Impact de la fermentation sur les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices du cacao

Guehi-François Gbogbri

▶ **To cite this version:**

Guehi-François Gbogbri. Impact de la fermentation sur les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices du cacao. Alimentation et Nutrition. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTG005 . tel-02481217

HAL Id: tel-02481217
https://theses.hal.science/tel-02481217

Submitted on 17 Feb 2020

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biochimie et physico-chimie alimentaires

École doctorale G.A.I.A

Unité de recherche QUALISUD

IMPACT DE LA FERMENTATION SUR LES PROPRIETES ANTIOXYDANTES, ANTI-INFLAMMATOIRES ET IMMUNOMODULATRICES DU CACAO

Présentée par Guehi-Francois GBOGBRI

Le 28/02/2019

Sous la direction de Alain Michel et Patrick Poucheret

Devant le jury composé de

Patrick POUCHERET, Maître de conférences, université de Montpellier	Co-Directeur de Thèse
Françoise FONS, Professeur, université de Montpellier	Examinateur
Thomas PETIT, Professeur, université de la réunion	Rapporteur
Sylvie BERCION, Maître de conférences, université des Antilles	Rapporteur
Alain MICHEL, Professeur, université de Montpellier	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Résumé

La consommation régulière du chocolat est associée à des effets bénéfiques sur la santé, en particulier dans les pathologies associées à un syndrome inflammatoire chronique. Cette inflammation met en jeu le système immunitaire et les polyphénols du cacao semblent jouer un rôle sur ces effets, via la voie de NF-κb. Les procédés de transformation du cacao et notamment la fermentation dégradent les polyphénols contenus dans les fèves. En effet, la fermentation à elle seule, diminue de 90% la teneur des polyphénols initialement présents. Il est donc important de connaitre son impact sur la teneur et / ou la composition des polyphénols afin ensuite de pouvoir les associer aux activités antiinflammatoires et immunomodulatrices du cacao. Un lot de fèves de cacao de variété Forastero a été divisé en deux lots, le premier a été fermenté l'autre non. Après délipidation de la poudre de cacao puis extraction des polyphénols, la teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les composés chimiques présents dans les extraits de cacao ont été identifiés par UPLC-MS/UV. Les flavanols majoritaires identifiés ont été quantifiés par LC/MSMS. Les activités antioxydantes du cacao ont été évaluées avec le test DPPH et ORAC. Pour déterminer les activités inflammatoires, les teneurs en tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) et oxyde nitrique (NO) ont été déterminées. La viabilité cellulaire a été faite afin de d'évaluer la cytotoxicité des extraits de cacao sur les cellules J774A.1. Cette étude a montré que la fermentation a diminué la teneur en polyphénols et établi une corrélation entre cette teneur en composés phénoliques et les activités antioxydantes des extraits de cacao. Les extraits de cacao fermenté ou non ont stimulé la production de TNF-α, cependant l'étude sur les activités inflammatoires mérite d'être approfondie car le cacao fermenté ou non n'a eu aucun effet sur le NO produit par les cellules J774A.1. Par ailleurs, le cacao fermenté ou

non n’a pas eu d’effet cytoxique sur les cellules J 774A.1. La fermentation a influé sur les activités inflammatoires et immunomodulatrcices du cacao selon le type de marqueurs en diminuant la production de TNF-α.

Abstract

Regular consumption of chocolate is associated with beneficial effects on health, particularly in pathologies associated with a chronic inflammatory syndrome. This inflammation involves the immune system and cocoa polyphenols appear to play a role in these effects via the NF-κb pathway. Cocoa processing processes and especially fermentation degrade the polyphenols contained in the beans. In fact, the fermentation alone reduces the content of the polyphenols initially present by 90%. It is therefore important to know its impact on the content and / or the composition of polyphenols in order to be able to associate them with the anti-inflammatory and immunomodulatory activities of cocoa. A batch of cocoa beans of Forastero variety was divided into two, the first one fermented and the other is not. After delipidation of the cocoa powder and extraction of the polyphenols, the total polyphenol content of the extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method. The chemical compounds present in the cocoa extracts have been identified by UPLC-MS / UV. The majority flavanols identified were quantified by LC / MSMS. The antioxidant activities of cocoa were evaluated with the DPPH and ORAC test. To determine inflammatory activities, the levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and nitric oxide (NO) were determined. Cell viability was done to evaluate the cytotoxicity of cocoa extracts on J774A.1 cells. This study showed that fermentation decreased the polyphenol content and correlated this phenol content with the antioxidant activities of the cocoa extracts. The fermented and unfermented cocoa extracts stimulated the production of TNF-α, however the study on inflammatory activities deserves to be investigated because the fermented or unfermented cocoa had no effect on the NO produced by the J774A cells. 1. In addition, the fermented or unfermented cocoa did not have a cytotoxic effect on J 774A.1 cells. Fermentation has influenced the inflammatory and immunomodulatory activities of cocoa, depending on the type of markers, by decreasing the production of TNF-α.

Remerciements

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant en grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Merci à Monsieur Alain Michel, Professeur des universités, mon Directeur de thèse d'avoir accepté de m'encadrer pendant ces trois années. Ces conseils ont été pour moi des substances essentielles durant ces trois années.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Monsieur Patrick Poucheret, HDR, le Chef de notre équipe, un Homme au grand cœur qui fut pour moi plus qu'un Co-Directeur, Mon Mentor. Merci d'avoir accepté de me recevoir dans votre équipe. Monsieur Poucheret resta attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Ses compétences, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Je ne l'oublierai jamais. Même quand les choses ne se passaient pas toujours bien, il m'a soutenu. Il a été et restera le moteur de mon travail de chercheur. Merci pour tout Monsieur Patrick Poucheret.

Je remercie M. Thomas PETIT, Professeur des universités et Madame Sylvie BERCION, Maître de conférences d'avoir acceptés de juger ce travail malgré leurs nombreuses charges.

Je remercie Monsieur Renaud Boulanger, Chercheur au CIRAD. C'est un Homme de valeur, même à distance et malgré ses nombreuses occupations, Renaud n'a pas manqué de m'assister durant ces trois ans. Merci infiniment Renaud.

Je remercie Madame Sylvie Munier, Maître de conférences des universités pour m'avoir accueilli dans son laboratoire dès le début des travaux. Sylvie ne regardait jamais l'heure pour me recevoir dans son bureau et me prodiguer des conseils. Merci de tout cœur Madame Munier.

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées par le biais de l'UMR-QUALISUD. Merci pour votre support et vos encouragements. Je pense particulièrement à Nelly Forestier.

Les techniciennes de l'équipe effets santé des aliments de l'UMR-QUALISUD, Caroline GUZMANN et Karine PORTET m'ont beaucoup aidé durant ces trois années. Elles ont été d'un apport incontestable. Je vous aime les filles.

Je ne saurai terminer sans remercier toutes ces personnes dans l'ombre dont la contribution à mon travail fut très importante.

Je remercie :

Madame Delphine Margout, Maître de conférences des universités,

Monsieur Igor Pujalte, Maître de conférences des Universités,

Monsieur Guillaume Cazals, Assistant ingénieur, Université de Montpellier pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler dans leur laboratoire. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun d'eux m'ont beaucoup apporté.

Je remercie le ministère des affaires étrangères français, Campus France et l'Ambassade de Côte d'Ivoire pour leur soutien financier.

J'adresse toute ma gratitude à mes amis et en particulier à Madame Marceline Bonnesoeur.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille. Malgré mon éloignement depuis de (trop) nombreuses années, leur intelligence, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Est-ce un bon endroit pour dire ce genre de choses ? Je n'en connais en tous cas pas de mauvais. Je vous aime.

À mon grand frère Dalougou Gbogbri Inocent, mes parents, et à tous ceux que je ne nomme pas, mais qui se reconnaîtront.

