentrations: 10 g whey proteins and 5 g potassium sorbate/kg of emulsion).

The aqueous phases for emulsions, with Tween 80 as emulsifier (O/W_T80-X), were prepared by dispersing Tween 80 in ultrapure water and adding potassium sorbate (final concentrations: 5 g Tween 80 and 5 g potassium sorbate/kg of emulsion).

Two separate aqueous phases were prepared and then mixed during the emulsification procedure (see III.2.3.2.1.3) for emulsions with whey proteins as emulsifier and supplemented with guar gum (O/W_WP-g3, O/W_WP-g6). The first aqueous phase was prepared as previously described. For the second aqueous phase, guar gum was progressively added to ultrapure water and subjected to fast magnetic stirring for 2 h at room temperature (final concentrations: 3 or 6 g guar gum/kg of aqueous phase).

For emulsions with whey proteins as emulsifier and supplemented with ferulic acid, ferulic acid was dispersed in the aqueous phase using slow magnetic stirring for 15 min to obtain a concentration of 0.7 mmol ferulic acid/kg of emulsion.

The concentrations of emulsifiers were chosen to obtain emulsions with droplets that were sufficiently small to avoid physical destabilization by creaming. The fraction of emulsifiers that were not adsorbed at the interface and remained in the aqueous phase was estimated based on the particle-size distribution and load concentration reported in the literature at equilibrium (Berton *et al.* 2011a): 70% for whey proteins (7 g/kg of emulsion) and 48% for Tween 80 (2.4 g/kg of emulsion). The unabsorbed Tween 80 fraction was approximately 250 times higher than

the critical micellar concentration (CMC) of Tween 80 (19 mg/mL) (Mahmood & Al-koofee 2013), and thus formed micelles.

The final pH of all aqueous phases was verified with a pH-meter (sensION+ PH3, Hach, Spain) and was 6.8.

III.2.3.2.1.2. Preparation of the lipid phases of the emulsions

For emulsions containing α-tocopherol and/or eugenol, the antioxidants were dispersed in stripped fish oil by slow magnetic stirring for 15 min at room temperature to obtain a concentration of 0.7 mmol α-tocopherol and/or eugenol/kg of emulsion.

III.2.3.2.1.3. Emulsification procedure

For emulsions without guar gum, 36 g lipid phase and 84 g aqueous phase containing whey proteins were weighed in a 250-mL beaker and placed in a crystallizer filled with ice and water. The mixture was emulsified using a rotor stator homogenizer (Ultra-Turrax T 25, IKA Labortechnik, Germany) at 10,000 rpm for 5 min followed by 20 min of ultrasound treatment with a sonicating probe (model n°75186, Bioblock, France) at maximal magnitude (130 W, 20 kHz) with alternating sonication/rest cycles (10 s sonication/10 s rest).

For emulsions with guar gum, a similar protocol was followed with 36 g lipid phase and 56 g aqueous phase containing whey proteins. Once the emulsification procedure was finished, the obtained oil/water emulsion was mixed with 28 g guar gum solution using slow magnetic stirring for 10 min, followed by Ultra-Turrax treatment for 15 s at 12,000 rpm. The use of ultrasound on guar gum solutions caused a sudden decrease in viscosity, probably due to the sensitivity of guar gum towards ultrasound.

The concentrations of emulsifiers and parameters of the emulsification procedure were chosen and optimized to obtain emulsions with similar and stable droplet size distributions (see II.2.3.2.2.8 and ***Table III.2***), such that differences in emulsion oxidation were due to differences in formulation parameters and not differences in droplet size distribution.

Table III.2. *Droplet-size distribution of all emulsified systems after various storage times expressed as the volume median diameter d(v,0.5)*

Time (days)/ Emulsified systems	0	4	7	12	16
O/W_WP-C	1.26 ± 0.04 Aab	1.29 ± 0.05 Aa	1.34 ± 0.08 Aa		
O/W_WP-g3	1.43 ± 0.04 Abc	*nd*	1.52 ± 0.02 Aa		
O/W_WP-g6	1.56 ± 0.01 Ac	*nd*	1.56 ± 0.06 Aa		
O/W_T80-C	1.50 ± 0.06 Ac	1.53 ± 0.03 Ab	1.53 ± 0.02 Aa		
O/W_WP-F	1.29 ± 0.03 Aab	1.36 ± 0.05 Aa	1.40 ± 0.08 Aa		
O/W_WP-T	1.22 ± 0.09 Aa	*nd*	1.39 ± 0.19 ABa	1.61 ± 0.08 Ba	
O/W_T80-T	1.43 ± 0.10 Abc	*nd*	1.54 ± 0.06 Aa	1.57 ± 0.06 Aa	
O/W_WP-E	1.27 ± 0.09 Aab	*nd*	1.53 ± 0.14 Ba	1.66 ± 0.04 Ba	1.73 ± 0.06 Ba
O/W_T80-E	1.52 ± 0.09 Ac	*nd*	1.56 ± 0.07 Aa	1.54 ± 0.16 Aa	1.64 ± 0.04 Aa
O/W_WP-T+E	1.22 ± 0.07 Aa	*nd*	1.37 ± 0.15 Aa	1.46 ± 0.12 Aa	1.68 ± 0.12 Ba

Values are expressed in µm (mean ± standard deviation (n = 3)).
For a given emulsion, different capital letters correspond to significantly different values at different times of storage according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%). For a given storage time, different non-capital letters correspond to significantly different values for different emulsions according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%).
nd = not determined

III.2.3.2.1.4. Storage and ageing conditions

For each time course, 12 g emulsion were poured into five closed 36-mL airtight flasks, one equipped with two oxygen chips: one in the headspace (HS) and one in the bulk emulsion (B). The emulsions were stirred at 150 rpm on multi-spot magnetic plates (MIXdrive 6HT, 2mag, Germany) and stored at a controlled temperature of 25°C for 1, 2, 4, 7, 9, 12, or 16 days, depending on the kinetics (***Table III.1***).

III.2.3.2.2. Determination of the physico-chemical and oxidation markers in emulsions during storage

III.2.3.2.2.1. Measurement of the oxygen partial pressure in the headspace and bulk emulsion

The oxygen partial pressure (pO_2) was determined in the HS and B of the samples using a Presens® (Regensbourg, Germany) detector, which measures the quenching of luminescence caused by collisions between molecular oxygen and luminescent dye molecules (Ruthenium) in an excited state present on chips (Cuvelier *et al.* 2017).

III.2.3.2.2.2. Extraction of the lipid phase from the emulsions

Emulsion samples contained in each flask (12 g) were transferred into 50-mL centrifuge tubes (VWR, France) and 10 mL each of heptane and isopropanol was added. The mixture was gently swirled by hand for 1 min and then centrifuged at 15,000 x g for 15 min at 30°C using a Heraeus Multifuge X3R centrifuge (Thermo Scientific, Germany). The supernatant, containing oil solubilized in heptane, was removed. The extraction procedure was repeated a second time. After pooling the two supernatants, the heptane was evaporated at 120 mbar for 10 min at 40°C using a rotary evaporator (RE120, Büchi, Switzerland) coupled to a vacuum pump. Heptane residues were finally evaporated using nitrogen flow. Oil recovery yields were 95.1 ± 2.6%. Oil samples were then stored under nitrogen at -20°C until analysis. For emulsions containing eugenol, the extraction procedure led to the migration of approximately 50% of the eugenol from the lipid to the aqueous phase; this was taken into account in the quantification of eugenol in the lipid phase. For emulsions containing α-tocopherol, the effect of the extraction was negligible.

For UHPLC-PDA-MS analysis of α-tocopherol and its oxidation products, an additional purification step was performed. Approximately 1 g previously extracted oil was accurately weighed in a 10-mL volumetric flask and the flask filled with heptane. The solution was vortexed at maximal speed for 1 min, sonicated for 30 s, and mixed manually. α-Tocopherol and its oxidation products were extracted from the heptane solution in a decantation funnel with 20 mL methanol. The extraction was repeated two times. The methanol was evaporated under reduced pressure and the residue solubilized in 5 mL methanol. The methanolic solution was filtered on a 0.22-µm filter and stored until analysis. The recovery rate of α-tocopherol from oil, measured by HPLC-DAD-Fluorimetry (see II.2.3.2.2.6), was 53.5 ± 2.2%.

III.2.3.2.2.3. Determination of hydroperoxides concentration

The concentration of hydroperoxides was determined using an adaptation of the official method (ISO method 3960 2017). First, 0.1 g oil was accurately weighed in a stoppered Erlenmeyer flask and 25 mL of a mixture of glacial acetic acid/isooctane (3/2, v/v) and 1 mL freshly-prepared saturated potassium iodide aqueous solution (1.7 g/mL ultrapure water) were added. The mixture was gently swirled by hand for 1 min and stored for 5 min in the dark. Then, 75 mL ultrapure water and 1 mL potato starch solution (prepared by dispersing 1 g in 100 mL boiled water) were added to obtain a dark blue color. Sodium thiosulfate (0.001 or 0.01 mol/L, depending on the oxidation level of the sample) was added until the color of the solution

changed from dark blue to white: this determines the equivalent volume. In parallel, the same procedure was applied to a blank sample without oil. The concentration of hydroperoxides was calculated using the equation 15:

$$C_{hydroperoxides} = \frac{1}{2} \times \frac{(V_{eq} - V_b) \times C_{S_2O_3^{2-}}}{m_{oil}} \times 10^6 \qquad \text{(equation 15)}$$

with $C_{hydroperoxides}$ as the concentration of hydroperoxides in oil (mmol/kg of oil), V_{eq} the equivalent volume of thiosulfate in the sample (L), V_b the equivalent volume of thiosulfate in the blank (L), $C_{S_2O_3^{2-}}$ the concentration of sodium thiosulfate used (mol/L), and m_{oil} the weight of the oil (g).

III.2.3.2.2.4. Determination of aldehydes concentration

The concentration of aldehydes was analyzed using the protocol of Roman *et al.* (2013), with minor modifications. It is based on the spectrophotometric determination of products formed by the reaction between aldehyde oxidation compounds from oil and *p*-anisidine. The oil (0.1 g) was accurately weighed, 5 mL of isooctane added, and the solution vortexed for 30 s at maximum speed. In parallel, 0.25 g *p*-anisidine was weighed in 100 mL glacial acetic acid, the solution vortexed for 10 s at maximum speed, and then sonicated for 30 s in a sonication bath. This *p*-anisidine-containing reagent (1 mL) was added to 5 mL of the oil isooctanic solution and the tube vortexed for 10 s. After allowing the mixture to react for 10 min in the dark, the absorbance was measured at 350 nm with a reference solution consisting of a mixture of isooctane (5 mL) and *p*-anisidine reagent (1 mL). The concentration of aldehydes is expressed as the equivalent concentration of *trans,trans*-2,4-decadienal (mmol/kg of oil) using a calibration curve established in fresh stripped oil.

III.2.3.2.2.5. Determination of the fatty acid profile by GC-MS

The fatty acid composition of the oil samples was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry detection (GC-MS). Approximately 30 mg oil were accurately weighed and dissolved in 1 mL petroleum ether containing methyl heptadecanoate (3 mg/mL) as internal standard. Then, 0.2 mL NaOH in methanol (2 mol/L) was added and the tube shaken vigorously for 10 s. The samples were then incubated at 50°C for 30 s and 0.4 mL HCl in methanol (1 mol/L) added and the tube shaken. After decantation, 0.5 µL of the upper phase was injected into the GC-MS system for analysis. A Trace GC Ultra 2.0 gas chromatograph (Thermo

Scientific, Italy) with a Zebron ZB-WAX capillary column (60 m x 0.25 mm i.d. and 0.50 µm film thickness) was used with the following parameters: injection temperature of 250°C; column temperature gradient from 180 to 230°C at 4°C/min, 230°C for 35 min, 230 to 250°C temperature gradient at 4°C/min, and 250°C for 10 min; helium as the carrier gas with a flow rate of 1.2 mL/min and a split ratio of 1:10. Mass spectrometry detection was performed using an ion trap Polaris Q 2.0.1 (Thermo Scientific, US) with the following parameters: source temperature of 200°C and full scan mode with the mass range from 33 to 400 in 0.44 s. The results were analyzed using Xcalibur 2.0.7 software and the fatty-acid methyl esters identified by comparison with commercial standards of fatty-acid methyl esters and mass spectrometry libraries (polarisQ, WileyRegistry8e, nist).

III.2.3.2.2.6. Determination of antioxidants concentration in the lipid phase by HPLC-DAD-Fluorimetry

Concentrations of α-tocopherol and eugenol were determined using a method adapted from ISO method 9936 (ISO method 9936 2006) established for the analysis of tocopherols. Approximately 0.3 g oil was accurately weighed into 5 mL heptane. The solution was vortexed at maximal speed for 30 s, sonicated for 1 min in a Branson 2510 sonication bath, the solution filtered over a 0.22-µm filter, and 20 µL injected into a high-performance liquid chromatography system coupled to a photodiode array detection and a fluorimetry detection (HPLC-DAD-Fluorimetry). Analyses were performed using a Waters Alliance HPLC system, consisting of a 2695 pump with a solvent delivery degasser, a thermostat-controlled column compartment, a thermostat-controlled autosampler, a 2996 UV-vis photodiode array detector and a 2475 fluorimeter. The liquid chromatography system was controlled and the data collected and processed using Empower software purchased from Waters. The separation of α-tocopherol and eugenol was performed using a Lichrospher 100 Diol column (250 x 4 mm i.d., 5 µm particle size) Uptisphere® from Interchim (Montluçon, France), thermostat-controlled at 25°C. Detection was performed with a diode array detector (maximal absorbances at 280 nm for eugenol and 298 nm for α-tocopherol) and a fluorimeter (excitation/emission wavelengths of 290 nm/324 nm). The HPLC mobile phase consisted of n-heptane/THF (96.15/3.85, v/v), eluted at a flow rate of 1 mL/min. Identification of the compounds was achieved by comparing their retention times and spectra with those of standards and quantification was performed from linear calibration curves (from 10 to 140 mg/L). Results are expressed in mmol/kg of oil.

III.2.3.2.2.7. Identification of some oxidation products of α-tocopherol by UHPLC-PDA-MS

UHPLC-DAD-MS analyses were performed on a Waters Acquity H-Class apparatus composed of a quaternary solvent manager pump (QSM), a refrigerated sample manager Flow Trough Needle (SM-FTN), and a column oven, coupled to a photodiode array detector (PDA) and a high-resolution mass spectrometer with a time-of-flight analyzer, Xevo G2-S ToF, equipped with an electrospray ionization source (ESI). All MS analyses were performed in negative polarity using the resolution mode for a scan time of 0.5 s, with a mass range between 50 and 900 m/z acquired in centroid. Internal calibration of the ToF analyzer was performed with a continuous flow of 5 µL/min of leucine enkephalin at 1 mg/L for three scans every 20 s for 0.5 s. The ESI- parameters used for the analyses were: capillary voltage of 0.5 kV, sampling cone of 40 V, source offset of 80 V, cone gas flow of 50 L/h, and desolvation gas flow of 1000 L/h. The source and desolvation gas were heated to 120°C and 500°C, respectively.

Simultaneous acquisition was performed with the PDA from 220 nm to 500 nm. The UV and mass spectra were treated by MassLynx Software.

The methanolic solution prepared from the oil (1.0 µL) (see II.2.3.2.2.2) was injected onto an Acquity BEH C18 column (100 x 2.1 mm, 1.7-µm particle diameter, 130 Å) thermostatically maintained at 30°C. An isocratic elution was performed at 0.25 mL/min for 20 min, with a water/methanol mixture (5/95, v/v) containing 10 mmol/L ammonia.

III.2.3.2.2.8. Particle size measurement

Particle-size distributions of the emulsions were measured by laser-light scattering (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Malvern, England). A refractive index ratio of 1.47 for the oil phase and 1.33 for the dispersant (water) was used to calculate the particle-size distributions. The volume median diameter d(v,0.5) was collected. All the systems displayed a mono-modal distribution.

III.2.3.2.2.9. Evaluation of viscosity

Viscosities of the emulsions were measured using a rheometer (Physica MCR 301, Anton Paar GmbH, Germany) equipped with a cone/plate geometry (4° cone angle, 50 mm diameter) and a Peltier plan PTD 200. A continuous shear rate ranging from 0.01 to 200 s^{-1}, and the inverse, was applied at 25°C for emulsions containing guar gum and from 10 to 200 s^{-1}, and the inverse, for emulsions without guar gum. Parameters of the Power law model were calculated from

logarithm transformation and linear regression of the data obtained in the range of shear rates in which shear-thinning behavior was observed (equations 16 and 17):

$$\sigma = K \times \dot{\gamma}^{n} \qquad \text{(equation 16)}$$

$$\eta = K \times \dot{\gamma}^{n-1} \qquad \text{(equation 17)}$$

With σ the stress (Pa), η the apparent viscosity (Pa.s) at a given shear rate, $\dot{\gamma}$ the given shear rate (s^{-1}), K the consistency index, and n an indicator of the flow behavior of the emulsion.

III.2.3.2.2.10. Measurement of surface tension

Surface tension (σ, mN/m) was measured in the static mode using a Tracker tensiometer (Teclis, Tassin, France). Measurements were performed in a rising mode with a 45-µL stripped fish oil droplet containing 57 mmol/kg hydroperoxide and the antioxidant (eugenol or α-tocopherol). The oil droplet was blown from a Teflon syringe into aqueous solution samples poured in a glass cuvette. The Bond number was verified to ensure that it was always higher than 0.10, meaning the droplets displayed the required Laplacian profile.

III.2.3.3. Statistical analysis

All experiments and analyses were performed at least in triplicate, with the exception of viscosity measurements for emulsions with guar gum, which were performed in duplicate. All results are expressed as the mean and standard deviation using Microsoft Excel® (2013).

A one-way analysis of variance (ANOVA) with emulsion or storage time effects was applied using XLStat 18.06 (Addinsoft, Paris, France). If significant effects were revealed ($p < 0.05$), an estimated mean for the given oxidation marker was calculated and compared using the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%) to determine significant differences between emulsions or storage times.

Table III.3. *Evaluation of the viscosity of emulsions formulated with whey proteins and various levels of guar gum at shear stress 12 s^{-1} and evaluation of the parameters of the Power law model*

Emulsified system		Parameters of Power law model				Apparent viscosity η (mPa.s) at shear rate 12 s^{-1}	
		Consistency Index K		Indicator of flow behavior n			
O/W_WP-C	mean ± standard deviation (n = 3)	5.5 ± 0.8	a	0.94 ± 0.03	a	4.6 ± 0.4	a
O/W_WP-g3	Assay n°1	274.5	b	0.55	b	79.8	b
	Assay n°2	239.1		0.57		72.3	
O/W_WP-g6	Assay n°1	1,665.8	c	0.56	b	543.0	c
	Assay n°2	1,617.8		0.56		545.0	

For a viscosity at shear rate 12 s^{-1} or a given parameter of the Power law model, different letters correspond to significantly different values between emulsions according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%).

III.2.4. Results and discussion

III.2.4.1. Impact of the viscosity of the aqueous continuous phase on lipid oxidation

The addition of guar gum to the aqueous phase of o/w emulsions composed of 30% (w/w) fish oil slowed the oxidation of lipids ***(Figure III.1)***. Indeed, the concentrations of hydroperoxides ***(Figure III.1a)*** and aldehydes ***(Figure III.1b)***, as well as oxygen consumption in the headspace (HS) of the flask containing the emulsion ***(Figure III.1c)***, were significantly lower in the emulsions containing 0.3 or 0.6% (w/w) guar gum than in the control emulsion without guar gum. No major effect of guar gum concentration was observed.

The mobility of oxygen in the bulk (B) and, in particular, its transfer from the aqueous phase to the lipid droplets may be slowed in the presence of guar gum, which would limit oxidation. A complementary experiment, carried out on non-emulsified biphasic systems (composed of fish oil and the aqueous phase, with or without guar gum; ***Table III.1***) contained in closed flasks without a HS, showed the pO_2 in the oil to remain at 0% throughout storage, whereas it decreased gradually from 21 to 0% in the aqueous phase, with a slower decrease in the presence of guar gum ***(Figure III.1e)***. This reflects both *i)* limited transfer of oxygen from the aqueous to lipid phase in the presence of guar gum, explained by the higher apparent viscosity of the aqueous phase containing guar gum (viscosity multiplied by 118 in the presence of 0.6% guar gum over that of the control, at a shear rate of 12 s^{-1}; ***Table III.3***) and *ii)* the immediate consumption of oxygen by the unsaturated fatty acids present in the lipid phase, corroborated by the production of lipid hydroperoxides (30.9 ± 3.5 mmol/kg of oil contained in the emulsion with 0.6% guar gum after seven days of storage, *vs* 12.5 ± 1.8 mmol/kg initially). The presence of guar gum may also limit lipid oxidation by slowing the transfer of oxygen from the HS to the emulsion (Penicaud *et al.* 2011), confirmed by the kinetics of the pO_2 in the HS in the presence or absence of guar gum ***(Figure III.1c)***, whereas the oxygen of the B was rapidly consumed, as the pO_2 reached 0% after two days, regardless of the emulsion ***(Figure III.1d)***. The small difference in the effect between the systems containing the two levels of guar gum reflects the attainment of the viscosity threshold. Indeed, at 12 s^{-1}, the viscosity was 17 times higher in the presence of 0.3% guar gum than in the control, and only 7 times when passing from 0.3 to 0.6% guar gum.