Table des matières

Résumé i
Abstract iii
Remerciements iv
Table des matières vi
Liste des tableaux x
Liste des abréviations xii
Introduction 1
Chapitre I : Revue bibliographique 3
1. Généralité sur le cacao 3
1.1. Classification botanique 3
1.2. Génétique 5
1.3. Morphologie de la plante 8
1.4. Physiologie de la plante 11
1.5. Morphologie du fruit (pré- & post-récolte) 12
2. Usages et transformation du cacao 16
2.1. Usage traditionnel 16
2.2. Consommation 18
2.3. Procédés de transformation 27
3. Chimie du cacao 32
3.1. Macro et micro-composés présents dans le cacao 32
3.2. Composition nutritionnelle 33
3.2.1. Lipides 33
3.2.2. Fibres 33
3.2.3. Glucides 34
3.2.4. Protéines et acides aminés 36
3.2.5. Minéraux 37
3.3. Polyphénols 39
3.3.1. Présentation générale 39
3.3.2. Polyphénols du cacao 39
3.3.2.1. Flavonoïdes 42
3.3.2.1.1. Flavanols 43
3.3.2.1.2. Procyanidines 43
3.3.2.1.3. Anthocyanes 44
3.4. Xanthines 45
4. Facteurs de variation de la teneur en polyphénols des fèves et produits à base de cacao 45

4.1. Facteurs agricoles 46
4.2. Facteurs liés à la transformation de cacao 57
4.2.1. Fermentation 57
4.2.2. Action enzymatique 61
4.2.3. Séchage 62
4.2.4. Stockage 64
4.2.5. Torréfaction 64
5. Pharmacologie et effets santé du cacao et ses produits dérivés. 67
5.1. Métabolisme et biodisponibilité des polyphénols du cacao 67
5.1.1. Métabolisme et biodisponibilité des flavanols 68
5.1.2. Métabolisme et biodisponibilité des procyanidines 72
5.2. Effets du cacao et produits dérivés sur le syndrome métabolique et ses complications 73
5.2.1. Syndrome métabolique (Smet) 73
5.2.1.1. Historique et contexte du Smet 73
5.2.1.2. Pré-disposition génétiques et développementales au Smet 74
5.2.1.3. Définition et concept 75
5.2.1.4. Définitions du Smet selon des organismes 75
5.2.1.4.1. Définition de l'Organisme Mondial de la Santé (OMS) 76
5.2.1.4.2. Définition du Groupe Européen pour l'Etude de la Résistance à l'Insuline (GEERI) 77
5.2.1.4.3. Définition du programme national de traitement du cholestérol III (NCEP : ATP III, 2001) (Kaur, 2014) 78
5.2.1.4.4. Définition de l'Association américaine d'endocrinologie clinique (AACE) 79
5.2.1.4.5. Définition de la Fédération Internationale du Diabète (FID) 80
5.2.1.4.6. Définition de l'American Heart Association (AHA) 81
5.2.1.4.7. Définition de l'FID et de l'AHA/NHLBI 83
5.2.1.5. Causes du Smet 84
5.2.1.5.1. Sédentarité 84
5.2.1.5.2. Alimentation 85
5.2.1.5.3. Inactivité physique 86
5.2.1.6. Mécanismes d'actions 87
5.2.1.6.1. Résistance à l'insuline 87
5.2.1.6.2. Obésité et augmentation du tour de taille 88
5.2.1.6.3. Intolérance au glucose 89
5.2.1.7. Conséquences 90
5.2.1.7.1. Obésité 90

5.2.1.7.2. Diabète de type 2 91
5.2.1.7.3. Maladies cardiovasculaires 92
5.2.1.7.4. Dyslipidémie 93
5.2.2. Effets du cacao et produits dérivés sur le Smet 94
5.2.2.1. Cacao, chocolat, obésité 94
5.2.2.2. Cacao, chocolat, résistance à l'insuline 95
5.2.2.3. Cacao, chocolat, dyslipidémie 96
5.2.2.4. Cacao, chocolat, hypertension artérielle 97
5. 2.3. Effets du cacao sur les complications du Smet 98
5.2.3.1. Cacao, chocolat, dysfonctionnement endothéliale 98
5.2.3.2. Cacao, chocolat, stress oxydant 99
5.2.3.3. Cacao, chocolat, inflammation 100
5.3. Autres effets santé du cacao et produits dérivés 101
5.3.1. Cacao, chocolat, système nerveux central 101
5.3.2. Cacao, chocolat, système cardiovasculaire 102
5.3.3. Cacao, chocolat, système respiratoire 103
5.3.4. Cacao, chocolat, système gastro-intestinal 103
5.3.5. Cacao, chocolat, système endocrinien 104
5.3.6. Cacao, chocolat, dermatologie 104
5.3.7. Cacao, chocolat, propriétés antibactériennes 105
6. Mécanismes d'actions des polyphénols du cacao sur les cibles biologiques 106
Chapitre 2. Etudes expérimentales 120
2.1. Obtention des extraits de cacao et analyses 120
2.1.1. Obtention des échantillons des fèves de cacao 120
2.1.2. Obtention de la poudre de cacao 120
2.1.3. Délipidation et extraction des polyphénols totaux 120
2.1.4. Composition chimique des extraits de cacao 121
2.1.4.1. Dosage des polyphénols totaux par la méthode du Folin-Ciocalteu 121
2.1.4.2. Identification et quantification des polyphénols 123
2.1.4.2.1. Analyses qualitatives : LC-MS-UV 123
2.1.4.2.2. Analyses quantitatives : LCMSMS 123
2.1.5. Activités antioxydantes in vitro 125
2.1.5.1. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 125
2.1.5.2. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 126
2.1.6. Activités antiinflammatoires et immunomodulatrices *in vitro* 127
2.1.6.1. Viabilité cellulaire 127

2.1.6.1.1. Culture cellulaire 127
2.1.6.1.2. Evaluation de la cytoxicité 127
2.1.6.2. TNF-α 128
2.1.6.3. Dosage des Nitrites 129
2.1.6.3.1. Culture cellulaire 129
2.1.6.3.2. Dosage des nitrites par la méthode de Griess 130
Chapitre 3. Résultats et discussions 131
3.1. Teneur en polyphénols totaux de cacao obtenus après extraction 131
3.2. Impact de la fermentation sur la composition chimique des extraits de cacao 134
3.2.1. Impact de la fermentation sur les polyphénols totaux des extraits de cacao 134
3.2.2. Identification des composés présents dans les extraits de cacao 139
..... 139
3.2.3. Impact de la fermentation sur les polyphénols quantifiés 142
3.3. Impact de la fermentation sur les activités antioxydantes 143
3.3.1. Test DPPH 144
..... 145
..... 145
3.3.2. Test ORAC 145
3.4. Influence de la fermentation sur les activités inflammatoire et immunomodulatrice *in vitro* 146
3.4.1. Viabilité cellulaire 146
3.4.2. Impact de la fermentation du cacao sur la production du TNF-α 148
3.4.3. Impact de la fermentation du cacao sur la production du NO 151
Conclusion générale et perspectives 153
Références bibliographiques 158

Liste des tableaux

Tableau 1. Types de chocolat selon COVENIN 52 : 1999 (Lares et Pérez, 2015). 20
Tableau 2. Différents types de chocolat selon Lagorce (Lares et Pérez, 2015) 21
Tableau 3. Types de chocolat selon Codex Alimentarius (CODEX STAN 87-1981) (Lares et Pérez, 2015) 23
Tableau 4. Autres types de chocolat selon le Codex Alimentarius en fonction de la composition (CODEX STAN 87-1981) (Lares et Pérez, 2015) 24
Tableau 5. Type de chocolat en fonction de la forme selon le Codex Alimentarius (CODEX STAN 87-1981) (Lares et Pérez, 2015) 25
Tableau 6. Types de chocolat selon le Code alimentaire espagnol (Lares et Pérez, 2015) 26
Tableau 7. Composition nutritionnelle des fèves de cacao après fermentation et séchage (Hurst, 2015).....32
Tableau 8. Impact de la torréfaction sur les monosaccharides et oligosaccharides des fèves de cacao en fonction des pays d'origine (Bertazzo et al., 2013). 35
Tableau 9. Macro et micronutriments pour 100g de poudre de cacao, sirop de chocolat, chocolat noir, chocolat au lait et chocolat blanc (Briggs et al., 2015) 38
Tableau 10. Teneurs des polyphénols totaux en fonction des variétés génétiques.....47
Tableau 11. Teneurs des polyphénols totaux en fonction des variétés génétiques.....48
Tableau 12. Différences entre les teneurs des polyphénols totaux des fèves de cacao de différentes variétés.....49
Tableau 13. Teneurs des polyphénols totaux en fonction des pays d'origine avec différentes variétés 51
Tableau 14. Teneurs des polyphénols totaux contenus dans la liqueur de cacao de différentes variétés en fonction des pays d'origine.....52
Tableau 15. Teneurs des polyphénols totaux contenus dans la liqueur de cacao de différentes variétés en fonction des Pays d'origine (suite).....53
Tableau 16. Teneurs en clovamide et polyphénols contenus dans des fèves de cacao de différentes variétés en fonction des pays d'origine. 54
Tableau 17. Teneurs en (-) - épi catéchine contenus dans des fèves de cacao de différentes variétés en fonction des Pays d'origine 55
Tableau 18. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon l'OMS..77
Tableau 19. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon selon le GEERI.....78
Tableau 20. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selonl'ATP III. 79
Tableau 21. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet.....80
Tableau 22. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon FID.....81
Tableau 23. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet.....82
Tableau 24. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon l'FID et l'AHA/NHLBI. 83
Tableau 25. Inhibition de la croissance bactérienne par un extrait fermenté de coques de cacao 105
Tableau 26. Teneurs en extraits polyphénoliques totaux dans les fèves de cacao.....131
Tableau 27:Composés identifiés dans l'extrait non fermentés par UPLC-MS 140
Tableau 28: Composés identifiés dans l'extrait fermenté par UPLC-MS.....141