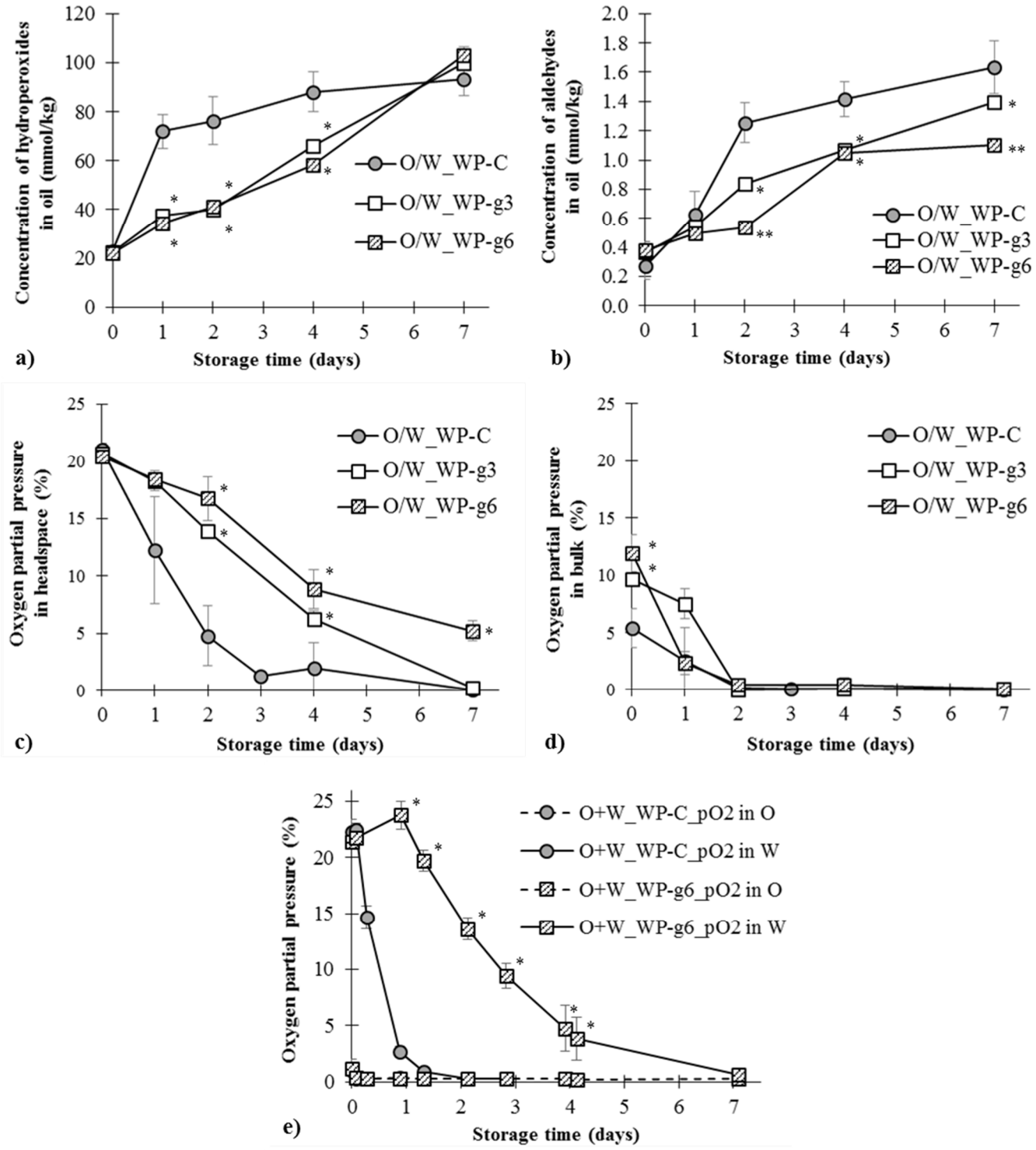


Figure III.1. *Effect of the viscosity of the aqueous phase by the addition of guar gum at 0, 0.3, or 0.6% (w/w) on lipid oxidation of o/w emulsions and biphasic systems during storage at 25°C: evolution of lipidic hydroperoxides (a), aldehydes (b), oxygen partial pressure in the HS (c), oxygen partial pressure in the B (d) in O/W_WP-C, O/W_WP-g3, O/W_WP-g6, and evolution of the oxygen partial pressure in biphasic systems (O+W_WP-C and O+W_WP-g6) with distinct measurements in oil (O) and water (W) (e)*

*See Table III.1 for abbreviations of the systems. Values are expressed as the mean ± standard deviation (n ≥ 3); for a given storage time, different numbers of * correspond to significantly different values for different emulsions, according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%).*

III.2.4.2. Impact of emulsifier type on lipid oxidation

The emulsions formulated with Tween 80 were significantly more oxidized after seven days of storage at 25°C than those formulated with whey proteins, as shown by the evolution of the concentrations of hydroperoxides and aldehydes ***(Figures III.2a and III.2b)***. This difference is not attributable to a change in the availability of oxygen in the B or HS, since the evolution of pO_2 was almost identical, regardless of the system ***(Figures III.2c and III.2d)***. In addition, a complementary experiment carried out on non-emulsified biphasic systems composed of fish oil and an aqueous phase containing whey proteins or Tween 80 ***(Table III.1)***, contained in closed vials without a HS, confirmed a similar evolution of pO_2 in both media ***(Figure III.2e)***. Therefore, the decrease in pO_2 of the aqueous phase is attributable to the transfer of oxygen from the aqueous phase to the oil and its immediate consumption in the oil by unsaturated fatty acids oxidation, regardless of the type of emulsifier, confirmed by the increase of the concentration of hydroperoxides during ageing (12.5 ± 1.8 mmol/kg at the beginning of storage *vs* 30.1 ± 3.3 mmol/kg in the system with proteins and 29.9 ± 2.1 mmol/kg in the system with Tween 80 after seven days at 25°C). Although the higher oxidizability of emulsions formulated with Tween 80 is not due to the higher availability of oxygen in this system, it may be partially attributable to the presence of oxidized unsaturated fatty acids from this emulsifier (Nuchi *et al.* 2001) and to the presence of traces of transition metals. A complementary experiment carried out in a B only composed of fish oil and Tween 80 ***(Table III.1)*** showed that approximately three quarters of the emulsifier could contribute hydroperoxides. Indeed 1 kg of Tween 80-enriched oil contained 3 mmoles more hydroperoxides than 1 kg of the control oil (22.1 ± 3.4 *vs* 19.1 ± 1.5 mmol/kg). However, no definitive conclusion can be drawn, as the difference was not statistically significant and, moreover, the evolution of the pO_2 in both oils and their HS during storage at 25°C was similar ***(Figure III.2f)***. In addition, when whey proteins or Tween 80 are present alone in aqueous phase (W_WP and W_T80, ***Table III.1***), they do not seem to oxidize spontaneously in the absence of oil droplets, since the partial oxygen pressure measured in HS and B stayed at 21 % during 25 days of storage (data not shown). On the other hand, whey proteins may also be at the origin of slower lipid oxidation because of their antioxidant potential, which may occur here by two mechanisms: the chelation of metals, since these proteins are negatively charged in the studied emulsion (Faraji *et al.* 2004), and the trapping of free radicals due to the presence of cysteyl, methionyl, tryptophanyl, and tyrosyl residues (Faraji *et al.* 2004; Elias *et al.* 2005).

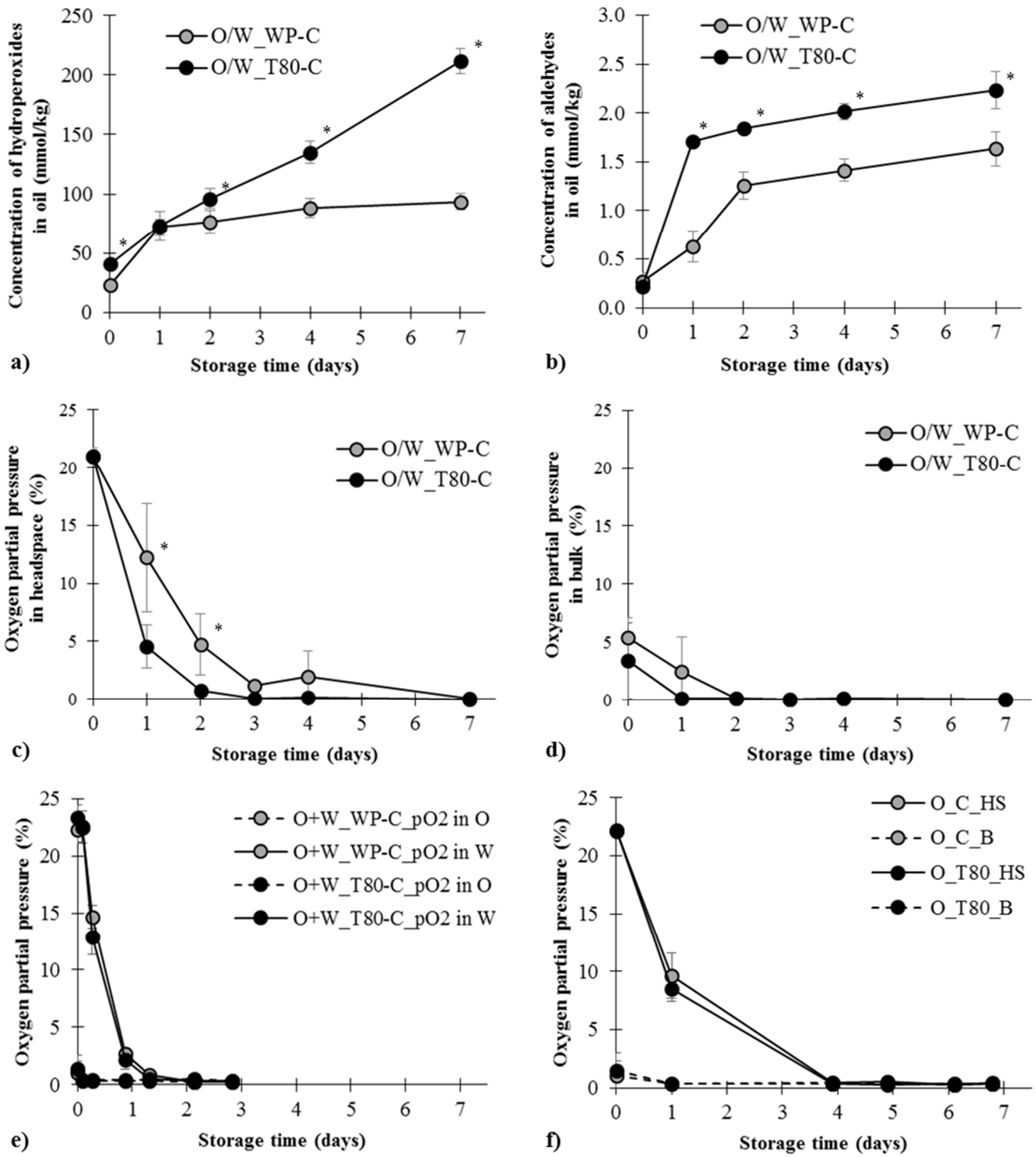


Figure III.2. *Effect of the nature of emulsifier on lipid oxidation of o/w emulsions, biphasic systems, and oils during storage at 25°C: evolution of lipidic hydroperoxides (a), aldehydes (b), oxygen partial pressure in the HS (c), oxygen partial pressure in the B (d) in O/W_WP-C and O/W_T80-C; evolution of the oxygen partial pressure in biphasic systems (O+W_WP-C and O+W_T80-C) with distinct measurements in oil (O) and water (W) (e); evolution of oxygen partial pressure in oil ± T80 with distinct measurements in headspace (HS) and bulk (B) (f)*

*See Table III.1 for abbreviations of the systems. Values are expressed as the mean ± standard deviation (n ≥ 3); for a given storage time, different numbers of * correspond to significantly different values for different emulsions, according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%).*

III.2.4.3. Impact of antioxidants on lipid oxidation

Eugenol and α-tocopherol showed significant antioxidant activity in emulsions formulated with whey proteins, whereas ferulic acid did not ***(Figures III.3a-d)***. In addition, there was no significant decrease in the concentration of eugenol during storage and only a slightly significant decrease in α-tocopherol from day 9 (-15% of the initial concentration) ***(Figure III.3e)***. The addition of eugenol to α-tocopherol did not improve its protective effect ***(Figures III.3a-d)*** and did not limit its loss ***(Figure III.3e)***. However, eugenol and α-tocopherol showed no significant antioxidant activity in emulsions formulated with Tween 80, according to the evolution of the hydroperoxide concentration ***(Figure III.4a)***. There was only a slight delay in the oxidation kinetics over the first two days, shown by the monitoring of aldehyde concentrations and pO_2 ***(Figure III.4b-d)***. The concentration of eugenol remained constant throughout the storage period, unlike α-tocopherol, which was largely degraded after 12 days (loss > 70% of the initial concentration) ***(Figure III.4e)***. UHPLC-PDA-MS analysis of the samples at day 0 and day 12 confirmed the loss of α-tocopherol (retention time rt = 8.25 min, *m/z* 429.3734 (63) and 163.0761 (100), 291 nm (λ_{max})) and the generation of α-tocopherol oxidation products, identified as α-tocopherolquinone (rt = 5.35 min, *m/z* 445.3672 (100) and 177.0916 (42), 261 nm (shoulder) and 268 nm (λ_{max})), 7,8-epoxy-α-tocopherolquinone (rt = 4.04 min, *m/z* 461.3633 (100) and 193.0863 (3)), and 4,5-epoxy-α-tocopherolquinone (rt = 4.29 min, *m/z* 461.3633 (100) and 193.0863 (3)) (Verleyen *et al.*, 2001a; Verleyen *et al.*, 2001b) ***(Figure III.5)***.

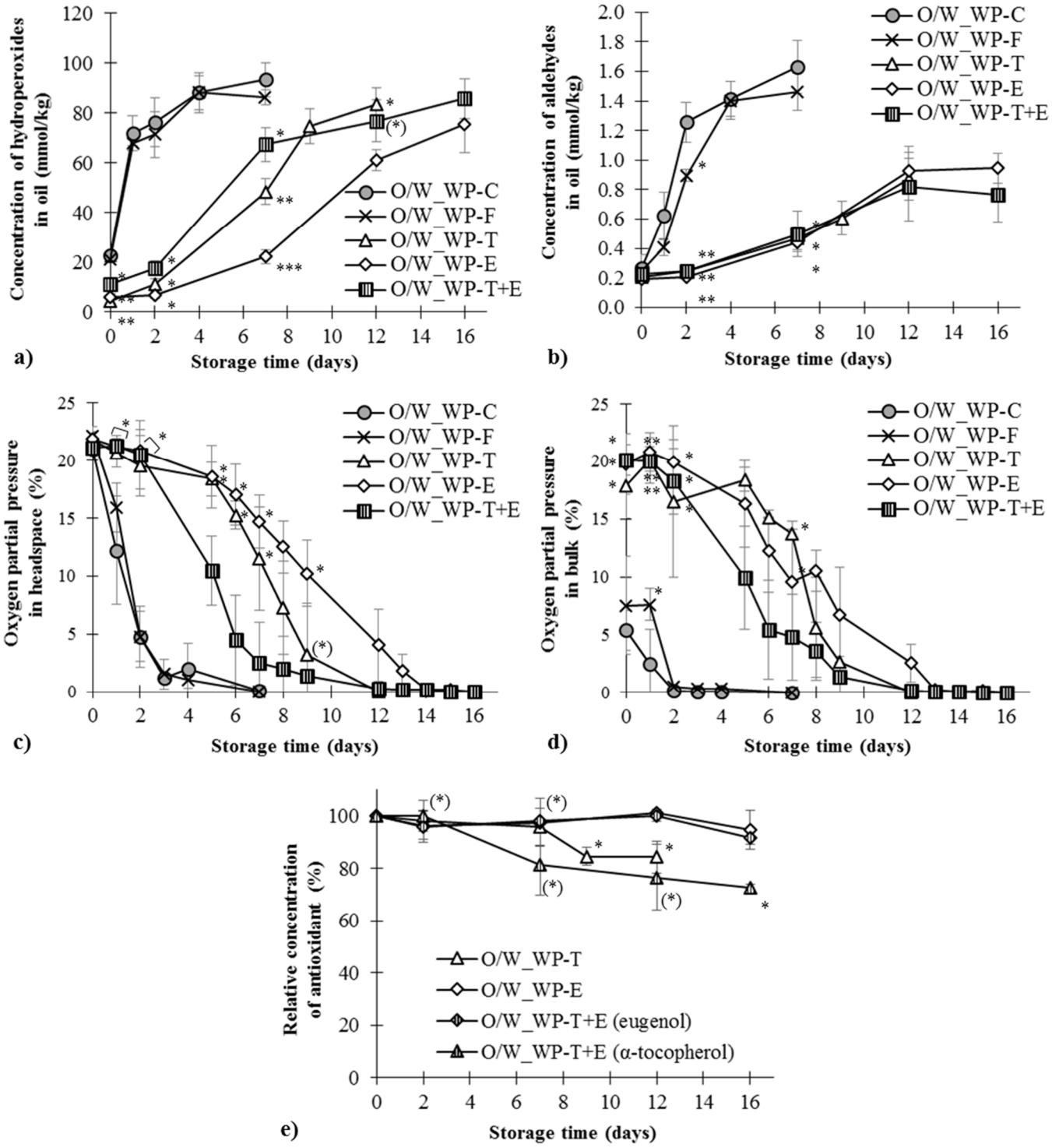


Figure III.3. *Effect of antioxidants on lipid oxidation of o/w emulsions formulated with whey proteins during storage at 25°C: evolution of lipidic hydroperoxides (a), aldehydes (b), oxygen partial pressure in the HS (c), oxygen partial pressure in the B (d), antioxidants (e) in O/W_WP-C, O/W_WP-F, O/W_WP-T, O/W_WP-E, and O/W_WP-T+E*

*See Table III.1 for abbreviations of the systems. Values are expressed as the mean ± standard deviation (n ≥ 3); in a)-d) for a given storage time, different number of * correspond to significantly different values for different emulsions according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%); in e) for a given emulsion, different number of * correspond to significantly different values for different storage times according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%). The symbol (*) was used when the value was not significantly different from both values with no mark and *.*

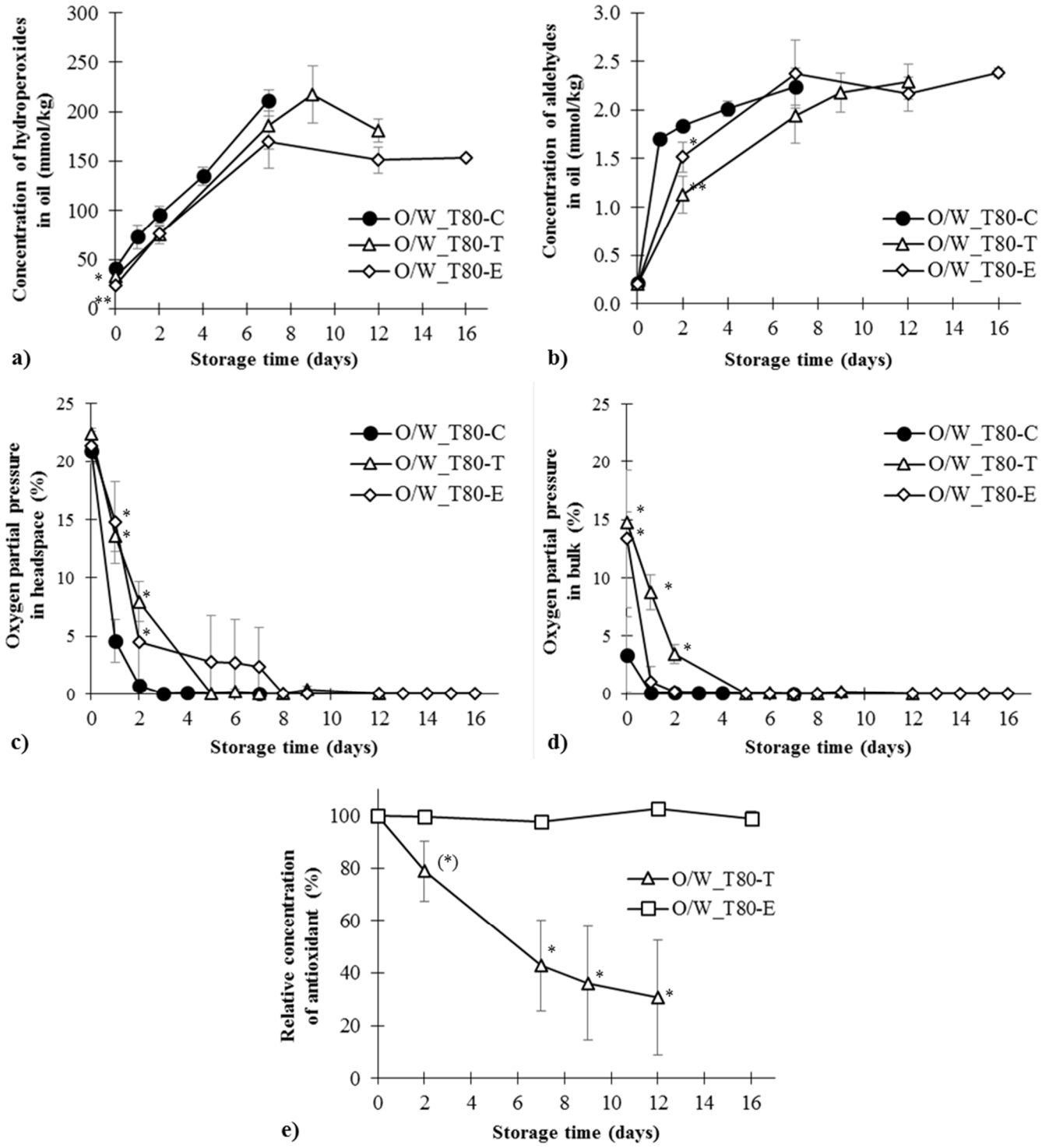


Figure III.4. *Effect of antioxidants on lipid oxidation of o/w emulsions formulated with Tween 80 during storage at 25°C: evolution of lipidic hydroperoxides (a), aldehydes (b), oxygen partial pressure in the HS (c), oxygen partial pressure in the B (d), antioxidants (e) in O/W_T80-C, O/W_T80-T, and O/W_T80-E*

*See Table III.1 for abbreviations of the systems. Values are expressed as the mean ± standard deviation (n ≥ 3); in a)-d) for a given storage time, different number of * correspond to significantly different values for different emulsions according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%); in e) for a given emulsion, different number of * correspond to significantly different values for different storage times according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%). The symbol (*) was used when the value was not significantly different from both values with no mark and *.*

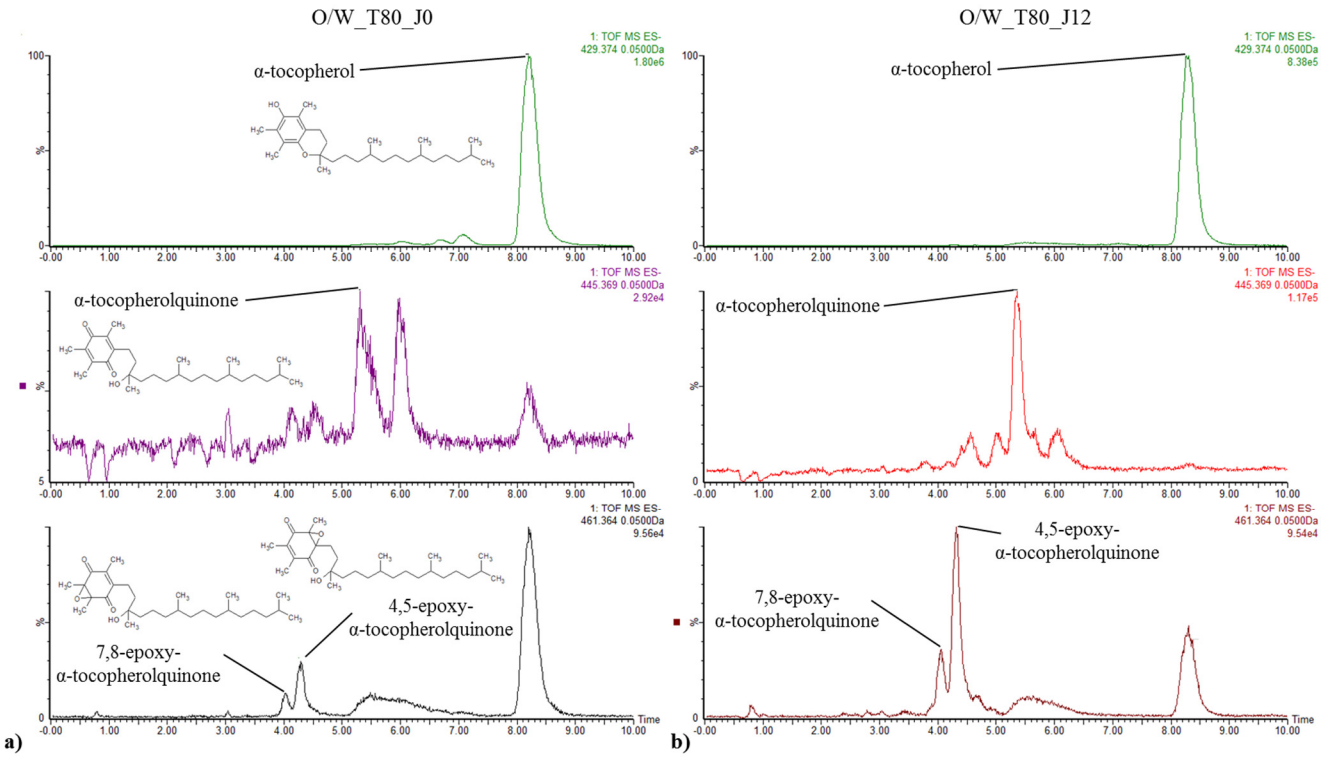


Figure III.5. *UHPLC-PDA-MS chromatograms of a methanolic extract from the lipid phase of the emulsion O/W_T80-T, after 0 (a) and 12 (b) days of storage at 25°C, at different m/z corresponding to α-tocopherol, α-tocopherolquinone, 7,8-epoxy-α-tocopherolquinone, and 4,5-epoxy-α-tocopherolquinone*

The absence of antioxidant activity of ferulic acid in emulsions formulated with whey proteins ***(Figure III.3)*** can be explained by its absence from the sites of lipid oxidation, due to its anionic form at neutral pH (Maqsood & Benjakul 2010; Espinosa *et al.* 2015), which would preferentially position it in the aqueous phase of the emulsion ($\log D_{oct/wat}$ = -1.38 at pH 6.8 (https://chemicalize.com)). Moreover, ferulic acid also does not possess any ability to chelate metals (Andjelković *et al.* 2006). On the other hand, eugenol and α-tocopherol have higher theoretical partition coefficients (2.61 and 10.51 at pH 6.8, respectively (https://chemicalize.com)) and should be mainly in the lipid phase. Further study showed that reconstitution of a mixture without emulsifier, composed of stripped fish oil (30%, w/w), water, and antioxidant (eugenol or α-tocopherol, at a concentration of 0.7 mmol/kg of the mixture) resulted in most of these molecules being in the lipid phase (86.0 ± 0.3% for eugenol and 82.1 ± 6.5% for α-tocopherol), which would allow them to exert their protective activity. However, as indicated previously, we found that the nature of the emulsifier in emulsions was important, since these two antioxidants were only active in the presence of whey proteins, but not Tween

80 ***(Figures III.3 and III.4)***. This can first be explained by the ability of these antioxidants to position themselves differently in the system, particularly at the interface of the lipid droplets, depending on the emulsifier used and its concentration (Stöckmann *et al.* 2000; Losada-Barreiro *et al.* 2013; Silva *et al.* 2017; López-Martínez & Rocha-Uribe 2018). However, the relative positioning of these two antioxidants in the presence of proteins or Tween has never been studied. It is likely that the more compact organization of Tween 80 at the interface, relative to that of whey proteins (Berton-Carabin *et al.* 2014), would limit the accessibility of α-tocopherol and eugenol to the interface in the presence of this emulsifier and thus hinder them from exerting their activity. In addition, the ability of excess Tween 80 to form micelles that can trap the antioxidants present in the aqueous phase (Decker *et al.* 2017), thus preventing them from accessing the lipid droplets, could further enhance this action. In addition, several studies have shown that proteins may be able to regenerate phenolic antioxidants (Tong *et al.* 2000; Wang *et al.* 2016), which would enhance their capacity to inhibit oxidation and explain the relatively stable concentrations of eugenol and α-tocopherol in emulsions formulated with whey proteins ***(Figure III.3e)***. However, there was no additive or synergistic effect when eugenol was added to α-tocopherol in emulsions formulated with whey proteins ***(Figure III.3)***. A similar observation has already been published on emulsions containing α-tocopherol added with long chain alkyl esters of caffeic acid (Sørensen *et al.* 2017) or rosmarinic acid (Panya *et al.* 2012). When present as a mixture, α-tocopherol and eugenol may be in competition to position themselves at the interface, the site of the initiation of oxidation reactions. Our results suggest that it is probably α-tocopherol which is preferentially located at the interface, thus being able to exert its antioxidant activity with respect to the unsaturated fatty acids, since its degradation kinetics were similar to those obtained when it was added alone to the emulsion ***(Figure III.3e)***. Preliminary results obtained in the laboratory from surface tension measurements also support this idea, as the addition of 117 mmol of α-tocopherol to 1 kg fish oil (50 times more than in the studied emulsion) reduced its surface tension by approximately 5 mN/m, whereas eugenol had no effect. Further studies need to be performed to better understand the mechanisms of action of phenolic compounds introduced alone or in mixtures and in the presence of various emulsifiers.

III.2.5. Conclusion

The results obtained in this study confirm that the composition of emulsions plays a key role in the kinetics of oxidation (viscosity, nature of the emulsifier). Importantly, no significant loss of

nutrients was noted after the maximum studied storage durations (from 7 to 16 days depending on the emulsion studied) at 25°C (99 ± 7% of EPA and 101 ± 10% of DHA were respectively recovered). Two of the three antioxidants tested (α-tocopherol and eugenol) delayed lipid oxidation but our results confirm the difficulty of predicting their activity in emulsions, which largely depends on their chemical structure, in particular because it influences their positioning in the system and therefore their proximity to oxidation sites.

III.3. ARTICLE 4 – "FERULIC ACID AND EUGENOL HAVE DIFFERENT ABILITIES TO MAINTAIN THEIR INHIBITORY ACTIVITY AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN EMULSIFIED SYSTEMS"

Publication acceptée dans ***Frontiers in Microbiology*** *en janvier 2019*

Aurélia Pernin[a,b], Véronique Bosc[b], Marie-Noëlle Maillard[b] and Florence Dubois-Brissonnet[a*]

[a] Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

[b] Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 91300, Massy, France

*Corresponding author: florence.dubois@agroparistech.fr

III.3.1. Abstract and keywords

Natural phenolic compounds are found in large quantities in plants and plant extracts and byproducts from agro-industries. They could be used to ensure food quality and safety due to their antimicrobial properties demonstrated in systems such as culture medium. The aim of this study was to evaluate the ability of two natural phenolic compounds, ferulic acid and eugenol, to maintain their inhibitory activity against the growth of *Listeria monocytogenes* in an oil-in-water emulsion, simulating a complex food system. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each phenolic compound was first determined in culture medium, consisting of TS broth and an added emulsifier. Whey proteins and Tween 80 increased the MIC of the antimicrobial activity of eugenol. The MIC of ferulic acid was less affected by the addition of Tween 80. The inhibitory activities of both phenolic compounds were then compared at the same concentration in emulsions and their corresponding aqueous phases by following the growth of *L. monocytogenes* by plate counting. In emulsified systems, eugenol lost the high inhibitory activity observed in the aqueous phase, whereas ferulic acid retained it. The partition coefficient ($\log P_{oct/wat}$) appears to be a key factor. Eugenol ($\log P_{oct/wat} = 2.61$) dispersed in the aqueous phase intercalates into the bacterial membrane and has high antimicrobial activity. In contrast, it likely preferentially partitions into the lipid droplets when dispersed in an emulsion, consequently losing its antimicrobial activity. As ferulic acid is more hydrophilic, a higher proportion probably remains in the aqueous phase of the emulsion, retaining its antimicrobial activity.

Keywords: phenolic compound, antimicrobial, growth inhibition, emulsion, partition coefficient, lipid droplets, phytophenol, foodborne pathogen.

III.3.2. Introduction

Natural phenolic compounds appear to be good candidates for ensuring the quality and safety of several perishable products, as they have been shown both antioxidant and antimicrobial activities (Brewer 2011; Gyawali & Ibrahim 2014; Pernin *et al.* 2018) and can be easily obtained in large quantities from plant extracts or byproducts from agro-industries (Balasundram *et al.* 2006; Tornuk *et al.* 2011). Many studies have already described the antimicrobial activity of phenolic compounds in culture media (Burt 2004; Daglia 2012) and there is an increasing interest to evaluate this activity in real foods or cosmetics. In contrast to simple culture media, these complex systems are highly heterogeneous and several regions with different physical properties can coexist. The effectiveness of antimicrobials in these complex systems is generally lower due to their interactions with matrix components and storage conditions (Weiss *et al.* 2015).

In a previous study, we evaluated the antimicrobial and antioxidant activities of a series of phenolic compounds in growth media. Ferulic acid and eugenol were identified among the few compounds to have both activities (Pernin *et al.* 2018). Ferulic acid is widely distributed in plants and can be found, for example, in sugar beet pulp and wheat or maize bran (Bonnin *et al.* 2002). Eugenol is mainly found in essential clove oil (Burt 2004). These two molecules are known for their antimicrobial activities in culture media (Burt 2004; Borges *et al.* 2013; Pernin *et al.* 2018; Pernin *et al.* 2019) but only a few studies demonstrate their efficiencies in real food systems. Ferulic acid showed an inhibitory effect against *L. monocytogenes* in cheese (Takahashi *et al.* 2013; Van Tassell *et al.* 2015), smoke salmon (Takahashi *et al.* 2013) and salads (Takahashi *et al.* 2015b). Eugenol inhibited the growth of *L. monocytogenes* in cooked beef (Hao *et al.* 1998), in cabbage, barley and papaya pulp (Catherine *et al.* 2012). Ferulic acid and eugenol have similar chemical structures, both with a methoxyl group in the *ortho*-position of the phenolic group ***(Figure III.6)***, but ferulic acid possesses an acid function, contrary to eugenol. Moreover, these two compounds have different hydrophobic properties ($\log P_{o/w}$ =2.61 for eugenol and $\log P_{o/w}$ = 1.67 and -1.81 for the undissociated and dissociated form of ferulic acid respectively) that can affect their interactions with food components and distribution in heterogeneous systems.

The aim of this study was to evaluate the ability of these two compounds to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* in a realistic complex food system, *i.e.* an oil-in-water emulsion that could mimic, for example, food sauces. We notably focused on the impact of the presence of two different emulsifiers (Tween 80 or whey proteins) and lipid droplets (fish oil) on the antimicrobial activity of these phenolic compounds. *L. monocytogenes* was chosen as the bacterial model because it is a ubiquitous Gram-positive foodborne pathogen that can potentially contaminate all stages of the food chain and is commonly found in ready-to-eat foods (Buchanan *et al.* 2017).

III.3.3. Materials and Methods

III.3.3.1. Bacterial strain and subculture conditions

The strain used in this study was *Listeria monocytogenes* CNL 895805, serotype ½ a, isolated from sheep brain. It was graciously provided by P. Velge (INRA, Nouzilly) (Van Langendonck *et al.* 1998). Before each experiment, the strain, stored in cryovials at -80°C, was regrown in two successive subcultures in tryptic soy broth (TSB, Biomérieux, France) at 30°C.

III.3.3.2. Phenolic compounds and other chemicals

Eugenol was purchased from Jansen (Beerse, Belgium) and ferulic acid from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) (***Figure III.6***). The predicted partition coefficient ($logP_{o/w}$) in octanol/water of eugenol is 2.61 (https://chemicalize.com/). For ferulic acid the logPo/w of its undissociated and dissociated forms are respectively 1.67 and -1.81 (https://chemicalize.com/).

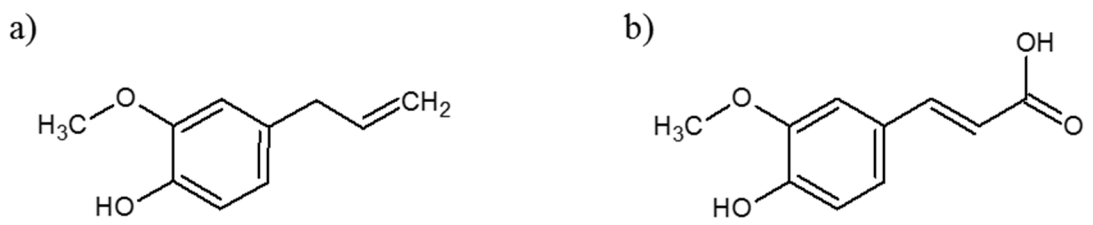


Figure III.6. *Chemical structures of eugenol (a) and ferulic acid (b)*

Hydrochloric acid (1 mol/L), sodium hydroxide (1 mol/L), and acetone were purchased from Carlo Erba (Fontenay-aux-Roses, France), Tween 80 (critical micellar concentration CMC = 19 mg/mL (Mahmood & Al-koofee 2013)) from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), and whey proteins (ProLacta 95) from Lactalis (Laval, France). Fish (tuna) oil (Omegavie® 5/25 TG

flavourless Qualitysilver®) was purchased from Polaris (Quimper, France) and stripped of its antioxidants before use according to a protocol adapted from Roman *et al.* (2013).

III.3.3.3. Aqueous phases for emulsion preparation

Aqueous phases consisted of TSB pH 7.2 with added emulsifiers and/or phenolic compounds, when appropriate. When necessary, the pH was adjusted to 5.5 with hydrochloric acid (1 mol/L) using a pH-meter (SI Analytics lab 870, Mainz, Germany). Tween 80 (7.1 g/L; *i.e.* 0.5% (w/w) emulsion) was added to the TSB before pH adjustment and autoclave sterilization. Whey proteins (14.3 g/L; *i.e.* 1% (w/w) emulsion) were added to TSB after autoclave sterilization and the mixture was filtered through 0.22 µm filters (Stericup® and Steritop®, Merck Millipore, Massachusetts).

The phenolic compounds were first prepared as stock solutions in acetone, due to their low solubility in TSB, and added at the appropriate concentration to the sterile aqueous phase. The maximum concentrations of phenolic compounds solubilized in acetone were 0.57 mol/L for ferulic acid and 1.68 mol/L for eugenol. The acetone was then evaporated under nitrogen flow. Bacterial growth controls were carried out to ensure the absence of inhibitory activity of acetone traces after evaporation.

III.3.3.4. Determination of the minimum inhibitory concentration of ferulic acid and eugenol in aqueous phases

Inhibitory concentrations of eugenol and ferulic acid were determined using a method previously described with minor modifications (Guillier *et al.* 2007; Pernin *et al.* 2018). Bacterial growth was followed in an automatic spectrophotometer (Bioscreen C, Labsystems, Helsinki, Finland) by measuring the optical density (OD) at 600 nm for 72 h in two 100-well microplates.

A wide range of concentrations of eugenol and ferulic acid was tested to determine their inhibitory concentrations in TSB with each emulsifier. The inhibitory activity of eugenol was determined at pH 7.2 in the presence of Tween 80 (TSB-T80_pH7.2), whey proteins (TSB-WP_pH7.2), or without emulsifier as a control (TSB_pH7.2). The inhibitory activity of ferulic acid was determined at pH 7.2 without emulsifier (TSB_pH7.2), at pH 5.5 in the presence of Tween 80 (TSB-T80_pH5.5), and at pH 5.5 without emulsifier (TSB_pH5.5).

The final concentrations of the phenolic compounds varied for eugenol from 0 to 8 mmol/L in TSB_pH7.2, 0-16 mmol/L in TSB-T80_pH7.2, and 0-12 mmol/L in TSB-WP_pH7.2 and for

ferulic acid, from 0 to 30 mmol/L in TSB_pH7.2 and TSB_pH5.5 and from 0 to 12 mmol/L in TSB-T80_pH5.5. In the case of ferulic acid, the pH was adjusted to 5.5 or 7.2 using sodium hydroxide (1 mol/L). The concentrations were increased until total growth inhibition or they reached the solubility threshold. A total of 20-75 concentrations, prepared from at least two different solutions, were tested per compound in a given medium.

Two hundred microliters of the aqueous phases, with or without various concentrations of phenolic compounds, were added to each well. Each well was inoculated with a standardized inoculum at 1% (v/v from the second subculture (approximately 10^6 CFU/mL)) and the microplates incubated at 30°C with slow and continuous shaking. At least two growth curves were acquired for each concentration. Antimicrobial activity is characterized by the minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC). The MIC is the concentration at which no bacterial growth is recorded and the NIC that below which the compound has no inhibitory activity. These values are expressed in mmol/L: the lower the MIC, the stronger the antimicrobial effect. These values were obtained after two modeling steps. First, the maximum specific growth rates (μ_{max}) were estimated from the growth kinetics by fitting the modified Gompertz model (Guillier *et al.* 2007). Second, the MIC and NIC were determined for each phenolic compound by plotting growth rates transformed by square-root as a function of the concentration and modeling μ_{max} with the Lambert and Pearson model (Lambert and Pearson 2000). The solver of Microsoft Excel® (2013) was used to minimize the sum of squares and allowed estimation of the model parameters. The standard deviations (SD) of model parameters and sums of squares were calculated with SolverAid, a complementary macro (de Levie 2012).

III.3.3.5. Preparation of emulsions

Emulsions were formulated with 30% (w/w) fish oil dispersed in the aqueous phase (see III.3.3.3). Fish oil was chosen for emulsion preparation because it contains a high proportion of long-chain unsaturated fatty acids from the omega-3 family, which are increasingly used in food products due to nutritional recommendations (FAO 2010; INRA & ANSES 2013). Thirty-nine mL (*i.e.* 36 g) of freshly stripped fish oil was added to 84 mL of the aqueous phase. The mixture was placed in a crystallizer filled with ice and water and emulsified using a T25 Ultra-Turrax homogenizer (Janke and Kunkel Ika Labortchnik, Staufen, Germany) with a S25KR-25F rotor-stator generator (previously autoclaved) at 9,500 rpm for 5 min, followed by 20 min with a sonicating probe (Sonifier® Cell disrupter B15, Branson, Germany) at maximal magnitude with alternating cycles (10 s sonication/10 s rest). The particle size distributions of

the emulsions were measured by laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Malvern, England). A refractive index ratio of 1.47 for the oil phase was used to calculate particle size distributions. The volume median diameter d(v,0.5) was determined: 1.24 ± 0.04 µm, which was stable throughout the duration of bacterial growth. All the systems displayed a mono-modal intensity-diameter distribution.