Liste des figures

Figure 1. Le cacao théobroma produisant des fleurs sur une vielle branche ou tige principale..... 9
Figure 2. Vieux arbres de cacaoyer 10
Figure 3. Cabosse de cacao mure. 13
Figure 4. Fruits murs de cacao ouverts. 14
Figure 5. Cabosse brisée ouverte pour montrer les fèves entourées de pulpe mucilagineuse.....17
Figure 6. Différents types de chocolat. 19
Figure 7: Structure de base des flavonoïdes 42
Figure 8. Impact de la fermentation sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de cacao non fermentés et fermentés 136
Figure 9. Chromatogrammes des extraits de cacao non fermentés et fermentés obtenus par UPLC-UV à 280 nm 139
Figure 10. Impact de la fermentation sur les flavonoïdes identifiés des extraits de cacao 142
Figure 11. Test DPPH des extraits de cacao.....145
Figure 12. Test ORAC des extraits de cacao 146
Figure 13. Effet du cacao sur les cellules J774A.1 147
Figure 14. Impact de la fermentation du cacao sur la production de TNF-α.....148
Figure 15. Impact de la fermentation du cacao la production du NO 152

Liste des abréviations

AACE	Association américaine d'endocrinologie clinique
AAPH	2-2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHA	American Heart Association
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP III	Adult Treatment Panel III
CGIETOOA	Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults
CGS	Cocoa Genome Consortium
Chlorure de sodium	NaCl
CIRAD	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CO_2	Dioxyde de carbone
Cox-2	Cyclo-oxygénase 2
CRP	C-reactive protein
CSKQ	Comité scientifique de Kino-Québec
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
NF-κb	Facteur de transcription Nuclear factor-kappa B
FID	Définition de la Fédération Internationale du Diabète
GACPAI	Global Advocacy Council of Physical Activity, International
SPAH	Society of Physical Activity and Health
GEERI	Groupe Européen pour l'Etude de la Résistance à l'Insuline
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
HDL	High density lipoprotein
HO-1	Hème oxygénase-1
ICGS	International cocoa Genome Sequencing Consortium
IL-1	Interleukine-1
IL-2	Interleukine-2

IL-6	Interleukine-6
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRS-1	Insulin receptor substrate-1
LCMSMS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LDL	low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharides
MS	Spectrométrie de masse
Na2HPO4	Hydrogénophosphate de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaH2PO4	Dihydrogénophosphate de sodium
NCEP	National Cholesterol Education Program
NHBLI	National Heart, Lung, and Blood Institute
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
O_2	Oxygène
OCDEM	Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology, and Metabolism Diabetes
DTU	Trials Unit
OMS	Organisme Mondial de la Santé
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium
Smet	Syndrome métabolique
SOD	Superoxyde dismutase
TGFβ	Transforming Growth Factor-βeta
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale-alpha
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Rayons ultraviolets
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein

Introduction

Le chocolat obtenu à partir des fèves du cacaoyer est l'un des aliments les plus consommés dans le monde. Des études de plus en plus nombreuses indiquent que le cacao et les polyphénols qu'il contient exercent une activité bénéfique sur la santé en intervenant dans des pathologies chroniques comme l'hypertension, l'athérosclérose, le diabète de type II et le syndrome métabolique (Smet) (Hossain et al., 2002 ; Kwon et al., 2007 ; Williamson, 2013 ; Cordero-Herrera et al., 2015 ; Litterio et al., 2015 ; Basu et al., 2015 ; Strata et al., 2016 ; Kim et al., 2016 ; Kamio et al., 2016 ; Cremonini et al., 2016). Ces pathologies ont en commun un état inflammatoire chronique, impliquant le système immunitaire et en particulier, les macrophages. Le cacao possède également des activités immunomodulatrices sur les cellules immunitaires *in vitro et in vivo* dans des pathologies auto-immunes ou allergiques, suggérant un rôle bénéfique dans ces maladies, liées à une dérégulation du système immunitaire et à une inflammation chronique (Zanotti et al., 2015 ; Grassi et al., 2015 ; Dragan et al., 2015 ; Guan et al., 2016). Ces effets sont en partie liés aux propriétés antiinflammatoires et immunomodulatrices des polyphénols présents dans le cacao, en particulier les flavonols et les procyanidines. Alors qu'il existe de nombreuses études montrant l'impact important de la fermentation sur la composition chimique (diminution de 90% la teneur en polyphénols) (Camu et al., 2008 ; Hurst et al., 2011 ; Afoakwa et al., 2012 ; Oracz et al., 2015 ; Albertini et al., 2015 ; Cruz et al., 2015 ; Brito et al., 2017 ; Pedan et al., 2017) et les qualités organoleptiques du cacao, il en existe peu concernant l'impact de ce procédé de transformation sur ces effets biologiques. Il nous semble important de connaitre l'impact de ce process sur la teneur et / ou la composition des polyphénols ainsi que sur les activités biologiques associées. La production par les macrophages de cytokines inflammatoires (interleukine-1 ; interleukine-6 ; le facteur de nécrose tumorale (TNF-α) est une étape critique dans le déclanchement et le maintien de l'inflammation. Cette inflammation peut être contrebalancée par la production des cytokines ayant des effets opposés comme l'interleukine-10, le Transforming Growth Factor-β (TGFβ) ou l'interleukine-4. Les polyphénols du cacao exercent des effets significatifs sur la production de ces cytokines, une action anti-inflammatoire majeure sur la production de TGFβ (Sies et al., 2005 ; Selmi et al., 2008 ; Ramino-puig et castell, 2009 ; Schinella et al., 2010 ; Andújar et al., 2012 ; Becker et al., 2013). Des médiateurs pro-inflammatoires libérés par les macrophages (NO ; TNF-α) ; prostaglandines et espèces

réactives d'oxygène sont également diminués. Ces effets sont en partie liés aux polyphénols, qui en régulant le système redox de la cellule, inhibent le facteur de transcription nuclear factor-kappa B (NF-κb) impliqué dans les processus inflammatoires. Ainsi la modulation de son activation est une cible potentielle pour réduire les réponses inflammatoires. Ce travail de recherche s'inscrit dans une démarche générale de recherche d'aliments fonctionnels, aliments qui procurent, au-delà des fonctions nutritionnelles de base, des bienfaits physiologiques réduisant le risque de maladies chroniques. Ce travail a pour object :

- Mettre en évidence de l'impact de la fermentation du cacao sur certaines propriétés biologiques du cacao
- Etablir une corrélation entre les modifications de composition en métabolites secondaires et variations biologiques.

Les différents échantillons de cacao sont fournis par le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) ; station de Guyane. À partir de la matière première, différents échantillons sont préparés (fermentés et non fermentés). Les échantillons sont délipidés suivis d'une extraction des polyphénols totaux et d'une caractérisation physico-chimique de la composition des différents extraits. Les activités antioxydantes, antiinflammatoires et immunomodulatrices des différents échantillons in vitro sont effectuées.

Chapitre I : Revue bibliographique

1. Généralité sur le cacao

1.1. Classification botanique

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est l'arbre qui produit les graines (fèves) à l'origine du cacao après transformation. Le nom de genre : « *Theobroma* » signifie « nourriture des dieux ». Elle se décompose comme suit : "broma" signifie nourriture et "Theo" dieu. Ces deux termes sont des mots Grecs. Le mot cacao est un dérivé du mot "xocolatl" (aztèque) avec "Xococ" qui veut dire « amer » et "atl" qui fait allusion à l'eau (Colombo et al., 2012). La famille botanique du cacao est de nos jours connu sous le nom de *malvaceae* (Colombo et al., 2012). Cette culture est originaire du Mexique et de certains pays de l'Amérique central et du sud. Elle intéresse de nos jours tous les pays du globe en particulier les pays du continent Africain. Le cacao du Brésil est classé parmi les plus importants avec 230 000 tonnes sur le plan mondial, la Côte d'Ivoire restant le premier producteur mondial. Les trois principales variétés de cacao sont Criollo, Forastero et Trinitario (Colombo et al., 2012). La dernière variété (Trinitario) est issue d'un croisement des deux premières (Criollo et Forastero). Ces trois variétés sont les plus cultivées dans le monde.

La variété Criollo comprend le cacao de la cordillère des Andes, la variété Porcellena et le cacao (Chuao, Ocumare et Cuyagua) des autres régions de la côte du Venezuela précisément d'Aragua (Gutiérrez et Pérez, 2015). Appartenant au sous-groupe des Amelona (cacaoyers d'origine vénézuélienne et introduit également en Guyane) la variété criollo fut cultivée pour la première fois dans un pays de l'Amérique du sud précisément dans l'île de Trinité au large du Venezuela. De nos jours, les plantations de ce groupe sont rencontrées principalement au Brésil, Mexique, Cameroun, Venezuela, Antilles et à Madagascar. Les pays comme la République Dominicaine, le Pérou, la Colombie et la Nouvelle-Guinée en sont aussi des pays producteurs.