The antimicrobial activity of eugenol was tested in emulsions in the presence of two different emulsifiers, Tween 80 or whey proteins (***Table III.4***) at the native pH of TSB (pH 7.2), which is close to that for the optimal growth of *L. monocytogenes* (Anses 2011). The antimicrobial activity of ferulic acid was tested in emulsions in the presence of Tween 80 as emulsifier at pH 5.5, because ferulic acid is more active at acidic pH ***(Table III.5)***. The antimicrobial activity of ferulic acid was not tested in emulsions containing whey proteins, as they precipitate at pH 5.5. The concentrations of phenolic compounds tested in the emulsions were chosen to be just above the MIC in the corresponding aqueous phase (or at the solubility threshold if the MIC was not reached, ***Table III.5***): 16 mmol/L eugenol in an emulsion with Tween 80 (Em-T80_pH7.2_Eu), 10 mmol/L eugenol in an emulsion with whey proteins (Em-WP_pH7.2_Eu), and 5.5 mmol/L ferulic acid in an emulsion with Tween 80 (Em-T80_pH5.5_Fe). The growth kinetics of *L. monocytogenes* in the emulsions with eugenol or ferulic acid was compared to respective control emulsions without any antimicrobial (Em-T80_pH7.2_Co, Em-WP_pH7.2_Co and Em-T80_pH5.5_Co).

Table III.4. *Overview of the emulsified systems used in this study and corresponding aqueous phases*

Ingredient/Condition	TSB	pH		Whey proteins	Tween 80	Eugenol		Ferulic acid	Stripped fish oil
Value/Quantity (per L of aqueous phase)	30 g/L	7.2	5.5	14.3 g/L	7.1 g/L	16 mmol/L	10 mmol/L	5.5 mmol/L	30% (w/w)
TSB-T80_pH7.2_Co	✓	✓			✓				
Em-T80_pH7.2_Co	✓	✓			✓				✓
TSB-T80_pH7.2_Eu	✓	✓			✓	✓			
Em-T80_pH7.2_Eu	✓	✓			✓	✓			✓
TSB-WP_pH7.2_Co	✓	✓		✓					
Em-WP_pH7.2_Co	✓	✓		✓					✓
TSB-WP_pH7.2_Eu	✓	✓		✓			✓		
Em-WP_pH7.2_Eu	✓	✓		✓			✓		✓
TSB-T80_pH5.5_Co	✓		✓		✓				
Em-T80_pH5.5_Co	✓		✓		✓				✓
TSB-T80_pH5.5_Fe	✓		✓		✓			✓	
Em-T80_pH5.5_Fe	✓		✓		✓			✓	✓

III.3.3.6. Bacterial kinetics in emulsions and corresponding aqueous phases

Each emulsified system and its corresponding aqueous phase (***Table III.4***) was inoculated with a standardized inoculum to obtain approximately 10^{-1} bacteria/mL (1% v/v, serially diluted from the second subculture). The antimicrobial concentrations were the same in the emulsions and their corresponding aqueous phases.

The flasks were incubated with stirring at 350 rpm on magnetic plates (MIXdrive 6HT, 2mag, Germany) at 25°C for a maximum of 72 h. At each sampling point, 1 mL (for aqueous phases) or 1.46 mL (for emulsions) was collected, serially diluted, and plated on tryptone soya agar (TSA, Biomérieux) using the drop plate method (Chen *et al.* 2003). Colony forming units (CFU) were enumerated after 24 h of incubation and the $\log_{10}$ CFU/mL of the aqueous phase was calculated. At least three independent repetitions were performed for each condition. The maximum specific growth rates (μ_{max}) were estimated from the growth kinetics by fitting the modified Gompertz model (Guillier *et al.* 2007).

III.3.3.7. Statistical analysis

Growth rates (μ_{max}) estimated without phenolic compounds (see III.3.3.4) and in emulsions and the corresponding aqueous phase (see III.3.3.6) came from experiments performed at least in triplicate. One-way analysis of variance (ANOVA) with a formulation effect was applied using XLStat 18.06 (Addinsoft, Paris, France). If significant effects were revealed ($p < 0.05$), an estimated mean for the growth rate was calculated and compared using the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%) to determine significant differences between formulations.

III.3.4. Results

III.3.4.1. MICs of eugenol and ferulic acid in aqueous phases

The growth rate of *L. monocytogenes* was similar in the absence or presence of emulsifier without the phenolic compounds at pH 7.2 or 5.5 ***(Table III.5)***. We plotted the growth rates of *L. monocytogenes* in the aqueous phases as a function of the concentration of eugenol ***(Figure III.7a)*** or ferulic acid ***(Figure III.7b)***. The MIC and NIC of each compound in each aqueous phase are presented in ***Table III.5***.

The MIC of ferulic acid and eugenol in growth medium without emulsifier were in the same order of magnitude than MIC found in the literature against *L. monocytogenes* or other Gram positive bacteria by microdilution assay (Guttierrez-Larrainzar *et al.* 2012; Borges *et al.* 2013; Van Tassell *et al.* 2015; Pernin *et al.* 2018, 2019) or by agar dilution assays (Takahashi *et al.* 2013).

The presence of emulsifier had a negative effect on the antimicrobial activity of eugenol. The MIC increased by 41% in the presence of whey proteins and more than 184% in the presence of Tween 80 ***(Table III.5)***. The presence of Tween 80 also led to an increase in the NIC of eugenol.

Table III.5. *L. monocytogenes growth rates (μ_{max}), in different aqueous systems without phenolic compounds, determined using the Gompertz model and the non-inhibitory concentration (NIC) and minimum inhibitory concentration (MIC) of eugenol and ferulic acid, determined using the Lambert and Pearson model*

Phenolic compound	Aqueous systems	Control μ_{max} (h^{-1})	NIC (mmol/L)	MIC (mmol/L)
Eugenol	TSB_pH7.2	1.11 ± 0.11^{A}	2.88 ± 0.20	5.62 ± 0.13
	TSB-WP_pH7.2	1.19 ± 0.02^{A}	2.16 ± 0.22	7.95 ± 0.24
	TSB-T80_pH7.2	1.13 ± 0.02^{A}	4.70 ± 0.59	> 16*
Ferulic acid	TSB_pH7.2	1.11 ± 0.11^{A}	6.76 ± 0.85	> 30**
	TSB_pH5.5	0.91 ± 0.07^{B}	0.33 ± 0.09	4.05 ± 0.26
	TSB-T80_pH5.5	0.86 ± 0.07^{B}	0.54 ± 0.09	4.93 ± 0.17

**Solubility threshold of eugenol in TSB-Tween80; **Solubility threshold of ferulic acid in TSB pH7.2;*
For μ_{max}, values are expressed in h^{-1} (mean ± standard deviation ($n \geq 3$)) and different letters correspond to significantly different values according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%)

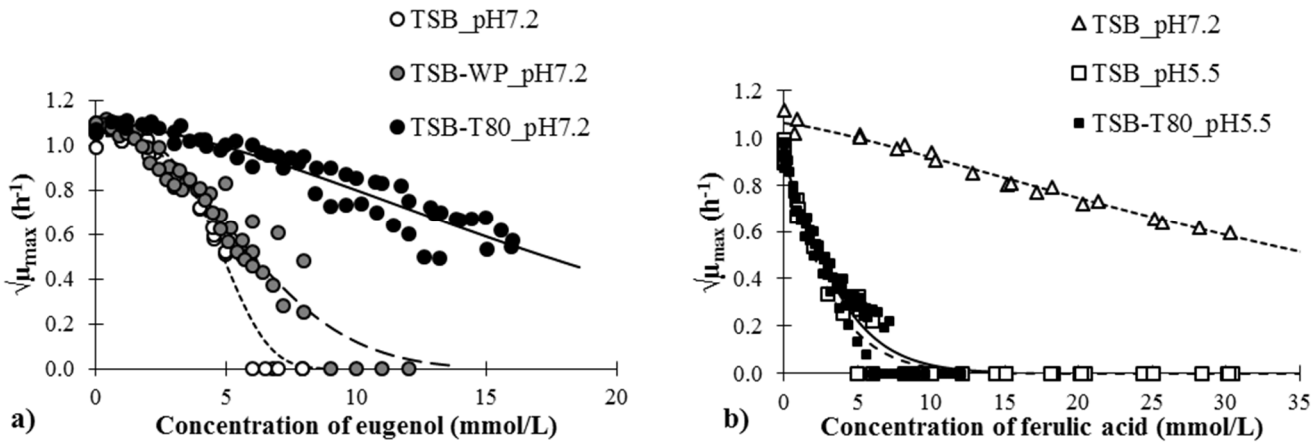


Figure III.7. *L. monocytogenes growth rates as a function of the concentrations of eugenol (a) or ferulic acid (b) in different aqueous systems (data fitted with the Lambert and Pearson model)*

The MIC was not attained before the solubility threshold (30 mmol/L) of ferulic acid at pH 7.2. Nevertheless, ferulic acid inhibited the growth of *L. monocytogenes* at pH 7.2, as it decreased from 1.1 h^{-1} (without ferulic acid) to 0.4 h^{-1} at 30 mmol/L ($\sqrt{0.4}=0.6$ $h^{-1/2}$ in ***Figure III.7)***. The antimicrobial activity of ferulic acid at pH 5.5 was much higher than at pH 7.2. The presence of Tween 80 had a small negative effect on the inhibitory activity of ferulic acid with a 22% increase of the MIC. The effect of whey proteins could not be tested at pH 5.5 because of protein aggregation.

III.3.4.2. Inhibitory activity of eugenol and ferulic acid in emulsions and their corresponding aqueous phases

The presence of oil and emulsifiers alone at pH 7.2 did not significantly affect the growth rate of *L. monocytogenes* (***Table III.6***, 0.97 ± 0.11 for emulsified systems with Tween 80 *vs* 1.21 ± 0.16 h^{-1} for the corresponding aqueous phase and 1.05 ± 0.14 for emulsified systems with whey proteins *vs* 1.22 ± 0.08 h^{-1} for the corresponding aqueous phase). In contrast, the presence of oil and Tween 80 at pH 5.5 significantly decreased the growth rate of *L. monocytogenes* (***Table III.6***, 0.62 ± 0.08 *vs* 0.96 ± 0.11 h^{-1}).

Eugenol at a concentration of 16 mmol/L in TSB-Tween 80 at pH 7.2 demonstrated incomplete, but significant, inhibitory activity: the growth rate of *L. monocytogenes* was 0.39 ± 0.07 h^{-1} *vs* 1.21 ± 0.16 h^{-1} for the control ***(Figure III.8a and Table III.6)***. In contrast, eugenol at the same concentration did not show any inhibitory activity in an emulsion with Tween 80 at pH 7.2: the bacterial growth rate was 1.13 ± 0.14 h^{-1} *vs* 0.97 ± 0.11 h^{-1} for the control ***(Figure III.8b and Table III.6)***.

We obtained similar results for 10 mmol/L eugenol in emulsions with whey proteins at pH 7.2. The inhibition of bacterial growth was complete in TSB-WP-Eu, whereas the bacterial growth rate was 1.22 ± 0.08 h^{-1} without eugenol ***(Figure III.8c and Table III.6)***. However, eugenol completely lost its inhibitory activity when in an emulsion ***(Figure III.8d and Table III.6)***.

Ferulic acid, at a concentration of 5.5 mmol/L, completely inhibited the growth of *L. monocytogenes* in TSB-Tween 80 at pH 5.5 ***(Figure III.8e and Table III.6)***, as well as in the corresponding emulsion ***(Figure III.8f and Table III.6)***.

Overall, the results show that the presence of oil and emulsifiers alter the inhibitory activity of eugenol but not that of ferulic acid.

Table III.6. *L. monocytogenes growth rates (μ_{max}) determined using the Gompertz model in different aqueous and emulsified systems, with or without phenolic compounds*

	T80_pH7.2		WP_pH7.2		T80_pH5.5	
	Control	Eugenol (16 mmol/L)	Control	Eugenol (10 mmol/L)	Control	Ferulic acid (5.5 mmol/L)
Aqueous phases	1.21 ± 0.16 ^{A}	0.39 ± 0.07 ^{C}	1.22 ± 0.08 ^{A}	0.00 ± 0.00 ^{D}	0.96 ± 0.11 ^{A}	0.00 ± 0.00 ^{D}
Emulsified systems	0.97 ± 0.11 ^{A}	1.13 ± 0.14 ^{A}	1.05 ± 0.14 ^{A}	1.25 ± 0.13 ^{A}	0.62 ± 0.08 ^{B}	0.00 ± 0.00 ^{D}

Values are expressed in h^{-1} (mean ± standard deviation ($n \geq 3$)) and different letters correspond to significantly different values according to the Newman-Keuls multiple comparison test (confidence interval 95%)

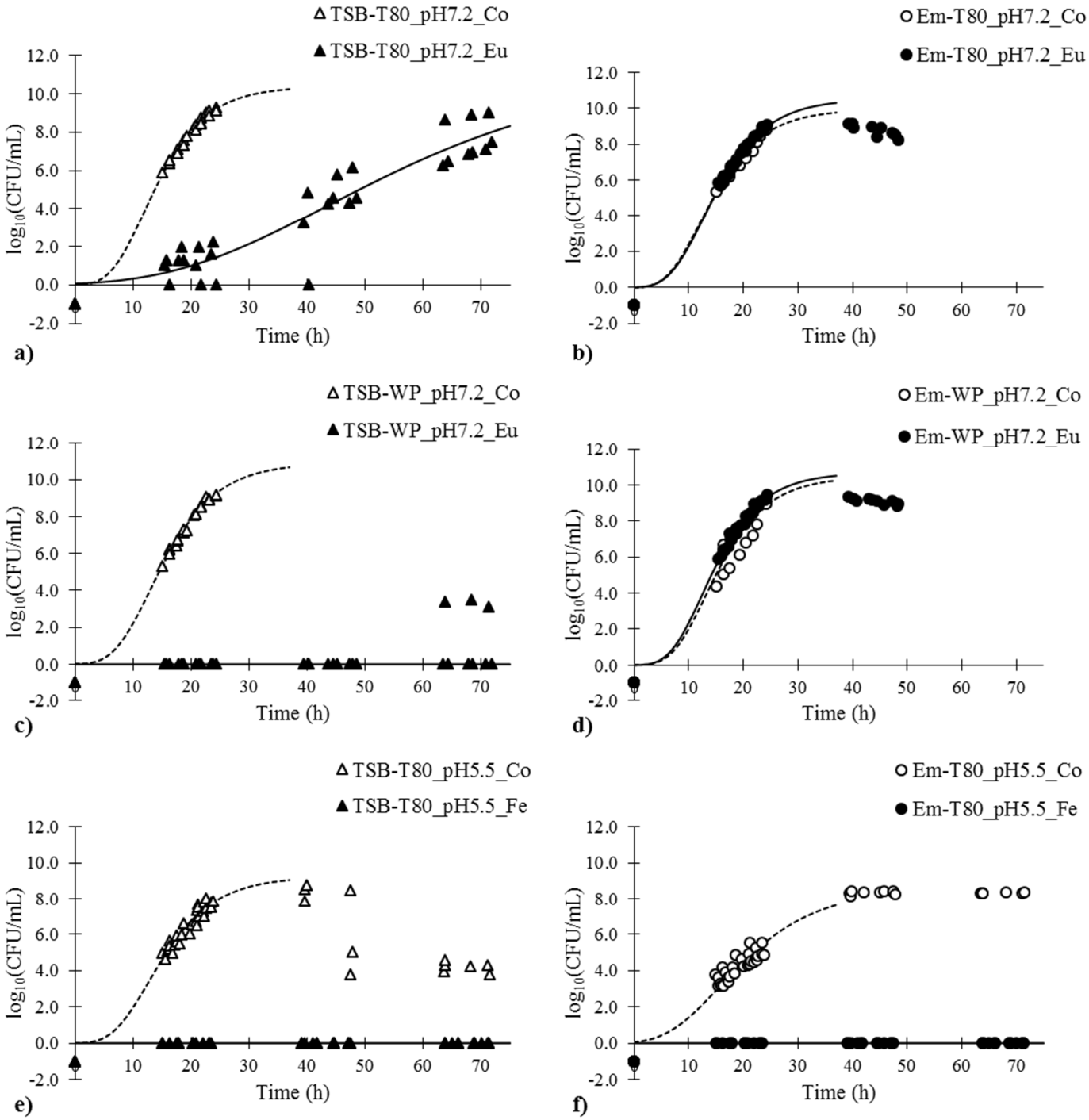


Figure III.8. *Growth curves of L. monocytogenes in different aqueous and emulsified systems in the presence of eugenol or ferulic acid: aqueous system (a) and emulsion (b) formulated with Tween 80 at pH 7.2 with or without eugenol (16 mmol/L); aqueous system (c) and emulsion (d) formulated with whey proteins at pH 7.2 with or without eugenol (10 mmol/L); aqueous system (e) and emulsion (f) formulated with Tween 80 at pH 5.5 with or without ferulic acid (5.5 mmol/L). Growth curves were fitted using the Gompertz model until 40 h (until the bacterial counts decreased)*

III.3.5. Discussion

III.3.5.1. Effect of emulsifiers on inhibitory activity of phenolic compounds in aqueous phases

The presence of either emulsifier resulted in an increase in the MICs of eugenol and ferulic acid, whereas it had no significant effect on the growth rate *L. monocytogenes* in the absence of the antimicrobials ***(Table III.5)***. Similarly, several studies have shown that the presence of emulsifiers can prevent essential oils and/or their pure compounds (generally eugenol, thymol, or carvacrol) from interacting with microorganisms (Juven *et al.* 1994; Hammer *et al.* 1999; Hammer & Carson 2011).

Juven *et al.* (1994) showed that the addition of Tween 80 in the culture medium decreases the antimicrobial activity of phenolic compounds. Moreover, they showed that the higher the concentration of Tween 80 (1,000 µL/L *vs* 125 µL/L), the higher the loss of activity of 140 mg/mL of thymol against *Salmonella* Typhimurium in nutrient agar ($10^{9.1}$ CFU/mL *vs* < 10^{1} CFU/mL recovery) (Juven *et al.* 1994). Several possibilities can explain this loss of activity. First, Tween 80 may form a protective coating around the bacteria that could prevent phenolic compounds from accessing the bacterial membrane. However, it is more likely that the emulsifier interacts with the phenolic compounds, leading to a decrease in their availability to contact the bacteria. Indeed, Tween 80 molecules are low-molecular weight emulsifiers composed of a polar polyethoxy-head and a hydrophobic tail consisting of oleic acid. They are known to form micelles when present above their critical micellar concentration (CMC) in aqueous systems (Berton-Carabin *et al.* 2014), which was the case in our study. Tween 80 was used at a concentration of 7.1 g/L, approximately 500 times higher than the CMC (19 mg/mL). These micelles form specific hydrophobic environments in which other molecules can be solubilized (Berton-Carabin *et al.* 2014). Eugenol and ferulic acid molecules could be trapped in micelles, thus being unavailable to interact with bacteria. As a consequence, higher concentrations are needed to obtain the same level of bacterial growth inhibition. The difference observed between eugenol and ferulic acid is probably due to the respective hydrophobicity (octanol/water partition coefficients, $\log P_{o/w}$) of these two molecules. Eugenol, with a $\log P_{o/w}$ of 2.61, is likely more easily partitioned into Tween 80 micelles than ferulic acid ($\log P_{o/w} = 1.67$ for the undissociated form).

The presence of whey proteins in the TSB also led to a slight increase in the MIC of eugenol. Proteins were previously shown to interfere with antimicrobial activity. For example, Juven *et al.* (1994) showed that the addition of 9 g/L bovine serum albumin (BSA) to nutrient agar

suppresses the inhibitory capacity of thymol against *Salmonella* Typhimurium. This could be explained by the well-known ability of proteins to bind phenolic compounds through van der Waals interactions (Weiss *et al.* 2015) and thus inactivate them, decreasing the number of molecules available for inhibiting bacterial growth. Indeed, Bouarab-Chibane *et al.* (2018b) showed that the decrease of antimicrobial activity of phenolic compounds with a molecular weight close to our compounds (resveratrol, naphthazarin, and chrysin) directly correlated with their higher affinity for bovine meat proteins, determined through the measurements of partition coefficients of phenolic compounds between a 20% (w/w) bovine meat protein suspension and its ultrafiltrate without proteins. Moreover, Reiners *et al.* (2000) used affinity chromatography at pH 3.0 to show the ability of eugenol to bind to β-lactoglobulin, the main protein from whey proteins. However, interactions between protein and phenolic compounds are complex and depend on several parameters, such as pH, temperature, protein type and concentration, and the type and structure of the phenolic compounds (Ozdal *et al.* 2013). Bouarab-Chibane *et al.* (2018b) also showed that the antimicrobial activity of phenolic compounds in the presence of proteins is better preserved at low temperatures, since hydrogen bonds between phenolic compounds and the bacterial surface are favored at the expense of van der Waals and hydrophobic interactions between the phenolic compounds and proteins.

In contrast, some studies have reported a positive impact of some emulsifiers, such as monolaurin (Blaszyk & Holley 1998), surfynol (Gaysinsky *et al.* 2005a; Gaysinsky *et al.* 2005b), soluble soy bean polysaccharides (Wu *et al.* 2014), and rhamnolipids (Haba *et al.* 2014), on the antimicrobial activity of essential oils and/or their pure constitutive compounds. This may be due to the ability of these emulsifiers to disperse in the aqueous phase, thus preventing their binding to the hydrophobic phenolic compounds (Blaszyk & Holley 1998; Gaysinsky *et al.* 2005a; Gaysinsky *et al.* 2005b). Another possibility suggested in the literature is that the emulsifiers cited above may enhance the efficiency of antimicrobials by increasing their interaction with the bacterial membrane (Donsì & Ferrari 2016). In this case, interactions between phenolic compounds and bacterial membranes are probably tighter than those between emulsifiers and phenolic compounds. However, the large differences between these emulsifiers and those used in our study, in terms of chemical structures, charges, size, and physical properties, could explain the difference of behavior.

III.3.5.2. Effect of the presence of oil droplets on the inhibitory activity of phenolic compounds

Eugenol, in contrast to ferulic acid, completely lost its inhibitory activity when added to emulsified systems, whereas they were both efficient in the corresponding aqueous phases containing emulsifiers. To our knowledge, the antimicrobial activity of ferulic acid in emulsions has never been studied, but some data are available in the literature concerning eugenol and other simple phenols from essential oils (Sznitowska *et al.* 2002; Han & Washington 2005; Gaysinsky *et al.* 2007; Gutierrez *et al.* 2008; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn 2010; Cava-Roda *et al.* 2012; Chang *et al.* 2012; Trinh Thi Thanh *et al.* 2013). Many studies have shown that the addition of oil to an aqueous phase has negative effects on antimicrobial activity. For example, Chang *et al.* (2012) showed that increasing the percentage of corn oil in emulsions from 6 to 9% (w/w) led to a 16-fold increase in the MIC of thyme essential oil against *Zygosaccharomyces bailii* (Chang *et al.* 2012). Similarly, sunflower oil added with soya lecithin to TSB (final concentration in the emulsion of 2.5%, w/w) increased the MIC of cinnamon essential oil (composed of 90% *trans*-cinnamaldehyde) and pure *trans* cinnamaldehyde by approximately five-fold on *Listeria innocua* (Trinh Thi Thanh *et al.* 2013). In contrast, several studies reported no loss of efficiency for some phenolic compounds extracted from essential oils in emulsions (Donsì *et al.*, 2012; Terjung *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2015). However, the antimicrobial concentrations in the emulsified systems were much higher (from 130 to 260 mmol/L) than in our study.

The loss of antimicrobial activity in emulsions is generally believed to be due to the preferential localization of the compounds to specific regions of the highly structured systems. The presence of a lipid phase can notably affect the distribution of components based on their affinity for hydrophobic or hydrophilic environments. The antimicrobial concentration available in the aqueous phase, in which the microorganisms are located, depends on the repartition of the compound between phases (Donsì *et al.* 2012; Terjung *et al.* 2012; Donsì & Ferrari 2016;). The difference observed in this study between eugenol and ferulic acid is likely due to their difference in hydrophobicity. Indeed, based on its $\log P_{o/w}$ (2.61), eugenol should more easily partition into oil droplets than ferulic acid ($\log P_{o/w}$ of undissociated and dissociated forms are 1.67 and -1.81 respectively). Thus, these two compounds differentially partition into the aqueous phases and emulsions based on their hydrophobic character ***(Figure III.9)***: the more hydrophobic the compound, the more inefficient it will be in the presence of lipid droplets. Between the two forms of ferulic acid, the dissociated form is the one that remains preferentially in aqueous phase, because of its lower $\log P_{o/w}$. It can be noted that the dissociated form of

ferulic acid, unlike that of most phenolic acids, was recently shown to have a significant inhibitory efficiency against *L. monocytogenes* (Pernin *et al.* 2019).

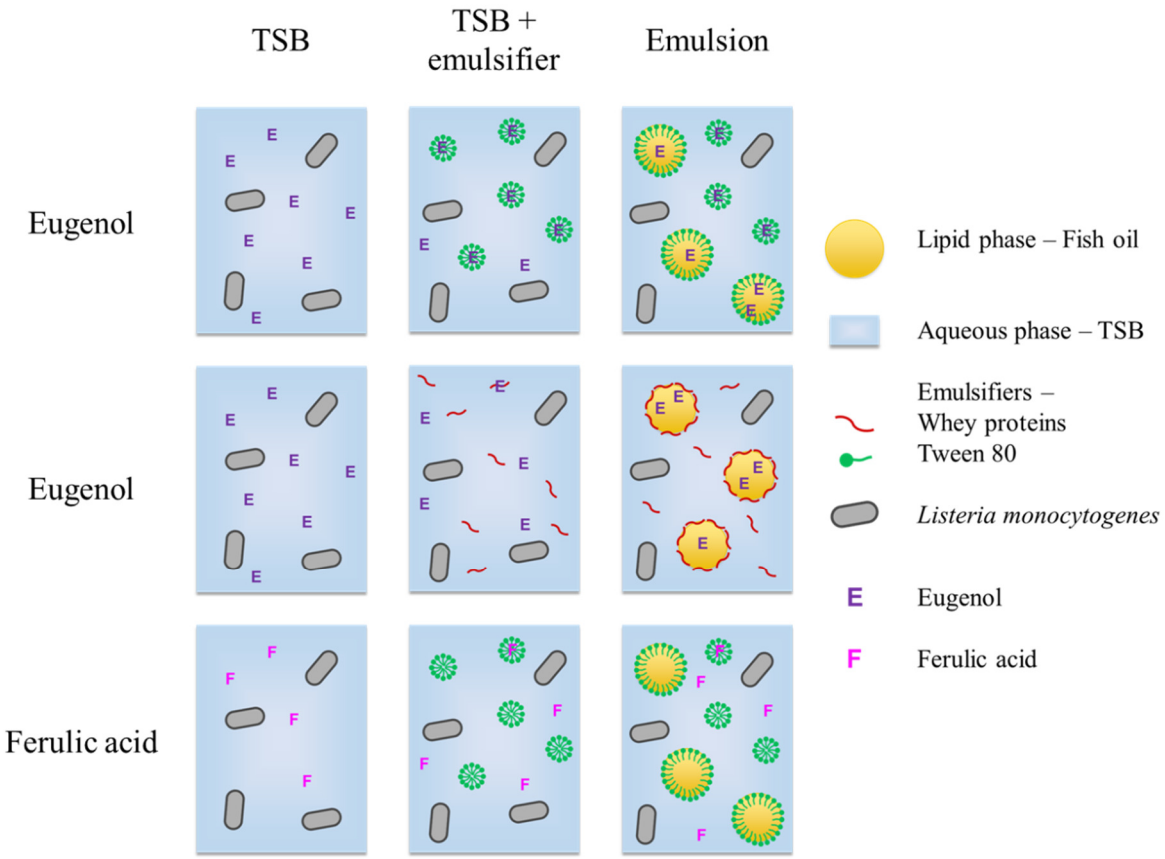


Figure III.9. *Hypothesis for the partition of eugenol and ferulic acid in the different phases in aqueous and emulsified systems*

Paradoxically, characteristic hydrophobicity parameters, such as octanol/water partition coefficients, are often used to predict the efficiency of membrane-active compounds, such as simple phenols: the more hydrophobic, the more they can partition into double phospholipid layers (Ultee *et al.* 2002; Burt 2004). In this context, compound selection, such as antimicrobials in emulsions, may face a contradiction. In aqueous phases, a phenolic compound with a high logP, such as eugenol, would preferentially partition into the bacterial membrane, thus exhibiting strong antimicrobial activity. In contrast, when dispersed in an emulsion, the same compound would preferentially migrate into the lipid droplets. Consequently, its concentration in the aqueous phase would be dramatically lower, along with its antimicrobial activity. This is probably what happened in previous studies about emulsions with thyme essential oil, composed of carvacrol and thymol ($logP_{o/w}$ 3.43) (Chang *et al.* 2012), and with cinnamon essential oil, composed of *trans* cinnamaldehyde ($logP_{o/w}$ 1.98) (Trinh Thi Thanh *et al.* 2013). In contrast, a less hydrophobic compound, such as ferulic acid, probably remains in higher

proportion in the aqueous phase of the emulsion, therefore retaining its antimicrobial activity. Thus, in order to optimize antimicrobial activity in complex emulsified systems such as foods or cosmetic matrices, it is better to choose a compound such as ferulic acid that has a multifactorial mode of action and that is not excessively hydrophobic for maintaining a sufficient proportion in the aqueous phase. Ferulic acid is especially interesting since *L. monocytogenes* does not develop tolerance after exposure to low concentrations (Takahashi *et al.* 2015a).

III.3.6. Conclusion

We demonstrate that emulsifiers, such as whey proteins and Tween 80 have a negative impact on the antimicrobial activity of eugenol. The MIC of ferulic acid was less affected by the addition of Tween 80. This effect appears to be mainly due to potential interactions between phenolic compounds and emulsifiers. Moreover, eugenol is not an attractive phenolic antimicrobial in emulsified systems, as opposed to ferulic acid. This appears to be mainly due to the presence of oil, that likely traps eugenol in the lipid phase. A much higher concentration of eugenol would probably be needed to inhibit bacterial growth in such emulsions, but it would negatively affect their organoleptic properties. In contrast, ferulic acid at pH 5.5 is an efficient antimicrobial at low concentrations in such systems, probably because it is less hydrophobic. These results highlight the necessity to select natural preservatives after testing them in complex media, such as lipid-rich systems close to realistic conditions for food or cosmetic applications.

III.4. POINTS A RETENIR

- L'oxydation des lipides est plus importante dans les émulsions formulées avec du Tween 80 qu'avec des protéines de lactosérum. Ce résultat peut s'expliquer par la capacité des **protéines** utilisées à exercer une **activité antioxydante** vis-à-vis des lipides, *via* leurs propriétés chélatrice et/ou antiradicalaire. Il faut cependant ne pas généraliser à tous types de milieux cette observation, la part des émulsifiants adsorbés à l'interface ou en excès dans la phase aqueuse n'étant pas la même dans les deux systèmes étudiés.
- L'augmentation de la **viscosité** de la phase aqueuse ralentit l'oxydation des lipides en émulsion, même si **l'effet obtenu est temporaire**. Il semblerait que ce ralentissement soit dû à une diminution de la **mobilité de l'oxygène** au sein du système, en particulier entre la phase aqueuse et les gouttelettes lipidiques.
- L'**eugénol** et l'**α-tocophérol** sont des antioxydants efficaces dans les émulsions formulées avec des protéines de lactosérum mais ne montrent aucune activité antioxydante en présence de Tween 80. Le Tween 80 pourrait inhiber leur activité en empêchant leur **positionnement** à l'interface ou en les **piégeant** dans des micelles en phase aqueuse (***Figure III.10c***). A l'inverse, les protéines pourraient **protéger et/ou régénérer** les antioxydants phénoliques en intervenant également dans les réactions d'oxydation.
- **La présence d'eugénol n'améliore pas l'activité antioxydante de l'α-tocophérol** lorsque les deux composés sont introduits en mélange dans les émulsions formulées avec des protéines de lactosérum. Ces deux composés ne présenteraient pas d'effet additif car ils entreraient en **compétition pour se positionner à l'interface** des gouttelettes lipidiques (***Figure III.10b***).
- L'**acide férulique** (0,7 mmol/kg d'émulsion) ne montre pas d'activité antioxydante vis-à-vis des lipides dans les émulsions formulées avec des protéines de lactosérum et à pH neutre. L'hypothèse formulée est que l'acide férulique serait principalement localisé en **phase aqueuse** (***Figure III.10a***) et que sa **charge négative** à pH neutre inhiberait son interaction avec l'interface des gouttelettes lipidiques par répulsion électrostatique avec les protéines chargées négativement.
- En phase aqueuse, **la présence d'émulsifiants a un impact négatif sur l'activité antimicrobienne de l'eugénol et de l'acide férulique**. La CMI de l'eugénol augmente de 41% en présence de protéines de lactosérum et de plus de 184% en présence de Tween 80. La CMI de l'acide férulique augmente quant à elle de 22% en présence de Tween 80. L'hypothèse

formulée serait un piégeage des antimicrobiens dans les micelles de Tween 80 ou l'existence d'interactions entre les antimicrobiens et les protéines, limitant leur accès à la cellule bactérienne (***Figure III.10d***).

- Quel que soit l'émulsifiant, l'**eugénol perd toute activité antimicrobienne** lorsqu'il est introduit dans des systèmes émulsionnés à des concentrations qui étaient inhibitrices dans les phases aqueuses correspondantes. L'hypothèse formulée est que l'eugénol, compte tenu de sa nature **hydrophobe**, **migrerait dans les gouttelettes lipidiques** et serait alors physiquement séparé des bactéries (***Figure III.10e***).
- A l'inverse, **l'acide férulique conserve son caractère antimicrobien** lorsqu'il est introduit à hauteur de 5,5 mmol/L (concentration inhibitrice en phase aqueuse correspondante) dans un système émulsionné avec Tween 80 et à pH 5,5. L'hypothèse formulée est que le degré d'hydrophilie de l'acide férulique lui permet de rester en concentration suffisante **dans la phase aqueuse** de l'émulsion (***Figure III.10e***).

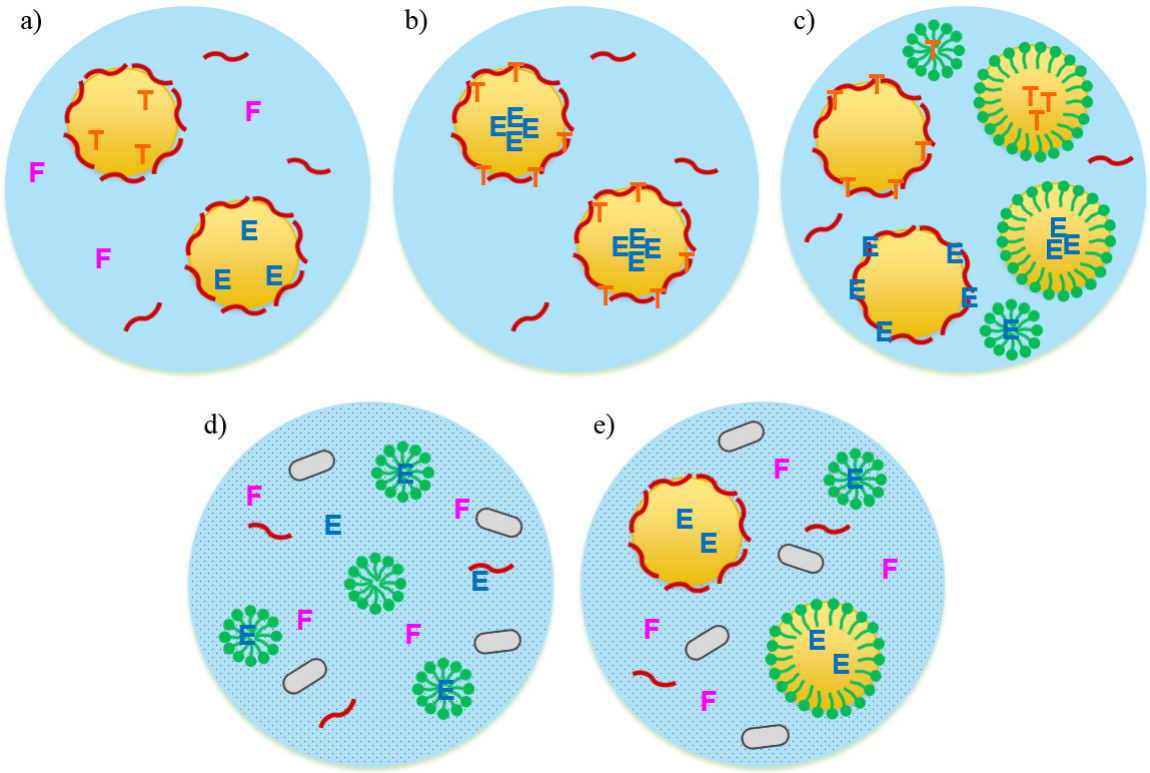


Figure III.10. *Représentation schématique des principales hypothèses expliquant les résultats acquis concernant les activités i) antioxydante des composés en émulsion: localisation (a), compétition pour l'interface (b), interaction avec les émulsifiants (c) et ii) antimicrobienne : interaction avec les émulsifiants en phase aqueuse (d), localisation en émulsion (e)*

Discussion générale & perspectives

Dans un contexte d'amélioration continue de la qualité des produits alimentaires dans toutes ses composantes (organoleptique, nutritionnelle et sanitaire), l'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre la double activité antioxydante et antimicrobienne de **composés phénoliques** au sein de milieux alimentaires complexes. Ces composés ont été choisis pour leurs propriétés multiples, en particulier une **activité antimicrobienne** vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*, bactérie considérée comme l'un des pathogènes alimentaires les plus dangereux, et une **activité antioxydante** susceptible de limiter l'oxydation des acides gras insaturés dont les omega-3 EPA et DHA, recommandés pour des raisons nutritionnelles.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont tout d'abord permis de **confirmer cette double activité antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques dans des systèmes modèles**, tout en soulignant des relations structure/activité et en décryptant les mécanismes d'action de certains groupes de composés. Des données originales ont ensuite été obtenues pour quelques molécules sélectionnées (eugénol, acide férulique, α-tocophérol) sur **l'expression de cette double activité dans des milieux alimentaires complexes riches en omega-3**. Les principaux résultats marquants de ce travail sont résumés et discutés ci-dessous.

Il est tout d'abord intéressant de souligner un certain nombre de différences importantes dans la mise en œuvre des deux activités antioxydante et antimicrobienne. Premièrement, celles-ci ne sont pas exprimées **aux mêmes niveaux de concentrations** : µM pour l'activité antioxydante et mM pour l'activité antimicrobienne en milieux modèles, dixième de mM pour l'activité antioxydante et mM pour l'activité antimicrobienne en milieux complexes de type émulsion huile dans eau. Un compromis serait donc à trouver pour permettre l'activité antimicrobienne des composés phénoliques tout en évitant des concentrations trop élevées pouvant conduire à un risque pro-oxydant. De plus, même si les **propriétés physico-chimiques** des molécules influencent les deux activités, elles le font de manière différente : l'environnement chimique du groupement phénolique et la présence de structures permettant une délocalisation électronique des radicaux phénoxyles produits jouent un rôle prépondérant sur l'activité antioxydante des molécules étudiées alors que c'est le niveau d'hydrophobicité et/ou la présence d'un groupement acide qui constituent les facteurs majeurs impliqués dans l'activité antibactérienne de ces composés. Par exemple, le tocophérol, trop hydrophobe pour être dispersé dans un milieu aqueux, ne montre aucune activité antimicrobienne même en milieu modèle alors qu'il est un antioxydant très efficace. En milieu émulsionné, la **localisation** des

cibles des composés phénoliques pour les deux activités constitue également une très grande différence : les lipides sont présents au sein des gouttelettes lipidiques ou à l'interface huile-eau, alors que les bactéries sont localisées dans la phase aqueuse. L'eugénol, ayant une forte affinité avec la phase lipidique et les interfaces des gouttelettes, apparaît donc en émulsion comme un antioxydant efficace alors qu'il ne montre plus d'activité antimicrobienne. Au contraire, l'acide férulique reste dans la phase aqueuse, conserve donc son activité antimicrobienne mais perd son activité antioxydante. L'exploitation d'une double activité passerait donc par la mise en œuvre de mélanges de composés phénoliques. Mais cette analyse mérite d'être nuancée car la localisation d'un composé phénolique dans la phase aqueuse d'une émulsion n'entraîne pas forcément une absence totale d'efficacité antioxydante, en particulier si la molécule possède une activité **chélatrice de métaux**, ce qui n'était pas le cas des composés choisis dans notre étude, ou si elle est capable d'**intervenir au niveau de l'interface**.

Nous nous sommes également trouvés confrontés à la difficulté de **développer des systèmes complexes réalistes, de type émulsions**, qui permettaient de mettre en évidence à la fois les activités antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques retenus suite à l'étude en système modèle. Le choix de l'émulsifiant a par exemple été délicat. L'utilisation de protéines de lactosérum, très courante en alimentaire, nous imposait de travailler à pH neutre, suffisamment éloigné du pI des protéines afin d'éviter l'agrégation des gouttelettes lipidiques. Or, il était nécessaire de pouvoir tester l'activité de l'acide férulique à pH acide afin qu'il soit majoritairement dans un état non dissocié favorable à l'expression de son activité antimicrobienne. Le Tween 80 a alors été utilisé pour une partie des expérimentations puisqu'il permettait de conserver la stabilité des émulsions en milieu acide. Malheureusement, dans ces émulsions, l'α-tocophérol et l'eugénol n'ont pas montré d'activité antioxydante alors qu'ils étaient des antioxydants efficaces dans les émulsions formulées avec des protéines de lactosérum. Le Tween 80 pourrait inhiber l'expression de leur activité en les empêchant de se positionner à l'interface ou en les piégeant sous forme de micelles, alors qu'à l'inverse, les protéines pourraient régénérer les antioxydants phénoliques ou les protéger en intervenant elles aussi dans les réactions avec les lipides. Concernant l'activité antimicrobienne, les deux émulsifiants ont un effet négatif sur l'activité de l'eugénol alors que l'activité de l'acide férulique a été peu impactée par la présence de Tween 80. Ceci permet de mettre en lumière l'effet des émulsifiants sur la modulation des activités, dont il est important de connaître l'étendue et les mécanismes pour aider ultérieurement à la formulation.

Ainsi, hors de l'activité propre de la molécule sur sa cible bactérienne ou lipidique, il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des facteurs interférents, et notamment les

interactions possibles entre les composés phénoliques et les constituants du milieu alimentaire, pour mettre en œuvre, maîtriser et prédire une potentielle double activité.