Certains pays comme ceux de l'Amérique centrale sont également de fortes zones de production. Les sous variétés les plus cultivées sont Ocumare 61 et Chuao (Badrie et al., 2015). Par ailleurs, Porcellena est la souche pure de la variété Criollo (Badrie et al., 2015). L'isthme de Panama a servi de point de référence pour faire la différence entre les différentes sous variétés de Criollo cultivées en Amérique centrale (Badrie et al., 2015).

Les variétés Criollo et Forastero ont connu une expansion à travers certains pays de l'Amérique du Sud. Les études de Badrie et al., (2015) rapportent que les humains sont à l'origine de cette expansion.

En 1825, la variété Forastero fut désignée par le terme « étranger » au Venezuela pour distinguer une variété de cacao introduite dans l'île de Trinité (Badrie et al., 2015). Par ailleurs la variété rencontrée dans le nord de l'Equateur et connue sous le nom de cacao Nacional est la variété Forastero (Oracz et al., 2015). Cette variété est cultivée dans certains pays de l'Afrique de l'ouest. Elle est également cultivée au Brésil et en Equateur. Cette variété cultivée dans ces régions est la plus proche de la variété Forastero originale du Venezuela. La variété forastero est constituée de plusieurs sous-variétés à savoir Angoleta, Cundeamor, Amelonado et Calabacillo. Comme annoncé plus haut, Trinitario est un groupe obtenu par croisement des deux autres variétés. Selon les études de Wood et Lass, (2001) cette variété est rencontrée dans des régions telles que l'Amérique centrale, la Papouasie Nouvelle-Guinée et les caraïbes. Appelée aussi Deltano, Trinitario est le principal type de cacao rencontré dans des plantations de certains états du Venezuela précisément au Miranda et l'Aragua. L'élaboration de cette variété s'est produite principalement en Basse-Amazonie.

En plus de ces trois variétés, un autre groupe connu sous l'appellation Refractario fut découvert. Selon les études de Iwaro et al., (2003) cette variété est originaire de l'Equateur.

La classification est en perpétuelle évolution, des études ont montré que certains caractères ont évolué en fonction du temps et se sont transformés (Hii et al., 2009 ; Rusconi et Conti, 2010 ; Bertazzo et al., 2011). Il est donc important de considérer la composante génétique du cacaoyer.

1.2. Génétique

En 1905, le biologiste Anglais William Bateson utilisa pour la première fois le terme "génétique" pour nommer la science qui étudie l'hérédité et les gènes de différentes espèces (humaines, végétales ou animales). Cette science est constituée de plusieurs champs d'étude. Entre autres la génétique du développement, la génétique de l'évolution et la génomique. Des espèces végétales telles que le cacao theobroma furent l'objet d'études. En effet, ces travaux ont démontré que contrairement à l'espèce humaine, le cacao contient 430 millions de paires de bases et 8000 gènes de plus que l'espèce humaine (Guiltinan et Maximova, 2015).

De plus, le cacaoyer contient 28000 gènes dont les trois quarts ont été séquencés (Argout et al., 2011). Cette essence naturelle contient 10 paires de chromosomes.

Des études sur le génome du cacao ont été conduites. C'est ainsi que l'International cocoa Genome Sequencing Consortium (ICGS) publia le profil génétique de la variété Criollo. La variété Forastero quant à elle fut l'affaire du ministère de l'agriculture aux ETAS UNIS qui publia une séquence de son génome (Guiltinan et Maximova, 2015). En plus de ces résultats, d'importants outils sont mis en place pour travailler sur la génomique comparative du cacao.

Plusieurs outils ont été utilisés par des scientifiques pour le séquençage du génome de cacao. Entre autres les marqueurs Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) et Polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN (RFLP) N'goran et al., (2000). Ces outils ont permis de mieux comprendre la génétique du cacao. Ces auteurs ont utilisé les marqueurs RAPD pour différencier la variété forastero de la basse Amazonie de la variété Forastero de la haute Amazonie et du Criollo. Les marqueurs RFLP quant à eux ont été utiles pour faire une distinction entre les génotypes de la variété Criollo et ceux de Forastero de l'Amazonie (Badrie et al., 2015). Par ailleurs, N'goran et al., (1994) se sont servis d'une approche comparative pour différencier les gènes des variétés Forastero et Criollo.

Des projets de séquençage du cacao ont été conduits par des organismes. L'ICGS (International Cocoa Genome Sequencing Consortium) et le CGS (Cocoa Genome Consortium) ont travaillé respectivement sur un membre du groupe génétique Criollo et un groupe génétique amelonado (Guiltinan et Maximova, 2015). Ces deux projets étaient

basés sur plusieurs processus. Entre autres, ils ont généré des cartes génétiques, du séquençage d'ADN et d'ARN à grande échelle, de l'assemblage d'information et notation de l'information génomique. L'objectif était de savoir si la comparaison de ces deux types de cacao pouvait faciliter la compréhension de la structure et la fonction du génome du cacao.

L'ICGS a séquencé le génome d'un type de criollo (B97-61 / B2) collecté par Vish Mooleedhar en 1995 dans les montagnes mayas du Belize. Le CGS quant à lui a séquencé Matina 1-6, une variété de cacao du Costa Rica cultivée pendant de nombreuses années dans la vallée de la rivière Matina. Les deux variétés ont été choisies pour leur génome hautement homozygote, ce qui facilite grandement les assemblages génomiques finaux. Ces auteurs ont constaté que les génomes des deux types de cacao séquencés diffèrent dans leur taille d'environ 3,4% (respectivement 430 millions de pb (Mbp) et 445 Mbp pour B97-61 / B2 et Matina 1-6,). Les différences dans la taille d'un génome au sein d'une seule espèce sont fréquemment rencontrées. Une analyse plus approfondie a montré que la majeure partie de cette différence est attribuée à l'augmentation de l'ADN répétitif et des transposons trouvés dans le génome de Matina (Guiltinan et Maximova, 2015).

Le cacao contient plus de 700 gènes non identifiés par les scientifiques qui sont présents dans d'autres plantes (Guiltinan et Maximova, 2015). Certains de ces gènes présents dans le cacao influent sur sa valeur commerciale. En effet, les gènes de résistances aux maladies végétatives et les gènes de semences identifiés dans cette culture et intervenant dans la biosynthèse du cacao et de certains composés chimiques sont d'une importance capitale pour sa valeur commerciale (Argout et al., 2011).

Par ailleurs, le séquençage du cacao a permis d'identifier 84 gènes qui interviennent dans la biosynthèse des lipides. Plus de 96 gènes identifiés dans le cacao sont impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes. D'autres gènes (environ 57) interviennent également dans le codage de certaines enzymes y compris la terpène synthase. Cette enzyme catalyse la synthèse de terpénoïdes (Argout et al., 2011).

Une série de gènes ont été identifiés dans le cacao pouvant intervenir dans la couleur des cabosses. Il fut démontré que des gènes peuvent coder un facteur de transcription qui interviennent dans la régulation de la production de certains polyphénols tels que les anthocyanines. Cette information est d'une grande utilité dans le sens où elle permet de spécifier les génotypes des cabosses de cacao en fonction des différentes

couleurs. Cela permet de distinguer rapidement les variétés de cacao. Cette recherche démontre l'efficacité de la génomique et génétique du cacao (Motamayor et al., 2013).

Il existe une différence de groupes génétiques entre les variétés Trinitario et Forastero (Badrie et al., 2015). Engels (1983, 1986) quant à lui a aussi remarqué cette différence entre les groupes génétiques des clones de Forastero et de la variété Criollo. De plus, il a constaté des ressemblances nettes entre les fèves des variétés Criollo et Trinitario. D'autres études similaires ont été effectuées dans le même sens. C'est ainsi que Lerceteau et al., (1997) ont montré une distinction nette entre les clones des variétés Criollo et Forastero. Concernant l'espèce Criollo, il fut démontré une évolution de ses souches (Badrie et al.,2015). Quant à Motamayor et al., (2002), leurs études ont fait une distinction entre les anciennes souches et les nouvelles souches de la variété Criollo. Ces mêmes auteurs ont rapporté, dans d'autres études qu'ils ont menées, que 10 groupes génétiques de cacao ont été identifiés en fonction des résultats du génotypage de 1241 gènes provenant d'une vaste zone géographique, en utilisant 106 marqueurs microsatellites (Badrie et al.,2015). D'après cette étude, une parfaite connaissance de l'aspect génétique du cacao permet de faire une distinction des variétés que nous venons d'étudier. Les traits génétiques observables du cacao ont permis de faciliter la gestion de cette essence naturelle. En se basant sur ces résultats obtenus avec la génétique, plusieurs questions suscitent des réflexions dans le milieu du cacao.

- Quelles sont de nos jours les nouvelles orientations de la génomique du cacao ?
- Comment la génétique et la biologie moléculaire pourront-elles améliorer les conditions de vie des agriculteurs du cacao ?
- Comment la génétique pourrait-elle favoriser la protection de l'environnement ?
- Quelle serait la place de la génétique du cacao dans les échanges commerciaux du cacao et ses produits dérivés ?