Suite à ces résultats, les perspectives d'études relatives à la mise en œuvre de cette double activité en émulsion sont nombreuses. Il serait intéressant d'identifier **un composé phénolique capable d'exercer une double activité en émulsion**, qui aurait donc les caractéristiques suivantes : efficacité antimicrobienne démontrée en milieu modèle, capacité à se localiser en phase aqueuse lorsqu'il est introduit en émulsion afin de se trouver en proximité des bactéries pathogènes, capacité à chélater les métaux de transition et à jouer ainsi un rôle d'antioxydant préventif. L'acide caféique et l'acide protocatéchique pourraient s'avérer des candidats pertinents, même si nous ne les avons pas initialement choisis à cause de leur faible activité antimicrobienne. Si les deux activités sont capables de s'exprimer indépendamment, il serait alors nécessaire de vérifier qu'elles peuvent s'exercer en mélange et de comprendre les éventuels mécanismes de compétition mis en jeu entre les deux. Il serait également important de poursuivre les études sur la mise en œuvre de **mélanges de composés phénoliques,** molécules pures tout d'abord puis extraits végétaux plus complexes, en particulier si l'on se situe dans un contexte de valorisation des co-produits issus des agro-industries. Une partie des composés, partiellement liposoluble, pourrait être utilisée pour ses propriétés antioxydantes alors que l'autre partie, hydrosoluble, serait valorisée pour ses propriétés antimicrobiennes.

Cette thèse a de plus contribué à enrichir les connaissances de **chacun des domaines d'étude** séparément : d'une part l'activité **antioxydante** de composés phénoliques, ainsi que l'oxydation des lipides en émulsion et les mécanismes associés, et d'autre part l'activité **antimicrobienne** de composés phénoliques en émulsion et les mécanismes s'y rattachant.

Concernant l'activité antioxydante des composés phénoliques, les résultats obtenus en milieu modèle ont confirmé ceux déjà bien établis dans la littérature, notamment sur les relations structure/activité. Ils ont surtout permis de décrire les **cinétiques réactionnelles** d'un nombre important de composés phénoliques, ce qui nous a conduit à les classer en trois catégories : briseurs de chaîne, retardateurs ou une combinaison des deux, ce qui a été très peu décrit dans la littérature et permet ainsi de mieux comprendre les mécanismes antiradicalaires des composés phénoliques.

Les résultats acquis en émulsions ont permis de confirmer que, comme suggéré dans la littérature, l'activité antioxydante des composés phénoliques était difficile à anticiper et à mettre en œuvre en émulsions car elle dépend d'un grand nombre de facteurs, notamment des

interactions avec d'autres composés présents dans le système, en particulier les émulsifiants comme évoqué précédemment. L'utilisation de **composés phénoliques en mélange** peut être intéressante mais ne s'avère pas toujours pertinente : dans notre étude, la présence d'eugénol n'améliore pas l'activité antioxydante de l'α-tocophérol lorsque ces deux composés sont introduits en mélange dans une émulsion formulée avec des protéines de lactosérum, alors que chacun d'eux présente une bonne efficacité lorsqu'il est ajouté seul à l'émulsion. L'hypothèse avancée pour expliquer ce résultat serait une compétition entre les différents composés du mélange pour se positionner à l'interface où s'exprimerait leur activité. Quelques études préliminaires montrent l'intérêt d'utiliser la tensiométrie pour mieux appréhender ces phénomènes et leur dynamique.

Plus largement, les résultats acquis ont permis de mieux comprendre l'influence des **propriétés rhéologiques de la phase aqueuse** sur l'oxydation des lipides en émulsion, paramètre qui pourrait également être utilisé en complémentarité des composés phénoliques pour contrôler l'oxydation. Ainsi, nous avons montré que l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse par ajout de gomme de guar ralentissait l'oxydation des lipides en émulsion, probablement du fait d'une moindre **mobilité de l'oxygène** entre la phase aqueuse et les gouttelettes lipidiques. Ces phénomènes avaient jusque-là été très peu abordés dans la littérature, alors que cet épaississant est très largement utilisé en alimentaire. Des études complémentaires en présence d'épaississants et de composés phénoliques seraient ainsi importantes à mener.

Concernant l'activité antimicrobienne, le travail réalisé en milieu modèle a permis d'apporter un certain nombre d'éléments de compréhension et de proposer des hypothèses quant à la relation assez peu étudiée dans la littérature entre **la structure chimique** des composés, leur activité antimicrobienne et leur mode d'action. Le travail spécifiquement réalisé avec les **acides phénoliques** à différents pH a mené au développement de trois **modèles** permettant de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces composés en milieu modèle. En effet, les effets antimicrobiens des acides phénoliques sont dus à une action conjointe de la diminution du pH extracellulaire et des formes non dissociées et dissociées des acides. L'application des modèles aux données expérimentales a permis de confirmer que la plupart des acides phénoliques avaient une activité antimicrobienne principalement due à l'action de la forme non dissociée, comme c'est le cas de la plupart des acides organiques. De manière plus surprenante, l'acide gallique et l'acide chlorogénique ont une activité antimicrobienne principalement due à la diminution du pH extracellulaire et les formes dissociées de l'acide *p*-coumarique et de

l'acide férulique montrent une activité antimicrobienne significative. Ces mécanismes n'avaient jamais été décrits dans la littérature et le développement de ces modèles pourra être utilisé afin de mieux comprendre les mécanismes d'action antimicrobiens d'autres acides.

Le travail réalisé en émulsions a permis d'apporter des éléments de connaissance sur les notions de répartition des composés antimicrobiens dans les différentes phases en présence (phase aqueuse *vs* phase lipidique du milieu alimentaire complexe), en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et notamment de leur degré d'hydrophobicité. Ainsi, en phase aqueuse, un composé phénolique hydrophobe, tel que l'eugénol, migrerait préférentiellement dans la double couche de phospholipides de la membrane bactérienne, présentant ainsi une activité antimicrobienne élevée. Au contraire, lorsqu'il est dispersé dans un système émulsionné, il se concentrerait préférentiellement dans les gouttelettes lipidiques ; sa concentration dans la phase aqueuse ne serait alors plus suffisante pour que son activité antimicrobienne soit maintenue. Ainsi, afin d'optimiser l'activité antimicrobienne dans les systèmes émulsionnés, il serait préférable de choisir un composé tel que l'acide férulique qui est suffisamment hydrophobe pour s'intercaler dans la membrane bactérienne mais qui a suffisamment d'affinité envers la phase aqueuse pour y rester en proportion suffisante et garder une activité intéressante. Les résultats acquis dans cette partie ont été particulièrement riches d'informations car l'activité antimicrobienne de l'acide férulique est assez peu décrite dans la littérature. Ainsi, les perspectives à ce travail seraient d'élargir l'étude à d'autres composés phénoliques ayant des niveaux d'hydrophobicité similaires à l'acide férulique afin de mieux décrypter les déterminants de leur efficacité et de mettre en place de futurs systèmes de conservation fiables dans des milieux émulsionnés.

Par ailleurs, pour des perspectives de ce projet à plus long terme, il serait pertinent d'étudier l'activité antimicrobienne des composés phénoliques sur la croissance de *Listeria monocytogenes* dans des émulsions conservées à des **températures de réfrigération**. En effet, dans ce type de milieu, il a été montré que des acides gras insaturés exogènes pouvaient favoriser la croissance de certaines bactéries à basse température en s'intégrant à leur membrane, ce qui leur permet d'économiser de l'énergie. L'interaction, à basse température, entre d'une part la présence d'acides gras insaturés favorisant la croissance bactérienne et d'autre part des composés phénoliques inhibiteurs de croissance, serait intéressante à étudier, en analysant notamment les mécanismes mis en jeu au niveau membranaire.

Pour conclure, en plus d'avoir contribué à enrichir les connaissances de **chacun des domaines d'étude**, cette thèse a permis d'apporter des éléments originaux sur **la mise en œuvre de la double activité antioxydante et antimicrobienne en émulsion**. Elle ouvre ainsi un champ d'application intéressant en formulation alimentaire et amélioration continue de la qualité des produits.

Références bibliographiques

Allerberger, F., & Wagner, M. (**2010**). Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, *16*(1), 16–23.

Almajano, M. P., Carbó, R., Delgado, M. E., & Gordon, M. H. (**2007**). Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *Journal of Food Science*, *72*(5), C258–C263.

Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., & Verhe, R. (**2006**). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, *98*(1), 23–31.

Anses. (**2011**). *Listeria monocytogenes. Datasheet on foodborne pathogens (France)*. Retrieved from https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0171FiEN.pdf

Anses. (**2017**). *Ciqual, Table de composition nutritionnelle des aliments*. Retrieved from https://ciqual.anses.fr/

Antwi, M., Geeraerd, A. H., Vereecken, K. M., Jenné, R., Bernaerts, K., & Van Impe, J. F. (**2006**). Influence of a gel microstructure as modified by gelatin concentration on Listeria innocua growth. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *7*, 124–131.

Araújo, M., Pimentel, F. B., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (**2015**). Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, *45*(2), 200–211.

Arima, H., & Danno, G. (**2002**). Isolation of Antimicrobial Compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) and their Structural Elucidation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *66*(8), 1727–1730.

Aspridou, Z., Moschakis, T., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (**2014**). Effect of the substrate's microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Research International*, *64*, 683–691.

Atarés, L., Marshall, L. J., Akhtar, M., & Murray, B. S. (**2012**). Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure. *Food Chemistry*, *134*(3), 1418–1424.

Augustin, J. C., & Carlier, V. (**2000**). Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology*, *56*, 53–70.

Augustin, J. C., Rosso, L., & Carlier, V. (**1999**). Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, *38*(1–2), 137–146.

Augustin, J. C., Zuliani, V., Cornu, M., & Guillier, L. (**2005**). Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(5), 1019–1042.

Azuma, G., Kimura, N., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (**2009**). Effect of Droplet Size on the Oxidative Stability of Soybean Oil TAG and Fish Oil TAG in Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Oleo Science*, *58*(6), 329–338.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (**2006**). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*, 191–203.

Baranowski, J. D., & Nagel, C. W. (**1984**). Antimicrobial and antioxidant activities of alkyl hydroxycinnamates (alkacins) in model systems and food products. *Canadian Institute of Food*

Science and Technology Journal, *17*(2), 79–85.

Baranyi, J., & Roberts, T. A. (**1994**). Review Paper A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, *23*, 277–294.

Belhaj, N., Arab-Tehrany, E., & Linder, M. (**2010**). Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochemistry*, *45*(2), 187–195.

Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., & El Hady, S. (**2013**). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, *58*(2), 173–181.

Bernard, F. X., Sablé, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J. F., Crouzet, J., & Blanche, F. (**1997**). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(5), 992–998.

Berset, C. (**2006**). Antioxydants phénoliques Structure, propriétés, sources végétales. In P. Sarni-Manchado & V. Cheynier (Eds.), *Les polyphénols en agro-alimentaire* (Tec & Doc, pp. 265–294). Paris, France: Lavoisier.

Berset, C., & Cuvelier, M. E. (**1996**). Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. In *Sciences des Aliments* (pp. 219–245). Paris, France: Lavoisier.

Berton-Carabin, C. C., Ropers, M.-H., & Genot, C. (**2014**). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(5), 945–977.

Berton, C., Genot, C., & Ropers, M. (**2011a**). Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid And Interface Science*, *354*(2), 739–748.

Berton, C., Ropers, M. H., Viau, M., & Genot, C. (**2011b**). Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(9), 5052–5061.

Blaszyk, M., & Holley, R. A. (**1998**). Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International Journal of Food Microbiology*, *39*, 175–183.

Blijdenstein, T. B. J., Van Vliet, T., Van der Linden, E., & Van Aken, G. A. (**2003**). Suppression of depletion flocculation in oil-in-water emulsions: A kinetic effect of β-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, *17*(5), 661–669.

Boland, M. (**2011**). Whey proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of food proteins* (Food Scien, pp. 30–55). Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing.

Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (**1997**). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH. Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, *30*(6), 609–615.

Bonnin, E., Saulnier, L., Brunel, M., Marot, C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., & Thibault, J. F. (**2002**). Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*(7), 1000–1005.

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (**2013**). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, *19*(4), 256–265.

Bornet, G. (**2000**). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue de Médecine Vétérinaire*, *151*(11), 1003–1010. Retrieved from

https://www.revmedvet.com/2000/RMV151_1003_1010.pdf

Bouarab-Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (**2018a**). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *319*(September).

Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Clement, Y., Lanteri, P., Bordes, C., Bouajila, J., … Oulahal, N. (**2018b**). Effect of interactions of plant phenolics with bovine meat proteins on their antibacterial activity. *Food Control*, *90*, 189–198.

Bouarab-Chibane, L., Oulahal, N., Dumas, E., Trinh, N., Thanh, T. H. I., Bouajila, J., … Degraeve, P. (**2018c**). Effect of interaction with food constituents on plant extracts antibacterial activity. *Food Science and Applied Biotechnology*, *1*(1), 77–85.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (**1995**). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, *28*, 25–30.

Branger, A., Richer, M. M., & Roustel, S. (**2007**). *Microbiochimie et alimentation*. Dijon, France: Educagri éditions.

Brewer, M. S. (**2011**). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(4), 221–247.

Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (**2011**). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling*, *27*(9), 1017–1032.

Brinster, S., Lamberet, G., Staels, B., Trieu-Cuot, P., Gruss, A., & Poyart, C. (**2010**). Brinster et al. reply. *Nature*, *463*(7279), E4–E4.

Brocklehurst, T. F., Parker, M. L., Gunning, P. A., Coleman, H. P., & Robins, M. M. (**1995**). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*, *78*(6), 601–608.

Brudzynski, K., Abubaker, K., & Miotto, D. (**2012**). Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H2O2-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chemistry*, *133*(2), 329–336.

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (**2017**). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, *75*, 1–13.

Buettner. (**1993**). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, alpha-Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *300*(2), 535–543.

Burt, S. (**2004**). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223–253.

Calligaris, S., Sovrano, S., Manzocco, L., & Nicoli, M. C. (**2006**). Influence of crystallization on the oxidative stability of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(2), 529–535.

Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (**2015**). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, *54*, 111–119.

Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X. Y., Torres Martinez, C., Maraj, S. R., & Hughes, M. N. (**1999**). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1411*(2–3), 475–488.

Campos, F. M., Couto, J. A., Figueiredo, A. R., Tóth, I. V., Rangel, A. O. S. S., & Hogg, T. A. (**2009**). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *135*(2), 144–151.

Cao, Y., Dickinson, E., & Wedlock, D. J. (**1990**). Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide. *Topics in Catalysis*, *4*(3), 185–195.

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (**2014**). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(4), 377–399.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (**2013**). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*(1), 15–25.

Carson, C. F., & Hammer, K. A. (**2011**). Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In H. Thormar (Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents* (pp. 203–238). Chichester, United Kingdom: Wiley.

Catherine, A. A., Deepika, H., & Negi, P. S. (**2012**). Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *Journal of Essential Oil Research, 24*, 481-486.

Cava-Roda, R. M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M. T., & Marín-Iniesta, F. (**2012**). Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(6), 2120–2131.

CE. (**1997**). Antiseptiques et désinfectants chimiques - Activité bactéricide de base - Méthode d'essai et prescriptions (Phase 1). *Ed. AFNOR; NF EN 1040 ((T 72-152))*.

CE. (**2005**). Réglement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *JOUE*, *L 338*, 1 du 22 décembre 2005.

CE. (**2007**). Réglement (CE) n° 1441-2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *JOUE*, *L 322*, 12 du 7 décembre 2007.

CE. (**2008**). Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires. *JO N° L 354 Du 31 Décembre 2008*, 16.

Cetin-Karaca, H., & Newman, M. C. (**2015**). Antimicrobial Efficacy of Natural Phenolic Compounds against Gram Positive Foodborne Pathogens. *Journal of Food Research*, *4*(6), 14–27.

Chan, H. W. S., Coxon, D. T., Peers, K. E., & Price, K. R. (**1982**). Oxidative reactions of unsaturated lipids. *Food Chemistry*, *9*, 21–34.

Chan, H. W. S., Matthew, J. A., & Coxon, D. T. (**1980**). A Hydroperoxy-epidioxide from the Autoxidation of a Hydroperoxide of Methyl Linolenate. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, *5*, 235–236.

Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (**2012**). Physical Properties and Antimicrobial Efficacy of Thyme Oil Nanoemulsions: Influence of Ripening Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 12056–12063.

Chen, B., Mcclements, D. J., & Decker, E. A. (**2010**). Role of continuous phase anionic polysaccharides on the oxidative stability of menhaden oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(6), 3779–3784.

Chen, C. Y., Nace, G. W., & Irwin, P. L. (**2003**). A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, *55*, 475–479.

Chen, Y., Xiao, H., Zheng, J., & Liang, G. (**2015**). Structure-thermodynamics-antioxidant activity relationships of selected natural phenolic acids and derivatives: An experimental and theoretical evaluation. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–20.

Chinnam, N., Dadi, P. K., Sabri, S. A., Ahmad, M., Kabir, M. A., & Ahmad, Z. (**2010**). Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *International Journal of Biological Macromolecules*, *46*(5), 478–486.

Cho, Y. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2002**). Ability of Surfactant Micelles To Alter the Physical Location and Reactivity of Iron in Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5704–5710.

Choe, E. (**2017**). Effects and Mechanisms of Minor Compounds in Oil on Lipid Oxidation. In C. C. Akoh (Ed.), *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (pp. 567–590). Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group.

Choe, E., & Min, B. D. (**2009**). Mechanisms of antioxidant in the oxidation of foods. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, *8*, 345–358.

Choe, E., & Min, D. B. (**2005**). Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. *JFS Concise Reviews in Food Sciences*, *70*(9), 28–36.

Choe, E., & Min, D. B. (**2006**). Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *5*, 169–186.

Cillard, J., & Cillard, P. (**2006**). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides*, *13*(1), 24–29.

Cillard, J., Cillard, P., & Cormier, M. (**1980**). Effect of Experimental Factors on the Prooxidant Behavior of alpha-Tocopherol. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, (August), 255–261.

Collin, S., & Crouzet, J. (**2011**). *Polyphénols et procédés* (Tec&Doc). Paris, France: Lavoisier.

Corongiu, F. P., & Banni, S. (**1994**). Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods in Enzymology*, *233*, 303–310.

Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (**1999**). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, *29*(2), 130–135.

Cotter, P. D., & Hill, C. (**2003**). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(3), 429–453.

Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., … Bartolomé, B. (**2010**). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, *161*(5), 372–382.

Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (**2005**). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *26*(5), 343–356.

Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (**2011**). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *38*(2), 99–107.

Cuvelier, M. E., Lagunes-Galvez, L., & Berset, C. (**2003**). Do Antioxidants Improve the Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions? *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *80*(11), 1101–1105.

Cuvelier, M. E., & Maillard, M. N. (**2012**). Stabilité des huiles alimentaries au cours de leur stockage. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, *19*(2), 125–132.

Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (**1992**). Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *56*(2), 324–325.

Cuvelier, M. E., Soto, P., Courtois, F., Broyart, B., & Bonazzi, C. (**2017**). Oxygen solubility measured in aqueous or oily media by a method using a non-invasive sensor. *Food Control*, *73*, 1466–1473.

Daglia, M. (**2012**). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, *23*, 174–181.

Dalgaard, P., & Koutsoumanis, K. (**2001**). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, *43*(3), 183–196.

Dangles, O. (**2006**). Propriétés chimiques des polyphénols. In P. Sarni-Manchado & V. Cheynier (Eds.), *Les polyphénols en agro-alimentaire* (Tec&Doc). Paris, France: Lavoisier.

Davidson, P. M., Bozkurt Cekmer, H., Monu, E. A., & Techathuvanan, C. (**2015**). The use of natural antimicrobials in food: an overview. In T. M. Taylor (Ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (pp. 1–27). Woodhead Publishing.

De Leonardis, A., & Macciola, V. (**2003**). Effectiveness of caffeic acid as an anti-oxidant for cod liver oil. *International Journal of Food Science and Technology*, *38*(4), 475–480.

de Levie, R. (**2012**). *Advanced Excel for scientific data analysis* (3rd ed.). Brunswick, Maine: Atlantic Academic.

de Sarrau, B., Clavel, T., Zwickel, N., Despres, J., Dupont, S., Beney, L., … Nguyen-the, C. (**2013**). Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *Food Microbiology*, *36*(2), 113–122.

Decker, E. A., McClements, D. J., Bourlieu-Lacanal, C., Durand, E., Figueroa-Espinoza, M. C., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (**2017**). Hurdles in Predicting Antioxidant Efficacy in Oil-in-water emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, *67*, 183–194.

Delhalle, L., Daube, G., Adolphe, Y., Crevecoeur, S., & Clinquart, A. (**2012**). Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maitrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, *16*(3), 369–381.

Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., & Trevors, J. T. (**2003**). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, *52*(2), 149–182.

Dens, E. J., & Van Impe, J. F. (**2001**). On the need for another type of predictive model in structured foods. *International Journal of Food Microbiology*, *64*(3), 247–260.

Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D., & Pittia, P. (**2009**). Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Research International*, *42*(8), 1163–1170.

Dickinson, E. (**1992**). *An introduction to food colloids*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Dickinson, E. (**2009**). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, *23*(6), 1473–1482.

Dickinson, E. (**2010**). Food emulsions and foams: Stabilization by particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *15*(1–2), 40–49.

Dimakou, C. P., Kiokias, S. N., Tsaprouni, I. V., & Oreopoulou, V. (**2007**). Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsions. *Food Biophysics*, *2*(1), 38–45.

Donnelly, J. L., Decker, E. A., & McClements, D. J. (**1998**). Iron-Catalyzed Oxidation of Menhaden Oil as Affected by Emulsifiers. *Journal of Food Science*, *63*(6), 997–1000.

Donsì, F., Annunziata, M., Vincensi, M., & Ferrari, G. (**2012**). Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, *159*, 342–350.

Donsì, F., & Ferrari, G. (**2016**). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, *233*, 106–120.