Un intérêt particulier mérite d'être accordé à ces questions susceptible de favoriser des innovations dans le domaine de la génétique du cacao et de la sélection des différentes espèces. Par ailleurs, des recherches approfondies doivent être menées pour déterminer les gènes qui interviennent dans la croissance et le développement du cacao.

1.3. Morphologie de la plante

Les origines du cacao sont très anciennes. Les Amérindiens vivants dans le sud du Mexique et le nord de l'Amérique centrale furent les premiers à cultiver cette plante 400 ans après Jésus-Christ.

Le cacaoyer est un arbre tropical à feuilles persistantes qui provient des forêts néotropicales, précisément de la Guyane et de l'Amazonie. Il dispose de deux types de croissance : une croissance verticale et une autre croissance dite latérale (Colombo et al., 2012). Des fleurs germent sur les jeunes plants de cacaoyer mais se développent généralement sous les branches latérales (Colombo et al., 2012). Les vieux arbres produisent des fleurs sur les branches orientées de façon obliques et qui sont dues à l'action de la pesanteur. Ces fleurs se développent sur les vieux cacaoyers dont le but est de les remplacer.

Les feuilles du cacaoyer sont persistantes. Le cacaoyer est une plante cauliflore car ses fleurs poussent directement sur le tronc. Elles sont vert-foncées et brillantes. Ces feuilles sont ovales et simples avec 20-35 cm et 7-8 cm de longueur et largeur respectivement. Le cacaoyer dispose de petites fleurs de couleurs jaunâtres à rose pâles. Ces fleurs sont sous formes de racèmes fixés directement sur la tige ou sur le tronc.

Figure 1. Le cacao produisant des fleurs sur une vielle branche ou tige principale (Colombo et al., 2012).

Le cacaoyer produit des fleurs toute l'année. Une plante de cacaoyer peut produire environ 50000 à 100000 fleurs par an. Le diamètre des fleurs est compris entre 1-2 cm avec une couleur rose.

Les grains de pollen du cacaoyer sont transportés par des petites mouches contrairement aux autres fleurs des arbres. La pollinisation du cacaoyer se fait de nos jours de façon mécanique dans les plantations dites modernes ci-bien qu'elle soit réalisée sous l'action humaine.

Les fleurs de cacaoyers s'insèrent toujours en dessous de l'ovaire. Elles disposent généralement de cinq pétales et un ovaire supérieur. Il est important de souligner que les fleurs de cacaoyer sont inodores. Les pétales des fleurs sont étroits et en forme de coupe. Les fleurs femelles des cacaoyers contiennent des ovaires qui sont composées de cinq carpelles. La partie mâle de la fleur quant à elle contient des étamines (Colombo et al., 2012).

La taille du cacaoyer est de 8 à 10 mètres et peut en fonction des conditions de culture atteindre les 10 mètres de hauteur. Par ailleurs, pour des raisons de cultures le

cacaoyer est taillé au plus bas entre 3 à 8 mètres de hauteur. Il commence à produire à partir de 5 ans mais atteint son rendement maximal vers 10 ans. Un arbre peut atteindre 5 mètres de hauteur pendant les trois premières années et peut atteindre les 8 mètres 10 années plus tard.

Figure 2. Vieux arbres de cacaoyer (Liendo, 2015).

Sa durée de vie est comprise entre 30 à 40 ans (Badrie et al., 2015) et peut produire jusqu'à 30 ans. Lorsqu'une plantation est bien entretenue, des nouveaux arbres remplacent les anciennes et ce dans un intervalle de 25 ans (Badrie et al., 2015).

La majorité des cultures de cacao dans le monde sont faites à base des trois principales variétés. Les plantes de la variété Criollo sont en voie de disparition car non vigoureuses, ces plants sont sensibles aux maladies végétatives (Badrie et al., 2015). Elles représentent 5% de la production mondiale. Quant à la variété Forastero, elle est plus robuste et résistante. Cette variété résiste plus aux maladies végétatives que toutes les autres variétés.

Pour que le cacaoyer cultivé ait une croissance régulière, une floraison et une fructification abondante, des poussées foliaires normales et bien réparties au cours de l'année, Il est indispensable de maitriser ses conditions de culture.

1.4. Physiologie de la plante

Le cacaoyer se développe à des altitudes situées entre 200 - 400 m, dans des régions où la pluviométrie est de 1000 – 3000 mm par an. Après 5 semaines de pollinisation, les petites cabosses se développent, suivi d'une croissance rapide. La culture du cacao nécessite un climat humide, des précipitations permanentes et une terre fertile. Le cacaoyer se développe à 10°C nord et sud autour de l'équateur. Son environnement est constitué de forêt tropicale et de régions ombragées. Il se développe sous les arbres de la forêt dans laquelle il est cultivé. Les bananiers, les cocotiers ou certaines cultures légumineuses sont favorables au développement du cacaoyer. Les arbres forment des couvertures sous forme de bouclier pour protéger les jeunes plants de cacaoyer contre les rayons du soleil (Colombo et al., 2012). Pendant sa pousse, ses racines restent inondées durant de longues périodes.

Le cacao est devenu de nos jours une culture internationale. Elle est cultivée à travers le monde entier entre les tropiques du cancer et du capricorne. L'Afrique et l'Amérique du sud en sont les zones de fortes productions. La culture du cacaoyer peut se faire sous serre (la serre rend la croissance idéale aux plants, les rend plus forts naturellement et les protège des multiples agressions extérieures : le froid, le vent, les insectes parasites, la pollution, etc.) avec un important besoin en humidité, il ne survivrait pas dans d'autres conditions. L'humus est un paramètre très important dans sa culture car représentant une nourriture importante pour cette essence naturelle. Pour son développement, le cacaoyer a besoin d'un sol riche en potassium, azote et oligo-éléments. Une plantation peut contenir environ 1000 à 1200 arbres par hectare (Colombo et al., 2012).

En outre, une jeune plantation de cacao est capable de rentrer en production 6 mois après sa création. Selon les études de Wood et Lass (2001) les plants de cacaoyers sont vulnérables aux maladies telles que les infections fongiques. Ces maladies sont rencontrées dans toutes les zones de fortes productions du cacao. Les jeunes plants de cacao se flétrissent souvent. Cette situation est due à certains insectes. En effet, des insectes sont à la base de certaines maladies des cabosses (maladie des cabosses noires, balai des sorcières et la maladie des cabosses pourries et gelées) (Badrie et al., 2015). Ainsi dans le but de prévenir ce danger qui est quasi permanent, les acteurs du domaine agricole concentrent beaucoup d'efforts sur la protection des plantations de

cacao. Dans le but d'obtenir un rendement maximal, certains acteurs vont jusqu'à utiliser des fertilisants et fongicides. Cependant, certains scientifiques ne jugent pas nécessaire l'usage de ces produits pour optimiser la production des plantations (Iwaro et al., 2003). Toutefois, les variétés de cacao doivent être cultivées dans de meilleures conditions en tenant compte des exigences des différentes variétés pour assurer une meilleure production. La variété Criollo nécessite de bonnes conditions de culture pour sa croissance. Les études de certains scientifiques ont rapporté qu'il est possible d'optimiser la production des plantations. En effet une mise en œuvre de fortes densités de plantations influe positivement sur le rendement des plantations (1736-2500 arbres ha^{-1}) (Badrie et al., 2015). Cependant les études de Souza et al., (2009) ont montré que cette densification est limitée à la première production. La densité des plantations dans la seconde moitié serait alors inférieure (1059 arbres ha^{-1}) et favorise une meilleure production.

1.5. Morphologie du fruit (pré- & post-récolte)

Le fruit du cacaoyer se nomme " cabosse". Il mesure 15 - 30 cm de long et 10 cm de large avec une masse d'environ 500 g. les cabosses se trouvent sur le tronc des grosses branches et non pas sur les rameaux jeunes. La cabosse a une forme allongée et ressemble à un concombre assez rebondi. La taille et la texture des fruits varient en fonction des variétés et des conditions de culture. À maturité, elle a le plus souvent une couleur jaune-rougeâtre ou brunâtre. Du fait de l'importante masse des graines, sa surface est recouverte de nombreuses petites bosses, mais également marquées de dix sillons longitudinaux relativement profonds.

Figure 3. Cabosse de cacao mure (Bertazzo et al., 2013).

Le péricarpe relativement charnu, de 10 à 15 mm d'épaisseur devient plus dur et résistant en mûrissant. Le fruit contient des graines appelées fèves de cacao et devient mûr environ quatre à cinq mois après la floraison. Chaque fève contient deux cotylédons. Les fruits mûrs ne tombent pas naturellement au sol car une fois en contact avec le sol, ils constituent de la nourriture pour les animaux. Les cabosses mûres sont retirées individuellement à la main lorsque la culture se fait dans des plantations intensives. Pour ce faire, les paysans utilisent des outils tels que des machettes ou grands couteaux. Ces objets permettent de couper vers le bas des cabosses en prenant soin de ne pas détruire les fruits. Ensuite, les fruits murs récoltés sont déposés sur le sol puis coupés en deux. Une extraction des fèves s'ensuit et l'enveloppe extérieure est jetée.

Les fèves de cacao, de forme et de dimension assez variables sont aplaties et ont environ 25 mm de long sur 8 mm d'épaisseur. Elles se trouvent dans un tissu mucilagineux de type pulpe blanchâtre et gélatineuse un peu sucrée et acidulée.

En fonction des conditions de culture, le rendement d'une plantation diffère d'une culture à une autre. Une plantation peut produire entre 200 kg/ha à 3000 kg/ha (Bernaert et al., 2012).

Figure 4. Fruits murs de cacao ouverts (Colombo et al.,2012).

La production annuelle d'une plante de cacaoyer peut s'estimer à environ 20 à 50 cabosses.

Les fèves de la variété Criollo sont caractérisées par une saveur et un arome particulier (Rusconi et Conti, 2010). Sa production annuelle s'élève à 5% de la production mondiale (Badrie et al., 2015). Les cabosses de cette variété sont rouges ou jaunes. Elles sont caractérisées par une surface verruqueuse avec une paroi mince. Des cabosses lisses avec une forme rectangulaire peuvent être souvent rencontrées dans cette variété (Badrie et al., 2015). Les fèves de cette variété sont dodues. Elles prennent la couleur blanchâtre à l'approche de la lumière violette. Ce changement de couleur est dû à la faible teneur de certains composés polyphénoliques présents dans ces fèves. Les fèves de la variété Criollo les plus utilisées sont celles des types *Ocumare 61* et *Chuao* d'origine vénézuélienne.

Selon les études de Rusconi et Conti (2010) les fèves de la variété de Forastero sont plus solides et résistantes aux maladies (Oracz et al., 2015). Les fèves du Forastero contiennent moins d'arômes que les autres variétés (Oracz et al., 2015). De plus, selon les études de Caligiani et al., (2010) des sous-variétés du Forastero dont *le Nacional* disposent des fèves avec un important arôme et goût proche des fèves des variétés Criollo et Trinitario. Toujours selon ces mêmes auteurs, le Forastero représente 95% des fèves de la production mondiale. Le Forastero provenant des pays de l'Amérique du sud et de certains pays de l'Afrique de l'ouest sont distinctes de l'original "Forastero" du Venezuela (Badrie et al., 2015). Ces fèves sont de petites tailles et plates avec une couleur pourpre. Les grains de cette variété ont une teneur en matières grasses plus élevée que celle de la variété Criollo. D'autres sous-variétés de Forastero contiennent des cabosses similaires aux cabosses de la variété Criollo. Ces cabosses sont rugueuses et plus longues que larges. Les cabosses de Forastero sont toujours vertes et prennent la couleur jaune à maturation. Par ailleurs selon les études de Lachenaud et Motamayor (2004) des traces de pigments rouges sont rencontrées dans certaines formes comme c'est le cas au Pérou. Les cabosses de la variété Forastero deviennent épaisses lorsqu'elles arrivent à maturité.

Plusieurs variétés hybrides ont pu voir le jour suite à certains croisements effectués. La variété Trinitario est le fruit de ces croisements. Caligiani et al., (2010) ont rapporté qu'à l'instar des variétés Criollo et Nacional, la variété Trinitario fournit des fèves de qualité supérieure. La production mondiale des fèves de la variété Trinitario est de 5-10% de la production mondiale totale. Les fèves de la variété Trinitario sont réputées pour leur saveur et sont utilisées pour la production de chocolat fin.

L'Afrique de l'ouest et centrale représentent les régions de plus fortes productions du cacao avec 70% de la production mondiale (Badrie et al., 2015). L'Afrique de l'ouest fourni à elle seule 60% de la production mondiale avec 40% pour la Côte d'Ivoire et 20% pour le Ghana (Badrie et al., 2015). Le Ghana est le pays qui fournit des fèves de cacao d'une qualité supérieure (Papalexandratou et al., 2011). Les continents Asiatiques et Océaniens se partagent seulement 17% de la production mondiale (Othman et al., 2010).

Les pays de l'Amérique fournissent la plus petite part de la production mondiale avec 13% seulement. Le Brésil et l'Equateur sont en tête dans cette zone sud-américaine. Avec 5% de production, le Brésil cependant était autre fois considéré comme l'un des plus grands producteurs du cacao (Oracz et al., 2015).

2. Usages et transformation du cacao

2.1. Usage traditionnel

Le cacao était au départ cultivé pour ses fèves et le reste du fruit était éliminé comme déchet. Il est important de rappeler que les fèves représentent environ 33% de la masse de la cabosse (Oddoye et al., 2013). Cependant plusieurs sous-produits à base de cacao peuvent être conçus. Ces sous-produits sont utilisés par les petites entreprises dans les pays producteurs de cacao. En effet, la littérature rapporte que le jus de la pulpe peut être transformé en boisson. Cette boisson peut être utilisée seule ou en y ajoutant d'autres fruits. De plus, ce jus peut intervenir dans la fabrication de confiture et de marmelade. Il est également rapporté qu'une pectine de qualité commerciale supérieure peut être extraite de ce jus.

De plus, la fermentation des glucides contenus dans le jus de la pulpe de cacao peut être utilisée pour produire des boissons alcoolisées, du vin ainsi que certains produits tels que le vinaigre (Oddoye et al., 2013).

Figure 5. Cabosse brisée ouverte pour montrer les fèves entourées de pulpe mucilagineuse (Oddoye et al., 2013).

Les coques de cacao sont utilisées pour la fabrication des aliments de certains animaux. En effet, les cabosses et coques séchées sont incorporées pour produire des aliments des volailles avec une teneur de 10%, des porcs 25% et des moutons 40%. Par ailleurs, la fermentation des fèves de cacao avec une espèce de champignon telle que *Pleurotus ostreatus* contribuent à améliorer sa valeur alimentaire nutritionnelle (20%) et augmenter son utilisation dans les régimes alimentaires des animaux.

Après séchage, les cabosses vides peuvent être brulées et produire des minéraux (40% de potassium). La cendre obtenue peut servir d'alkali et intervient dans la fabrication de savons solides et liquides. La cendre peut également servir d'engrais en raison de sa richesse en potassium et peut être complémentée avec de l'amidon.

Aussi, le beurre extrait du cacao peut intervenir dans la production de savons de toilette et de crèmes corporelle. Egalement, la transformation des sous-produits du cacao peut contribuer à améliorer les revenus des populations. En effet, des investigations ont mis en relief les avantages pour les producteurs de cacao de changer leurs modes de vie en transformant les déchets des sous-produits de cacao (Oddoye et al., 2013).

2.2. Consommation

Les premiers occupants du continent Américain vivant dans le sud du Mexique et dans le nord de l'Amérique centrale utilisaient les fèves de cacao pour produire une boisson appelée « xocolatl ». Une autre boisson à base de cacao a été fabriquée par ces peuples. Aaron et Bearden (2008) rapportent que cette boisson est caractérisée par un goût amer et a été utilisée pour le traitement de la toux et de la fièvre. Au début, cette boisson fut consommée uniquement par les bourgeois. De plus, selon Bruinsma et Taren (1999), les fèves de cacao ont été utilisées par l'espagnol Herman Cortez pour apprendre à fabriquer la boisson à base de chocolat après avoir dégusté celle produite par les aztèques au 16ème siècle. Lors de la préparation, Cortez a utilisé du sucre et du miel.

En outre, les recettes utilisées par les mayas pour la préparation de boisson au chocolat sont longtemps restées secrètes. Ainsi lors de son retour en Espagne, Herman livra ce secret à tous.

Le chocolat se répandit à travers toute l'Europe dès que l'Espagne eu perdu son pouvoir de grande puissance mondiale. Chez les bourgeois, la boisson au chocolat fut considérée comme une boisson saine et délicieuse. Cependant, au 17ème siècle cette boisson a connu une popularité exceptionnelle. En Europe, un Français ouvrait la première industrie de chocolat. Les industries du chocolat se sont par la suite répandues vers 1700 dans toute l'Angleterre.

Le domaine des technologies de transformation du cacao a connu un essor. De nouvelles méthodes de productions ont été mises en place lors de la révolution industrielle. Cette révolution industrielle a favorisé la propagation du chocolat à travers le monde. C'est ainsi que vers le 19è siècle, C.H. Van inventa une presse permettant d'extraire le beurre des fèves de cacao. Le produit obtenu a connu des transformations successives pour produire le chocolat. Selon les affirmations de Grivetti et Shapiro, (2011) les premières barres de chocolat ont été produites en 1847. Dans le but de réduire la mortalité infantile, Henry Nestlé un célèbre Pharmacien suisse commença à faire des essais d'aliments en utilisant certains ingrédients tels que le lait de vache, le blé et le sucre. Le but de son initiative était de formuler un aliment infantile afin d'aider les mères qui ont eu des difficultés à allaiter leurs nourrissons. Pour ce faire, il s'est associé au chocolatier Daniel Peter et ils

ont réussi à produire du chocolat au lait. Cet aliment est désormais consommé à travers le monde et apprécié de tous.