Duttaroy, A. K. (**2016**). Docosahexaenoic acid supports feto-placental growth and protects cardiovascular and cognitive function: A mini review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *118*(10), 1439–1449.

EFSA. (**2014**a). *Listeria. L'EFSA Explique Les Zoonoses*, 2.

EFSA. (**2014**b). Zoonoses d'origine alimentaire. *L'EFSA Explique Les Zoonoses*, 4.

EFSA & ECDC. (**2011**). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses , Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. EFSA Journal* (Vol. 9). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2597.

EFSA ANS Panel, Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Domenico, A. Di, Frutos, M. J., … Dusemund, B. (**2017**). Scientific opinion on the re-evaluation of guar gum (E 412) as a food additive. *EFSA Journal 2017*, *15*(2), 62.

EFSA, & ECDC. (**2017**). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA Journal* (Vol. 15). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547

Eklund, T. (**1983**). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *The Journal of Applied Bacteriology*, *54*(3), 383–389.

Eklund, T. (**1985**). Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of *p*-hydroxybenzoic acid. *International Journal of Food Microbiology*, *2*(3), 159–167.

El-Gammal, A. A., & Mansour, R. M. (**1986**). Antimicrobial activities of some flavonoid compounds. *Zentralblatt Für Mikrobiologie*, *141*(7), 561–565.

Elias, R. J., & Decker, E. A. (**2017**). Antioxidants and their mechanisms of action. In C. C. Akoh (Ed.), *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (Fourth edi, pp. 543–566). Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group.

Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2005**). Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase β-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(26), 10248–10253.

Endo, Y., Hoshizaki, S., & Fujimoto, K. (**1997**). Oxidation of synthetic triacylglycerols containing

eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids: Effect of oxidation system and triacylglycerol structure. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *74*(9), 1041–1045.

Espinosa, R. R., Inchingolo, R., Alencar, S. M., Rodriguez-Estrada, M. T., & Castro, I. A. (**2015**). Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. *Food Chemistry*, *182*, 95–104.

FAO. (**2010**). *Fats and fatty acids in human nutrition - Report of an expert consultation* (Vol. 91). Rome.

FAO. (**2017**). *L'avenir de l'alimentation et de l'agriculture - Tendances et défis*. Retrieved from www.fao.org/3/a-i6583e.pdf%0AI6881FR/1/02.17

Faraji, H., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2004**). Role of Continuous Phase Protein on the Oxidative Stability of Fish Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 4558–4564.

Foti, M. C. (**2007**). Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *59*(12), 1673–1685.

Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M. T., & Ruberto, G. (**1996**). Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure−Activity Relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(2), 497–501.

Frankel, E. N. (**1998**). *Lipid Oxidation*. (E. N. Frankel, Ed.) (First edit). Dundee, UK: The Oily Press.

Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R., & Prior, E. (**1996**). Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(1), 131–135.

Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J., & German, B. (**1994**). Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*, 1054–1059.

Frankel, E. N., Satué-Gracia, T., Meyer, A. S., & German, J. B. (**2002**). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(7), 2094–2099.

Gañan, M., Martínez-Rodríguez, A. J., & Carrascosa, A. V. (**2009**). Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, *20*(8), 739–742.

Gavaric, N., Mozina, S. S., Kladar, N., & Bozin, B. (**2015**). Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *18*(4), 1013–1021.

Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (**2005**a). Growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. *Journal of Food Protection*, *68*(12), 2559–2566.

Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (**2005**b). Stability and antimicrobial efficiency of eugenol encapsulated in surfactant micelles as affected by temperature and pH. *Journal of Food Protection*, *68*(7), 1359–1366.

Gaysinsky, S., Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (**2007**). Antimicrobial efficacy of eugenol microemulsions in milk against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, *70*(11), 2631–2637.

George, S. M., Richardson, L. C. C., & Peck, M. W. (**1996**). Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International*

Journal of Food Microbiology, *32*(1–2), 73–90.

Ghorbani Gorji, S., Smyth, H. E., Sharma, M., & Fitzgerald, M. (**2016**). Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *56*, 88–102.

Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (**2014**). Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 114*, 392-397.

Gotoh, N., Noguchi, Y., Ishihara, A., Yamaguchi, K., Mizobe, H., Nagai, T., … Wada, S. (**2010**). Highly unsaturated fatty acid might act as an antioxidant in emulsion system oxidized by azo compound. *Journal of Oleo Science*, *59*(12), 631–639.

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.

Guillier, L., Baril, E., & Augustin, J. C. (**2017**). Prévoir le comportement des bactéries pathogènes dans les aliments. In M. Naïtali, L. Guillier, & F. Dubois-Brissonnet (Eds.), *Risques microbiologiques alimentaires* (Tec&Doc, pp. 133–170). Paris, France: Lavoisier.

Guillier, L., Nazer, A. I., & Dubois-Brissonnet, F. (**2007**). Growth response of *Salmonella* Typhimurium in the presence of natural and synthetic antimicrobials: estimation of MICs from three different models. *Journal of Food Protection*, *70*(10), 2243–2250.

Gunstone, F. (**2004**). *The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses* (Blackwell). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García-Armesto, M. R., & del Valle, P. (**2012**). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, *26*(2), 555–563.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (**2008**). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, *124*(1), 91–97.

Guzun-Cojocaru, T., Koev, C., Yordanov, M., Karbowiak, T., Cases, E., & Cayot, P. (**2011**). Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: Transfer of iron from chelates to milk proteins at interface. *Food Chemistry*, *125*(2), 326–333.

Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (**2014**). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, *46*, 412–429.

Haahr, A. M., & Jacobsen, C. (**2008**). Emulsifier type, metal chelation and pH affect oxidative stability of n-3-enriched emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(10), 949–961.

Haba, E., Bouhdid, S., Torrego-Solana, N., Marqués, A. M., Espuny, M. J., García-Celma, M. J., & Manresa, A. (**2014**). Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: Antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pharmaceutics*, *476*, 134–141.

Hammer, K. A., & Carson, C. F. (**2011**). Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils. In H. Thormar (Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents* (pp. 255–306). Chichester, United Kingdom: Wiley.

Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (**1999**). Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Journal of Applied*

Microbiology, *86*, 446–452.

Han, J., & Washington, C. (**2005**). Partition of antimicrobial additives in an intravenous emulsion and their effect on emulsion physical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, *288*, 263–271.

Hansch, C., & Fujita, T. (**1964**). p-σ-π Analysis. A method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, *86*(8), 1616–1626.

Hao, Y. Y., Brackett, R. E., & Doyle, M. P. (**1998**). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *Journal of Food Protection, 61*, 307-312.

Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T. (**1995**). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, *48*(1), 125–129.

Hasenhuettl, G. L., & Hartel, R. W. (**2008**). *Food Emulsifiers and Their Applications*. (G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel, Eds.) (Second edi). New York, US: Springer.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (**2002**). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572–584.

Helander, I. . M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., … von Wright, A. (**1998**). Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, *46*(9), 3590–3595.

Hirshfield, I. N., Terzulli, S., & O'Byrne, C. (**2003**). Weak organic acids : a panoply of effects on bacteria. *Science Progress*, *86*(4), 245–270.

Holley, R. A., & Patel, D. (**2005**). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, *22*(4), 273–292.

Horiuchi, K., Shiota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T., & Tsuchiya, T. (**2007**). Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *30*(February), 287–290.

Hsiao, C.-P., & Siebert, K. J. (**1999**). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *47*(3), 189–201.

Hu, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2003**). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(6), 1696–1700.

Huang, S. W., Frankel, E. N., & Bruce German, J. (**1994**). Antioxidant activity of alpha- and gamma-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(10), 2108–2114.

Huber, G. M., Vasantha Rupasinghe, H. P., & Shahidi, F. (**2009**). Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides. *Food Chemistry*, *117*(2), 290–295.

Hwang, C.-A. (**2007**). Effect of salt, smoke compound, and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in simulated smoked salmon. *Journal of Food Protection*, *70*(10), 2321–2328.

Hwang, C.-A., Sheen, S., & Juneja, V. (**2011**). Effects of Sodium Lactate on the Survival of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* spp. in Cooked Ham at Refrigerated and Abuse Temperatures. *Food and Nutrition Sciences*, *02*(05), 464–470.

Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (**1993**). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *BBA - Biomembranes*, *1147*(1), 132–136.

INRA & ANSES. (**2013**). *Etude d'impacts des chartes d'engagements volontaires de progrès nutritionnel sur les volumes de nutriments mis sur le marché: étude actualisée. Rapport Oqali.*

ISO method 3960. (**2017**). Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de l'indice de peroxyde - Détermination avec point d'arrêt iodométrique.

ISO method 9936. (**2006**). Determination of tocopherols and tocotrienols by High Performance Liquid Chromatography.

Jacobsen, C. (**2015**). Some strategies for the stabilization of long chain n-3 PUFA-enriched foods: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *117*(11), 1853–1866.

Jacobsen, C., Let, M. B., Nielsen, N. S., & Meyer, A. S. (**2008**). Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, *19*(2), 76–93.

Jeanson, S., Floury, J., Gagnaire, V., Lortal, S., & Thierry, A. (**2015**). Bacterial Colonies in Solid Media and Foods: A Review on Their Growth and Interactions with the Micro-Environment. *Frontiers in Microbiology*, *6*(December), 1284(1-20).

Jongenburger, I., Bassett, J., Jackson, T., Zwietering, M. H., & Jewell, K. (**2012**). Impact of microbial distributions on food safety I. Factors influencing microbial distributions and modelling aspects. *Food Control*, *26*(2), 601–609.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (**1994**). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, *76*, 626–631.

Kamal-Eldin, A. (**2003**). *Lipid Oxidation Pathways*. (A. Press, Ed.). Champaign, Illinois.

Kancheva, V. D., & Kasaikina, O. T. (**2012**). Lipid Oxidation in Homogeneous and Micro-Heterogeneous Media in Presence of Prooxidants, Antioxidants and Surfactants. In A. Catala (Ed.), *Lipid peroxidation* (pp. 32–62). InTech.

Karawita, R., Siriwardhana, N., Lee, K. W., Heo, M. S., Yeo, I. K., Lee, Y. D., & Jeon, Y. J. (**2005**). Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *European Food Research and Technology*, *220*(3–4), 363–371.

Kellerby, S. S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2006**). Role of proteins in oil-in-water emulsions on the stability of lipid hydroperoxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(20), 7879–7884.

Kerr, J. A. (**1966**). Bond Dissociation Energies by Kinetic Methods. *Chemical Reviews*, *66*(5), 465–500.

Kiralan, S. S., Dogu-Baykut, E., Kittipongpittaya, K., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2014**). Increased antioxidant efficacy of tocopherols by surfactant solubilization in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(43), 10561–10566.

Kishk, Y. F. M., & Al-Sayed, H. M. A. (**2007**). Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT - Food Science and Technology*, *40*, 270–277.

Kohda, C., Yanagawa, Y., & Shimamura, T. (**2008**). Epigallocatechin gallate inhibits intracellular survival of *Listeria monocytogenes* in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *365*(2), 310–315.

Kumar, P., Khouryieh, H., Williams, K., & Conte, E. (**2016**). Effect of xanthan/enzyme-modified guar gum mixtures on the stability of whey protein isolate stabilized fish oil-in-water emulsions. *Food*

Chemistry, *212*, 332–340.

Labuza, T. P., & Dugan Jr, L. R. (**1971**). Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, *2*(3), 355–405.

Laguerre, M., Bayrasy, C., Panya, A., Weiss, J., McClements, D. J., Lecomte, J., … Villeneuve, P. (**2015**). What Makes Good Antioxidants in Lipid-Based Systems? The Next Theories Beyond the Polar Paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(2), 183–201.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (**2007**). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, *46*(5), 244–282.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (**2014**). The physico-chemical basis of phenolic antioxidant activity. *Lipid Technology*, *26*(3), 59–62.

Laguerre, M., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M. C., Baréa, B., Weiss, J., … Villeneuve, P. (**2009**). Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: the cutoff theory behind the polar paradox. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(23), 11335–11342.

Laguerre, M., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M. C., Baréa, B., Weiss, J., … Villeneuve, P. (**2010**). Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of "phenolipids" in emulsion: A parabolic effect of the chain length of rosmarinate esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(5), 2869–2876.

Lambert, R. J. W. and Pearson, J. (**2000**). Susceptibility testing : Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, *88*, 784–790.

Lambert, R. J. W., & Bidlas, E. (**2007**). An investigation of the Gamma hypothesis: A predictive modelling study of the effect of combined inhibitors (salt, pH and weak acids) on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Food Microbiology*, *115*(1), 12–28.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (**2001**). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(3), 453–462.

Lambert, R. J. W., & Stratford, M. (**1999**). Weak-acid preservatives: Modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, *86*(1), 157–164.

Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C. M., Guyonnet, J. P., Mafart, P., & Thuault, D. (**2002**). Modelling the growth kinetics of Listeria as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int J Food Microbiol*, *73*(2–3), 219–237.

Lee, O. H., & Lee, B. Y. (**2010**). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, *101*(10), 3751–3754.

Lee, S. J., Choi, S. J., Li, Y., Decker, E. A., & McClements, D. J. (**2011**). Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: Comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(1), 415–427.

Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (**2011**). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, *125*(2), 288–306.

Lethuaut, L., Métro, F., & Genot, C. (**2002**). Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *79*(5), 425–430.

Leyral, G., & Vierling, E. (**2007**). *Microbiologie et toxicologies des aliments. Hygiène et sécurité alimentaires*. (4è édition). Rueil Malmaison, France: Doin éditeurs.

Li, W., Chen, H., He, Z., Han, C., Liu, S., & Li, Y. (**2015**). Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. *LWT - Food Science and Technology, 62*, 39-47.

Lin, C. Z., Zhu, C. C., Hu, M., Wu, A. Z., Bairu, Z. D., & Kangsa, S. Q. (**2014**). Structure-activity relationships of antioxidant activity in vitro about flavonoids isolated from *Pyrethrum tatsienense*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *3*(3), 123–127.

Liu, L., Gao, Y., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2016**). Role of continuous phase protein, (-)-epigallocatechin-3-gallate and carrier oil on β-carotene degradation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *210*, 242–248.

Liu, Z., & Wu, D. (**2009**). How many peroxyl radicals can be scavenged by hydroxyl-substituted Schiff bases in the oxidation of linoleic acid ? *Journal of Physical Organic Chemistry*, *22*, 308–312.

López-Martínez, A., & Rocha-Uribe, A. (**2018**). Antioxidant Hydrophobicity and Emulsifier Type Influences the Partitioning of Antioxidants in the Interface Improving Oxidative Stability in O/W Emulsions Rich in n-3 Fatty Acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *120*(1), 1700277(1-10).

Losada-Barreiro, S., Sanchez-Paz, V., & Bravo-Diaz, C. (**2013**). Effects of emulsifier hydrophile – lipophile balance and emulsifier concentration on the distributions of gallic acid , propyl gallate , and a-tocopherol in corn oil emulsions. *Journal of Colloid And Interface Science*, *389*, 1–9.

Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (**2011**). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of Food Science*, *76*(6).

Lu, H. J., Breidt, F., Perez-Diaz, I. M., Osborne, J. A., Pérez-Diaz, I. M., & Osborne, J. A. (**2011**). Antimicrobial Effects of Weak Acids on the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Anaerobic Conditions. *Journal of Food Protection*, *74*(6), 893–898.

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Sarni-Manchado, P. (**2006**). Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition. In P. Sarni-Manchado & V. Cheynier (Eds.), *Les polyphénols en agro-alimentaire* (Tec&Doc). Paris, France: Lavoisier.

Mahmood, M. E., & Al-koofee, D. a F. (**2013**). Effect of Temperature Changes on Critical Micelle Concentration for Tween Series Surfactant. *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry*, *13*(4), 1–7.

Maillard, M. N., Soum, M. H., Boivin, P., & Berset, C. (**1996**). Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. *LWT - Food Science and Technology*, *29*(3), 238–244.

Makwana, S., Choudhary, R., Haddock, J., & Kohli, P. (**2015**). In-vitro antibacterial activity of plant based phenolic compounds for food safety and preservation. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(2), 935–939.

Malterud, K. E., & Rydland, K. M. (**2000**). Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(11), 5576–5580.

Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C. B., … Narbad, A. (**2007**). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2056–2064.

Maqsood, S., & Benjakul, S. (**2010**). Comparative studies of four different phenolic compounds on in

vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry*, *119*(1), 123–132.

Masuda, T., Inaba, Y., & Takeda, Y. (**2001**). Antioxidant Mechanism of Carnosic Acid: Structural Identification of Two Oxidation Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 5560–5565.

Maury, M. M., Tsai, Y. H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., … Lecuit, M. (**2016**). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics*, *48*(3), 308–313.

McClements, D. J. (**2017**). Lipid-Based Emulsions and Emulsifiers. In C. C. Akoh (Ed.), *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (pp. 73–108). Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group.

Medina, I., Lois, S., Alcantara, D., Lucas, R., & Morales, J. C. (**2009**). Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(20), 9773–9779.

Medina, I., Undeland, I., Larsson, K., Storrø, I., Rustad, T., Jacobsen, C., … Gallardo, J. M. (**2012**). Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review. *Food Chemistry*, *131*(3), 730–740.

Mei, L., McClements, D. J., Wu, J., & Decker, E. A. (**1998**). Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl. *Food Chemistry*, *61*(3), 307–312.

Meldrum, R. J., Brocklehurst, T. F., Wilson, D. R., & Wilson, P. D. G. (**2003**). The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10°C. *Food Microbiology*, *20*(1), 97–103.

Merkl, R., Hrádková, I., Filip, V., & Šmidrkal, J. (**2010**). Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech Journal of Food Sciences*, *28*(4), 275–279.

Mertens, L., Geeraerd, A. H., Dang, T. D. T., Vermeulen, A., Serneels, K., Van Derlinden, E., … Van Impe, J. F. (**2009**). Design of an experimental viscoelastic food model system for studying *Zygosaccharomyces bailii* spoilage in acidic sauces. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(22), 7060–7069.

Mescle, J. F., & Zucca, J. (**1996**). Le comportement des microoganismes dans les aliments. In C. M. Bourgeois, J. F. Mescle, & J. Zucca (Eds.), *Microbiologie alimentaire. Tome 1 - Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. (Tec&Doc). Paris, France: Lavoisier.

Milkowski, A., Garg, H. K., Coughlin, J. R., & Bryan, N. S. (**2010**). Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, *22*(2), 110–119.

Min, B., & Ahn, D. (**2005**). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *Food Science and Biotechnology*, *14*(1), 152–163.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (**2006**). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, *40*(2), 223–231.

Morey, A., Bowers, J. W. J., Bauermeister, L. J., Singh, M., Huang, T. S., & Mckee, S. R. (**2014**). Effect of salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, shelf life, meat quality, and consumer acceptability of beef frankfurters. *Journal of Food Science*, *79*(1), 54–60.

Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., & Tawata, S. (**1987**). Antibacterial activity and mode of action of plant

flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, *26*(8), 2231–2234.

Morris, E. R., Cutler, A. N., Ross-Murphy, S. B., Rees, D. A., & Price, J. (**1981**). Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers*, *1*(1), 5–21.

Murphy Cowan, M. (**1999**). Plant Products as Antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(4), 564–582.

Naïtali, M., & Dubois-Brissonnet, F. (**2017**). Développement des microorganismes pathogènes dans les aliments. In M. Naïtali, L. Guillier, & F. Dubois-Brissonnet (Eds.), *Risques microbiologiques alimentaires* (Tec&Doc, pp. 37–86). Paris, France: Lavoisier.

Naïtali, M., Dubois-Brissonnet, F., Cuvelier, G., & Bellon-Fontaine, M. N. (**2009**). Effects of pH and oil-in-water emulsions on growth and physicochemical cell surface properties of Listeria monocytogenes: Impact on tolerance to the bactericidal activity of disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, *130*(2), 101–107.

Nakai, S. A., & Siebert, K. J. (**2003**). Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(3), 249–255.

Nazer, A. I., Kobilinsky, A., Tholozan, J. L., & Dubois-Brissonnet, F. (**2005**). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: A synergistic effect? *Food Microbiology*, *22*(5), 391–398.

Neff, W. E., & El-Agaimy, M. (**1996**). Effect of linoleic acid position in triacylglycerols on their oxidative stability. *LWT - Food Science and Technology*, *29*(8), 772–775.

Ng, T. B., Ling, J. M. L., Wang, Z. T., Cai, J. N., & Xu, G. J. (**1996**). Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. *General Pharmacology*, *27*(7), 1237–1240.

Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K., & Fukushima, M. (**1987**). Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*, *51*(1), 139–143.

Nuchi, C. D., Hernandez, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2002**). Ability of Lipid Hydroperoxides To Partition into Surfactant Micelles and Alter Lipid Oxidation Rates in Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5445–5449.

Nuchi, C. D., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2001**). Impact of Tween 20 Hydroperoxides and Iron on the Oxidation of Methyl Linoleate and Salmon Oil Dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4912–4916.

O'Keefe, S. F., & Sarnoski, P. J. (**2017**). Nomenclature and Classification of Lipids. In C. C. Akoh (Ed.), *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (Fourth edi, pp. 3–36). Boca Raton: Taylor & Francis Group.

Oehlke, K., Heins, A., Stöckmann, H., & Schwarz, K. (**2010**). Impact of emulsifier microenvironments on acid-base equilibrium and activity of antioxidants. *Food Chemistry*, *118*(1), 48–55.

Özçelik, B., Kartal, M., & Orhan, I. (**2011**). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, *49*(4), 396–402.

Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (**2013**). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, *51*, 954–970.

Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medrano, A., Goñi, M. G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (**2018**). Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, *66*(1), 25–31.