Il existe plusieurs variétés de chocolat. Sa classification est appréciée différemment par les scientifiques et les organisations internationales. De ce fait, le chocolat est donc défini de plusieurs manières.

Blanc	Lait	Noir	Liqueur de cacao
Pourcentage de matières sèches de cacao			
0%	≥ 10%	≥ 35%	100%

Figure 6. Différents types de chocolat (Lares et Pérez, 2015).

Tableau 1. Types de chocolat selon COVENIN 52 : 1999 (Lares et Pérez, 2015).

Variétés	Description
Chocolat mi-sucré	Cette variété contient une teneur minimale de 27% de cacao.
Chocolat amer	Produit contenant une teneur minimale de 60% de cacao.
Chocolat au lait	Ajout de lait au chocolat
Chocolat blanc	Produit homogène contenant du beurre de cacao et du lait. D'autres ingrédients et additifs alimentaires autorisés par la présente norme sont ajoutés.

Tableau 2. Différents types de chocolat selon Lagorce (Lares et Pérez, 2015)

Variétés	Description
Le chocolat noir	Cette variété est foncée et ne contient que moins de 35% de matières sèches (poudre de cacao). Il contient du sucre, des émulsifiants et des arômes. La teneur normale en cacao dans cette variété est de 55 à 99%.
Chocolat blanc	Cette variété contient uniquement du beurre de cacao. D'autres ingrédients sont rencontrés tels que le lait en poudre et des arômes.
Le chocolat au lait	Cette variété est la résultante du chocolat noir et du chocolat blanc. Elle contiendrait environ 25% de cacao et d'autres ingrédients tels que le lait en poudre et des sucres. On rencontre souvent des éléments tels que des arômes et un émulsifiant.
Le chocolat dessert	Dans cette variété, on retrouve les mêmes ingrédients que ceux rencontrés dans les autres variétés citées plus haut (chocolat noir, blanc et au lait). Cette variété se fond facilement dans la bouche.
Les chocolats spéciaux	Ces variétés comprennent le chocolat au lait et chocolat blanc. Avec une texture foncée, certains ingrédients tels que les noix de coco et noisettes sont associés aux recettes.
Chocolat haute qualité	Cette variété est produite avec du cacao de très bonne qualité. La teneur de cacao serait supérieure à 70%.
Le chocolat organique	Cette variété est constituée uniquement de 95% d'ingrédients biologiques.

Les travaux de ce même auteur ont également rapporté certains produits dérivés de cacao et de chocolat en plus de ceux que nous venons de voir. Il s'agit de la poudre du cacao ou de chocolat. Cette poudre est utilisée pour fabriquer certaines denrées alimentaires telles que les boissons, les bonbons et d'autres produits (Lares et Pérez, 2015).

Tableau 3. Types de chocolat selon Codex Alimentarius (CODEX STAN 87-1981) (Lares et Pérez, 2015)

Variétés	Description
Le chocolat	Contient en matière sèche au moins 35% de cacao dont 18% de beurre de cacao et 14% de cacao.
Chocolat "à la taza"	Produit contenant du chocolat au maximum 8% de cacao et d'autres ingrédients tels que le blé, le maïs ou le riz, la farine et ou de l'amidon.
Chocolat sucré	Chocolat contenant 30% de cacao dont au moins 18% de beurre de cacao et 12% d'extrait sec de cacao sans matières grasses.
Chocolat "familier à la taza"	Cette variété est la même que le chocolat sucré, avec un maximum de 18% de blé, maïs ou de farine de riz et ou de l'amidon.
Couverture de chocolat	Il contient de la matière sèche avec 35% de cacao dont 31% sont le beurre de cacao et 2,5% d'extrait sec de cacao sans matières grasses.
Chocolat au lait	Il contient de la matière sèche avec 25% de matières solides de cacao (dont un minimum de 2,5% de solides non gras) et un minimum de lait solide entre 12 et 14% (y compris 2,5 à 3,5% de matières grasses).
Chocolat familier au lait	Cette variété contient 20% de cacao (dont un minimum de 2,5% de matières solides de cacao sans matières grasses) et 20% de lait solide (y compris un minimum de 5% de matières grasses).
Couverture de chocolat au lait	Ce produit contient 25% de cacao (dont un minimum de 2,5% de matières solides de cacao sans matières grasses), 14% de lait solide (y compris un minimum de 3,5% de matières grasses du lait) et une matière grasse totale avec une teneur non inférieure à 31%.

Tableau 4. Autres types de chocolat selon le Codex Alimentarius en fonction de la composition (CODEX STAN 87-1981) (Lares et Pérez, 2015)

Variétés	Description
Chocolat blanc	Il contient de la matière sèche avec au moins 20% de beurre de cacao et 14% de lait solide (y compris une teneur en matière grasse du lait au moins entre 2,5 et 3,5% approuvé par l'autorité compétente conformément à la législation applicable).
Chocolat Gianduja	Cette variété a une teneur minimale en cacao de 32% y compris au moins 8% de cacao solides non gras et de noisettes finement broyées de telle sorte que le produit ne contient pas moins de 20% et pas plus de 40% de noisettes.
Chocolat Gianduja au lait	Ce produit contient 10% de lait et des noisettes finement broyées mélangées dans des proportions telles que le produit ne contienne pas moins de 15% et pas plus de 40% de noisettes. D'autres ingrédients peuvent également être ajoutés : amandes et autres variétés de noix de sorte que la quantité totale ne dépasse pas 60% du poids total du produit.
Chocolat para mesa	Chocolat non raffiné dans lequel la granulométrie du sucre est supérieure à 70 microns.
Chocolat de base para mesa	Cette variété contient de la matière sèche avec 20% de cacao solide (dont un minimum de 11% de beurre de cacao et 9% de cacao solides sans matières grasses.

Tableau 5. Type de chocolat en fonction de la forme selon le Codex Alimentarius (CODEX STAN 87-1981) (Lares et Pérez, 2015)

Variétés	Description
Vermicelles et flocons de chocolat	Les vermicelles sont sous forme de grains courts, cylindriques et les flocons sous la forme de petits morceaux plats.
Le chocolat fourré	Ce produit est couvert par un revêtement d'un ou plusieurs types de chocolat, sauf pour le chocolat à la "taza", chocolat familier à la "taza" et le chocolat para mesa. La composition du centre peut être clairement distingué du revêtement externe. Le revêtement de chocolat doit représenter au moins 25% du poids total du produit concerné.
Pralines au chocolat	Les pralines sont faites soit de chocolat fourré ou un ou plusieurs des types de chocolat (sauf pour le chocolat à la "taza", chocolat familier à la "taza" et le chocolat para mesa).

Tableau 6. Types de chocolat selon le Code alimentaire espagnol (Lares et Pérez, 2015)

Variétés	Description
Chocolat aux fruits secs ou aux céréales	Produit contenant du chocolat ou du chocolat au lait. Certains ingrédients tels que des amandes hachées, des noisettes, noix ou des grains de céréales grillées, gonflés ont été ajoutés.
Chocolat aux fruits	Du chocolat ou du chocolat au lait auquel des fruits secs coupés, entiers ou cristallisés sont ajoutés, de sorte que ces fruits ne représentent entre 5% et 40% de la masse totale.
Couverture sucrée de chocolat	Produit obtenu suite au mélange de la pâte de cacao et de sucre avec ou sans beurre de cacao. Il peut contenir au moins 31% de beurre de cacao et 35% de cacao sur une base de matière sèche.
Couverture de chocolat au lait	Ce produit contient 31% de matières grasses et se conforme aux caractéristiques spécifiées pour le chocolat au lait.

Le cacao provenant d'une culture industrielle doit être transformé avant consommation. Sa transformation en chocolat nécessite des procédures et process clairement définis.

2.3. Procédés de transformation

La transformation du cacao se fait en plusieurs étapes. Toutes les étapes de transformation sont décrites dans les différents tableaux suivants.