Pamer, E. G. (**2004**). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology*, *4*(10), 812–823.

Panya, A., Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecompte, J., Villeneuve, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2012**). An Investigation of the Versatile Antioxidant Mechanisms of Action of Rosmarinate Alkyl Esters in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 2692–2700.

Parker, M. L., Brocklehurst, T. F., Gunning, P. A., Coleman, H. P., & Robins, M. M. (**1995**). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: I- Methods for investigating the form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*, *78*(6), 601–608.

Parker, M. L., Gunning, P. A., Macedo, A. C., Malcata, F. X., & Brocklehurst, T. F. (**1998**). The microstructure and distribution of micro-organisms within mature Serra cheese. *Journal of Applied Microbiology*, *84*(4), 523–530.

Penicaud, C., Broyart, B., Peyron, S., Gontard, N., & Guillard, V. (**2011**). Mechanistic model to couple oxygen transfer with ascorbic acid oxidation kinetics in model solid food. *Journal of Food Engineering*, *104*(1), 96–104.

Pernin, A., Dubois-Brissonnet, F., Roux, S., Masson, M., Bosc, V., & Maillard, M. N. (**2018**). Phenolic compounds can delay the oxidation of polyunsaturated fatty acids and the growth of *Listeria monocytogenes* : structure-activity relationships. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*, 5401–5408.

Pernin, A., Guillier, L., & Dubois-Brissonnet, F. (**2019**). Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiology, 80*, 18-24.

Peyrat-Maillard, M. N., Bonnely, S., & Berset, C. (**2000**). Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, *51*(4), 709–716.

Peyrat-Maillard, M. N., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (**2003**). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2′-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *80*(10), 1007–1012.

Phillips, G. O., & Williams, P. A. (**2011**). Introduction to food proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of food proteins* (Food Scien, pp. 1–12). Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing.

Pichot, R., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (**2010**). O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: The effect of surfactant type and concentration. *Journal of Colloid and Interface Science*, *352*(1), 128–135.

Pietta, P. G. (**2000**). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63*(7), 1035–1042.

Piveteau, P. (**2017**). *Listeria monocytogenes*. In M. Naïtali, L. Guillier, & F. Dubois-Brissonnet (Eds.), *Risques microbiologiques alimentaires* (Tec&Doc, pp. 481–502). Paris, France: Lavoisier.

Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., & Jerala, R. (**2003**). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *306*(2), 530–536.

Pokorny, J. (**2003**). Problème de stabilité des produits alimentaires liés à la présence des lipides. In

Lipides et corps gras alimentaires (Tec&Doc, pp. 147–187). Paris, France: Lavoisier.

Pol, I. E., & Smid, E. J. (**1999**). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, *29*(3), 166–170.

Porter, W. L. (**1980**). Recent trends in food applications of antioxidants. In M. G. Simic & M. Karel (Eds.), *Autooxidation in Food and Biological Systems* (pp. 295–365). New York, US: Plenum Press.

Porto-Fett, A. C. S., Campano, S. G., Smith, J. L., Oser, A., Shoyer, B., Call, J. E., & Luchansky, J. B. (**2010**). Control of *Listeria monocytogenes* on commercially-produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the Sprayed Lethality in Container (SLIC®) delivery method. *Meat Science*, *85*(2), 312–318.

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., & et al. (**2010**). *Microbiologie* (3ème éditi). Bruxelles, Belgique: De Boeck.

Presser, K. A., Ratkowski, D. A., Ross, T., Ratkowsky, D. A., & Ross, T. (**1997**). Modelling the Growth Rate of *Escherichia coli* as a Function of pH and Lactic Acid Concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(6), 2355–2360.

Qiu, X., Jacobsen, C., Villeneuve, P., Durand, E., & Sørensen, A. D. M. (**2017**). Effects of Different Lipophilized Ferulate Esters in Fish Oil-Enriched Milk: Partitioning, Interaction, Protein, and Lipid Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(43), 9496–9505.

Raccach, M. (**1984**). The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: a review. *Journal of Food Safety*, *6*(3), 141–170. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4565.1984.tb00479.x/abstract

Rajkovic, A., Smigic, N., & Devlieghere, F. (**2010**). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, *141*(SUPPL.), S29–S42.

Ramos-Nino, M. E., Clifford, M. N., & Adams, M. R. (**1996**). Quantitative structure activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, *80*(3), 303–310.

Ratkowsky, D. A., Olley, J., Mcmeekin, T. A., & Ball3, A. A. (**1982**). Relationship Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures. *Journal of Bacteriology*, *149*(1), 1–5.

Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (**2010**). Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *110*(5), 614–619.

Raudsepp, P., Brüggemann, D. A., & Andersen, M. L. (**2014**). Evidence for transfer of radicals between oil-in-water emulsion droplets as detected by the probe (E,E)-3,5-Bis(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, BODIPY665/676. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(51), 12428–12435.

Rauha, J.-P. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., … Kahkonen, M. (**2000**). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavoniods and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, *56*(1), 3–12.

Rayner, M., Timgren, A., Sjöö, M., & Dejmek, P. (**2012**). Quinoa starch granules: A candidate for stabilising food-grade Pickering emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*(9), 1841–1847.

Reiners, J., Nicklaus, S., & Guichard, E. (**2000**). Interactions between b-lactoglobulin and flavour

compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol. *Le Lait*, *80*(3), 347–360.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (**1996**). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(7), 933–956.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (**1997**). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, *2*(4), 152–159.

Richard-Forget, F., Gauillard, F., Hugues, M., Jean-Marc, T., Boivin, P., & Nicolas, J. (**1995**). Inhibition of Horse Bean and Germinated Barley Lipoxygenases by Some Phenolic Compounds. *Journal of Food Science*, *60*(6), 1325–1329.

Richards, M. P., Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2002**). Ability of surfactant micelles to alter the partitioning of phenolic antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(5), 1254–1259.

Roche, M., Dufour, C., Mora, N., & Dangles, O. (**2005**). Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *3*(3), 423–430.

Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J., Vázquez-Sánchez, D., & López Cabo, M. (**2018**). Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. *Foods*, *7*(6), 85.

Rodríguez Vaquero, M. J., Alberto, M. R., & Manca de Nadra, M. C. (**2007**). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, *18*(5), 587–593.

Roman, O. (**2012**). *Mesure et prédiction de la réactivité des lipides au cours du chauffage d'huiles végétales à haute température*. AgroParisTech - L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. Thèse de doctorat.

Roman, O., Heyd, B., Broyart, B., Castillo, R., & Maillard, M. N. (**2013**). Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *52*(1), 49–59.

Romsted, L. S., & Bravo-Díaz, C. (**2013**). Modeling chemical reactivity in emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *18*, 3–14.

Rösch, D., Bergmann, M., Knorr, D., & Kroh, L. W. (**2003**). Structure−Antioxidant Efficiency Relationships of Phenolic Compounds and Their Contribution to the Antioxidant Activity of Sea Buckthorn Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 4233–4239.

Ross, T., & Dalgaard, P. (**2004**). Secondary models. In R. C. McKellar & X. Lu (Eds.), *Modeling microbial responses in Food* (p. 343). CRC.

Rosso, L., Lobry, J. R., & Bajard, S. (**1995**). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and Environmental*, *61*(2), 610–616.

Saavedra, M., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R., Rosa, E., & Simões, M. (**2010**). Antimicrobial Activity of Phenolics and Glucosinolate Hydrolysis Products and their Synergy with Streptomycin against Pathogenic Bacteria. *Medicinal Chemistry*, *6*(3), 174–183.

Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., & Yamamoto, T. (**1989**). Antibacterial Substances in Japanese Green Tea Extract Against Streptococcus Mutans, a Cariogenic Bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*, *53*(9), 2307–2311.

Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., & Gänzle, M. G. (**2011**). Structure-function relationships of

the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(5), 1176–1184.

Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., & Higuti, T. (**2000**). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, *72*(3), 483–488.

Schaich, K. M. (**2017**). Rethinking Lipid Oxidation. In C. C. Akoh (Ed.), *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (Fourth edi, pp. 479–498). Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group.

Scherer, R., & Godoy, H. T. (**2009**). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, *112*(3), 654–658.

Sengupta, T., & Damodaran, S. (**1998**). A new methodology for studying protein adsorption at oil-water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, *206*(2), 407–415.

Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (**1992**). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *32*, 67–103.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (**2015**). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *18*, 757–781.

Shimada, K., Okada, H., Matsuo, K., & Yoshioka, S. (**1996**). Involvement of Chelating Action and Viscosity in the Antioxidative Effect of Xanthan in an Oil/Water Emulsion. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *60*(1), 125–127.

Silva, M. M., & Lidon, F. C. (**2016**). Food preservatives - An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *28*(6), 366–373.

Silva, R., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., & Bravo-Diaz, C. (**2017**). Partitioning and antioxidative effect of protocatechuates in soybean oil emulsions: Relevance of emulsifier concentration. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *119*, 1600274.

Singh, H. (**2011**). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, *25*(8), 1938–1944.

Sofos, J. N., Pierson, M. D., Blocher, J. C., & Busta, F. F. (**1986**). Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*, *3*(1), 1–17.

Song, X., Pei, Y., Qiao, M., Ma, F., Ren, H., & Zhao, Q. (**2015**). Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. *Food Hydrocolloids*, *45*, 256–263.

Sørensen, A. D. M., Baron, C. P., Let, M. B., Brüggemann, D. A., Pedersen, L. R. L., & Jacobsen, C. (**2007**). Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Oxidation linked to changes in protein composition at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(5), 1781–1789.

Sørensen, A. D. M., Haahr, A. M., Becker, E. M., Skibsted, L. H., Bergenståhl, B., Nilsson, L., & Jacobsen, C. (**2008**). Interactions between iron, phenolic compounds, emulsifiers, and pH in omega-3-enriched oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(5), 1740–1750.

Sørensen, A. D. M., Villeneuve, P., & Jacobsen, C. (**2017**). Alkyl caffeates as antioxidants in O/W emulsions: Impact of emulsifier type and endogenous tocopherols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *119*(6), 1–14.

Sorrentino, E., Tremonte, P., Succi, M., Iorizzo, M., Pannella, G., Lombardi, S. J., … Coppola, R. (**2018**). Detection of Antilisterial Activity of 3-Phenyllactic Acid Using *Listeria innocua* as a

Model. *Frontiers in Microbiology*, *9*(June), 1–9.

Stephen, A. M., & Churms, S. C. (**2006**). Introduction. In A. M. Stephen, G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Food Polysaccharides and Their Applications* (Second edi, pp. 1–24). Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group.

Stöckmann, H., Schwarz, K., & Huynh-Ba, T. (**2000**). Influence of various emulsifiers on the partitioning and antioxidant activity of hydroxybenzoic acids and their derivatives in oil-in-water emulsions. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *77*(5), 535–542.

Sznitowska, M., Janicki, S., Dabrowska, E. A., & Gajewska, M. (**2002**). Physicochemical screening of antimicrobial agents as potential preservatives for submicron emulsions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *15*, 489–495.

Takahashi, H., Kashimura, M., Koiso, H., Kuda, T., & Kimura, B. (**2013**). Use of ferulic acid as a novel candidate of growth inhibiting agent against Listeria monocytogenes in ready-to-eat food. *Food Control, 33*, 244-248.

Takahashi, H., Takada, K., Tsuchiya, T., Miya, S., & Kuda, T. (**2015a**). *Listeria monocytogenes* develops no resistance to ferulic acid after exposure to low concentrations. *Food Control, 47*, 560-563.

Takahashi, H., Takahashi, T., Miya, S., Yokoyama, H., & Kuda, T. (**2015b**). Growth inhibition effect of ferulic acid and glycine sodium acetate on *Listeria monocytogenes* in coleslaw and egg salad. *Food Control, 57*, 105-109.

Tappel, A. L. (**1972**). Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *203*(1), 12–28.

Tavadyan, L., Khachoyan, A., Martoyan, G., & Kamal-Eldin, A. (**2007**). Numerical revelation of the kinetic significance of individual steps in the reaction mechanism of methyl linoleate peroxidation inhibited by α-tocopherol. *Chemistry and Physics of Lipids*, *147*(1), 30–45.

Terjung, N., Myriam, L., Gibis, M., Löffler, M., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. (**2012**). Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food and Function*, *3*(3), 290–301.

Tikekar, R. V., Johnson, A., & Nitin, N. (**2011**). Real-time measurement of oxygen transport across an oil-water emulsion interface. *Journal of Food Engineering*, *103*(1), 14–20.

Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (**2000**). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(5), 1473–1478.

Tornuk, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdic, O., Bayram, O., & Yetim, H. (**2011**). Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*, *148*, 30–35.

Trinh Thi Thanh, N., Bensadi, K., Dumas, E., Gharsallaoui, A., Gouin, S., Ly-Chatain, M. H., … Oulahal, N. (**2013**). Comparison of the antibacterial activity of Vietnamese Cinnamon essential oil and its chemotype (trans-cinnamaldehyde) in tryptone soya broth (TSB) and in an oil in water emulsion containing TSB : consequences for its use in food preservation. *Food Science, Engineering and Technology*, *60*, 482–487.

Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (**2005**). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, *18*, 98–112.

Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., … Iinuma, M. (**1996**). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, *50*(1), 27–34.

UE. (**2012**). Réglement d'exécution (UE) n°872/2012 de la commission du 1er octobre 2012 portant adoption de la liste de substances aromatisantes prévues par le réglement (CE) n° 2232/96 du Parlement européen et du conseil. *JO N° L 267 Du 02 Octobre 2012*.

Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., & Węgrzyn, G. (**2007**). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, *62*(2), 132–135.

Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (**2002**). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(4), 1561–1568.

Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (**1999**). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(10), 4606–4610.

Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (**1996**). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(3), 331–342.

van Aken, G. A. (**2006**). Polysaccharides in Food Emulsions. In A. M. Stephen, G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Food Polysaccharides and Their Applications* (Second edi, pp. 521–540). Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group.

Van Cauteren, D., Le Strat, Y., Sommen, C., Bruyand, M., Tourdjman, M., Jourdan-Da Silva, N., … Desenclos, J.-C. (**2017**). Estimated Annual Numbers of Foodborne Pathogen – Associated Illnesses, Hospitalizations, and Deaths, France, 2008-2013. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(9), 1486–1492.

Van Langendonck, N., Bottreau, E., Bailly, S., Tabouret, M., Marly, J., Pardon, P., & Velge, P. (**1998**). Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Applied Microbiology*, *85*, 337–346.

Van Tassel, M. L., Takhar, S. R., & Miller, M. J. (**2015**). Use of a miniature laboratory fresh cheese model for investigating antimicrobial activities. *Journal of Dairy Science, 98*, 8515-8524.

Verleyen, T., Kamal-Eldin, A., Dobarganes, C., Verhe, R., Dewettinck, K., & Huyghebaert, A. (**2001a**). Modeling of α-tocopherol loss and oxidation products formed during thermoxidation in triolein and tripalmitin mixtures. *Lipids*, *36*(7), 719–726.

Verleyen, T., Verhe, R., Huyghebaert, A., Dewettinck, K., & De Greyt, W. (**2001b**). Identification of α-tocopherol oxidation products in triolein at elevated temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(3), 1508–1511.

Verma, R. S., Pandey, V., Padalia, R. C., Saikia, D., & Krishna, B. (**2011**). Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Aqueous Distillate Volatiles of Indian Peppermint (*Mentha piperita*) and Spearmint (*Mentha spicata*). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, *17*(3), 258–267.

Vermuë, M., Sikkema, J., Verheul, A., Bakker, R., & Tramper, J. (**1993**). Toxicity of homologous series of organic solvents for the Gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* Sp. and the Gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Sp. *Biotechnology and Bioengineering*, *42*(6), 747–758.

Wang, L., Gao, Y., Li, J., Subirade, M., Song, Y., & Liang, L. (**2016**). Effect of resveratrol or ascorbic acid on the stability of α-tocopherol in O/W emulsions stabilized by whey protein isolate:

Simultaneous encapsulation of the vitamin and the protective antioxidant. *Food Chemistry*, *196*, 466–474.

Waraho, T., Mcclements, D. J., & Decker, E. A. (**2011**). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science and Technology*, *22*(1), 3–13.

Weber, F. J., & de Bont, J. A. M. (**1996**). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1286*, 225–245.

Weiss, D. S. (**2004**). Bacterial cell division and the septal ring. *Molecular Microbiology*, *54*(3), 588–597.

Weiss, J., Loeffler, M., & Terjung, N. (**2015**). The antimicrobial paradox : why preservatives lose activity in foods. *Current Opinion in Food Science*, *4*(May), 69–75.

Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., & Toivonen, P. (**2003**). Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, *20*(3), 305–311.

Wettasinghe, M., & Shahidi, F. (**2002**). Iron (II) chelation activity of extracts of borage and evening primrose meals. *Food Research International*, *35*(1), 65–71.

Wijeratne, S. S. K., Abou-Zaid, M. M., & Shahidi, F. (**2006**). Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(2), 312–318.

Wijesundera, C., Ceccato, C., Watkins, P., Fagan, P., Fraser, B., Thienthong, N., & Perlmutter, P. (**2008**). Docosahexaenoic acid is more stable to oxidation when located at the sn-2 position of triacylglycerol compared to sn-1(3). *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *85*(6), 543–548.

Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., & Morris, V. (**2004**). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, *108–109*, 63–71.

Wilson, P. D. G. (**2002**). Modeling microbial growth in structured foods : Towards a unified approach Modelling microbial growth in structured foods : towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, *73*(April), 275–289.

Wu, J. E., Lin, J., & Zhong, Q. (**2014**). Physical and antimicrobial characteristics of thyme oil emulsified with soluble soybean polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, *39*, 144–150.

Yam, T. S., Shah, S., & Hamilton-Miller, J. M. T. (**1997**). Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiology Letters*, *152*(1), 169–174.

Yanishlieva, N. V., Aitzetmüller, K., & Raneva, V. (**1998**). β-Carotene and lipid oxidation. *Lipid - Fett*, *100*(10), 444–462.

Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (**1999**). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, *64*(1), 59–66.

Zhou, L., & Elias, R. J. (**2012**). Factors influencing the antioxidant and pro-oxidant activity of polyphenols in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(11), 2906–2915.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van 't Riet, K. (**1990**). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(6), 1875–1881.

Zwietering, M. H., Wijtzes, T., de Wit, J. C. C., & Van'T Riet, K. (**1992**). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, *55*(12), 973–979.

Titre : Action antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques dans des milieux modèles et des émulsions riches en lipides insaturés

Mots clés : composés phénoliques, antioxydant, antimicrobien, émulsion, oxydation des lipides, Listeria monocytogenes

Résumé :
Les composés phénoliques pourraient être de bons candidats pour assurer la qualité et la sécurité des produits périssables tels que les aliments prêts-à-consommer. Très répandus dans les plantes et les co-produits agro-industriels, ils peuvent limiter l'oxydation de lipides insaturés d'intérêt nutritionnel (omega-3, dont DHA et EPA) et le développement de bactéries pathogènes alimentaires telles que *Listeria monocytogenes*.
L'objectif de cette thèse est d'évaluer la double activité antioxydante et antimicrobienne de ces composés phénoliques dans des milieux alimentaires complexes et de mieux comprendre les mécanismes d'action associés.
L'étude en milieux modèles a tout d'abord permis de mettre en évidence des relations structure-activités et de décrypter certains mécanismes d'action mettant en jeu des paramètres tels que le nombre et l'environnement chimique des groupements phénoliques, le logP, les formes dissociées / non dissociées des acides phénoliques. Les performances de trois composés sélectionnés (eugénol, acide férulique et α-tocophérol) ont ensuite été évaluées dans des milieux alimentaires complexes plus réalistes : des émulsions h/e composées d'huile de poisson, d'une phase aqueuse et de protéines de lactosérum ou Tween 80 en tant qu'émulsifiant. L'acide férulique ne présente aucune activité antioxydante mais peut inhiber le développement de *L. monocytogenes.* En revanche, l'eugénol et l'α-tocophérol sont de bons antioxydants dans les émulsions à base de protéines de lactosérum alors qu'ils n'y sont pas antimicrobiens. Quelques mécanismes d'action sont proposés pour expliquer ces comportements.

Title : Antioxidant and antimicrobial action of some phenolic compounds in model media and in emulsions rich in unsaturated lipids

Key words : phenolic compounds, antioxidant, antimicrobial, emulsion, lipid oxidation, Listeria monocytogenes

Abstract:
Phenolic compounds appear to be good candidates for ensuring the quality and safety of several perishable products like ready-to-eat food. Widely found in plants and byproducts from agro-industries, they offer a potential solution to limit the oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids (*e.g.* DHA and EPA) and the growth of foodborne pathogens such as *Listeria monocytogenes*.
The aim of this PhD is to evaluate dual antioxidant and antimicrobial activity in complex food media and to better understand the associated mechanisms of action.
First experiments carried out with a series of phenolic compounds in simple model media confirmed this dual efficiency.
Interesting structure/activity relationships were highlighted and some mechanisms of action were decrypted, involving parameters like number and chemical environment of phenolic groups, logP, dissociated/undissociated forms of phenolic acids. The performances of three selected phenolic compounds, *i.e.* eugenol, ferulic acid and α-tocopherol (added alone or as a mixture), were evaluated in more realistic complex food media: o/w emulsions composed of fish oil, aqueous phase and whey proteins or Tween 80 as emulsifiers. Ferulic acid shows no antioxidant activity but can inhibit the development of *L. monocytogenes*. In contrast, eugenol and α-tocopherol are good antioxidants but not antimicrobials in emulsions formulated with whey proteins. Mechanisms of action are proposed to explain these behaviors.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France