Opération unitaire	Objectif de l'opération	Méthodes utilisées
Collecte des cabosses	Regrouper les cabosses mûres	Usage de la main, des cisailles ou d'une gaffe
Extraction des fèves (écabossage)	Extraire les fèves et la pulpe	Usage de cisailles ou d'objets tranchants
Fermentation	Enlever la fève de la pulpe qui l'entoure, transformation du sucre en alcool puis en acide acétique qui tue les germes. Entraîne de profondes modifications biochimiques à l'intérieur des cotylédons (diminution de l'amertume, de l'astringence et apparition des précurseurs de l'arôme du chocolat)	- En tas, traditionnel, sur des feuilles de bananiers pendant 6 jours remuées le deuxième et le quatrième jour, - En bacs: dans de grandes caisses de 1,5 tonne percée pour l'écoulement du jus , - En paniers : à partir de de 10 kg, les paniers pleins sont posés sur le sol et recouverts de feuilles de bananiers. Le transvasement d'un panier à un autre assure le brassage. - Fermentation industrielle semi continue (100 t à la fois) dans un couloir avec fond en inox perforé. Les fèves sont déposées sur une couche de 1 mètre.
Séchage	Arrêter la fermentation, conserver les fèves en passant de 60% d'humidité à 6-7% et empêcher le développement de moisissures.	Séchage naturel (solaire) : 8 à 15 jours en couche de 5 cm, Séchage artificiel : 20 à 48 heures avec une température d'air à 50-80°C. Séchoirs à bois ou fuel de type Samoa : un conduit d'aspiration est aménagé dans une chambre de répartition d'air où se trouve une plate-forme de séchage perméable ; l'air se déplace par convection Séchoirs à tambour rotatif dans les dernières étapes du séchage qui tourne à la vitesse de 0,25 à 0,5 tours/min.
Ensachage	Faciliter le transport du cacao marchand	Dans des sacs

Opération unitaire	Objectif de l'opération	Méthodes utilisées
Tris des fèves de cacao	Eliminer les poussières, cailloux, objets métalliques, Eliminer les fèves trop petites ou brisées.	Usage de la main
Torréfaction	Développer le goût, l'arôme et la couleur. Rendre les fèves aptes au broyage	T = 100 à 130 O°C et t = 45 à 90 min, Torréfacteurs horizontaux classiques, torréfacteurs verticaux à lit fluidisé, Les temps et températures de torréfaction varient en fonction de la qualité, de l'humidité et de la dimension des fèves.
Egrugeage	Evaporer l'eau, l'acide acétique et quelques petites quantités de graisses. Enlever les coques et les cotylédons des fèves	Moulin ou concasseurs (deux cylindres dentés tournent en sens inverse l'un par rapport à l'autre).
Vannage	Séparer les coques et les cotylédons des fèves	Par différence de densité (ventilation).
Malaxage broyage	Obtenir une pâte appelée aussi liqueur de chocolat ou masse dont le taux d'humidité est de 55 à 58%, incorporer du sucre et d'autres ingrédients (lait en poudre...)	Broyeurs, mélangeurs.

Opération unitaire	Objectif de l'opération	Méthodes utilisées
Pressurage	Séparer les matières grasses et réduire la teneur de la masse de 50-56% de matières grasses à 10-12% pour le tourteau. Obtenir le beurre de cacao d'une part et le tourteau de l'autre	Préchauffage de la liqueur à 90°C, presses hydrauliques (300 à 400 bars), pressage à la main.
Refroidissement du tourteau	Permettre un meilleur broyage du tourteau	Cuve à double enveloppe avec circulation d'air froid.
Pulvérisation	Obtenir une poudre de faible granulométrie	Broyeurs à marteaux, broyeurs à disques.
Tamisage	Classer les particules selon leur taille et récupérer la classe de granulés qui vont constituer le chocolat en poudre.	Tamis intégrés aux broyeurs le plus souvent.

Opération unitaire	Objectif de l’opération	Méthodes utilisées
Mélange de la liqueur de cacao, le beurre de cacao, le sucre, autres ingrédients (lait...)	Obtenir une pâte homogène très visqueuse, préparer la pâte au raffinage	Malaxeurs pour produits pâteux.
Raffinage	Diminuer la taille des particules jusqu'à moins de 40 micromètres	Broyeurs cylindriques : 5 cylindres tournant à des vitesses différentes et avec des séquences alternatives, refroidis par eau à l'intérieur.
Conchage	Améliorer la qualité en éliminant l'humidité et l'acidité du chocolat, enrober de matière grasse chaque particule (inversion de phases, développer les arômes	Bacs avec agitation permettant un malaxage vigoureux et prolongé
Tempérage	Sélectionner les cristaux stables de beurre de cacao, parfaire l'aspect et la texture du chocolat (surface lisse et homogène)	Application de cycles de température adéquats (entre 29 et 31 °C).
Moulage	Donner sa forme définitive au chocolat en le cristallisant	Moules à la même température que le chocolat pour éviter une cristallisation hétérogène, cristallisation par refroidissement lent puis de plus en plus rapide.

3. Chimie du cacao

3.1. Macro et micro-composés présents dans le cacao

La première publication présentant les composés chimiques du cacao est apparue en 1912. Ce document fut publié dans le "Journal of Chemical Society ". L'article publié est intitulé « l'huile essentielle du cacao » (Bainbridge et Scott, 1912). Cet article a juste présenté une quinzaine de composés. Huit ans plus tard, le scientifique Knapp dans son document intitulé " Cocoa and Chocolate : Their History from Plantation to Consumer " (Knapp, 1920) établit la composition suivante du cacao : 9,3% d'eau ; 8,2% de minéraux ; 18,81% albuminoïdes ; 13,85% de fibres et 46,1% d'hydrates de carbone digestibles. Cette étude ne précise pas le produit auquel ces données se réfèrent mais il est couramment admis qu'il s'agit des fèves.

La physico-chimie du cacao est très complexe. En effet, en fonction du traitement que subissent les plants pendant la culture, des variations en concentration des composés apparaissent durant la vie de la fève. La composition chimique de la fève varie également en fonction des variétés et des process qu'elle subira. Ces différents facteurs qui influent sur la physico-chimie du cacao seront développés par la suite.

Tableau 7. Composition nutritionnelle des fèves de cacao après fermentation et séchage (Hurst, 2015)

Paramètres	% Max
Eau	3,2
Matières grasses	57
Cendres	4,2
Azote total	2,5
Théobromine	1,3
Caféine	0,7
Amidon	9
Fibres	3,2

Dans la section suivante, nous passeront en revue la littérature portant sur la valeur nutritive du cacao et de ses produits dérivés, en mettant l'accent sur la manière dont les constituants et les différents éléments nutritifs peuvent avoir une influence sur la santé.

3.2. Composition nutritionnelle

3.2.1. Lipides

Le beurre de cacao représente 50 à 57% du poids sec de fèves de cacao et est responsable des propriétés de fusion du chocolat. Les acides gras prédominants dans le beurre de cacao sont les acides gras saturés: acide stéarique 18:0 (18:0 pour indiquer qu'il a 18 atomes de carbone et aucune liaison covalente double, 35%, acide palmitique 16:0, 25%) et un acide gras monoinsaturé : acide oléique 18:1, 35%. La graisse restante étant principalement constituée d'acide linoléique polyinsaturé (3%) (Bracco, 1994).

En général, la consommation d'acides gras saturés est corrélée à une augmentation du risque de maladies coronariennes en raison de leur propension à augmenter le cholestérol total et le cholestérol-LDL (Grundy, 1994 ; Lairon, 1997). A l'inverse, les acides gras insaturés sont reconnus pour diminuer les facteurs athérogènes (Keys et al., 1986 ; Ascherio et al., 1996).

L'acide stéarique est un acide gras saturé inhabituel en ce sens où il ne semble pas avoir d'effet sur le taux de cholestérol et cholestérol-LDL dans le sang au contraire des autres acides gras saturés (Tholstrup et al., 1994 ; Bonanome et al., 1998). Les explications possibles à cette disparité peuvent comprendre certains paramètres tels que la longueur de la chaîne carbonée (Kritchevsky, 1994).

Grande et certains de ses collègues en 1970 ont montré que le beurre de cacao n'a aucun effet sur le cholestérol sanguin chez les humains (Grande et al., 1970).

3.2.2. Fibres

Les fèves de cacao non transformées contiennent des sources importantes de fibres. Ils représentent environ 15% de la masse totale des fèves (Steinberg, 2003). Le son de cacao est une bonne source de fibres insolubles (44%) mais également de certaines fibres solubles (11%) qui contribuent à diminuer les lipides sériques (Dja et al., 2000 ; Fernandez, 2001). Une nouvelle utilisation de ce son riche en fibre (25 g au total de fibres alimentaires / jour) de son de cacao augmente la masse fécale et améliore les ratios de lipides sériques (Dja et al., 2000). En comparaison, la poudre de cacao contient moins

de 2% de son par rapport à ses produits finis tels que le chocolat qui en contient très peu de fibres (Steinberg, 2003). Ainsi, la consommation de chocolat ne contribue pas de façon significative à l'apport de fibres alimentaires.

3.2.3. Glucides

Les fèves de cacao contiennent des saccharides. L'amidon est le principal polysaccharide avec une concentration comprise entre 3 et 7% des fèves de cacao. La cellulose est d'environ 12% dans les fèves de cacao fermentées / séchées et c'est l'un des composants prédominants des polysaccharides de la paroi cellulaire.

Les sucres solubles trouvés dans les fèves de cacao fermentées sont le glucose, le saccharose, le raffinose, le fructose, le stachyose et le verbascose et ils vont de 0,39% à 3,48% (Redgwell et al., 2003). Les principaux sucres sont le fructose et le saccharose (Reineccius et al., 1972 ; Bertazzo et al., 2013). La concentration variable des deux sucres est probablement causée par différentes conditions de fermentation qui affectent de façon marquée la quantité de saccharose dans les fèves de cacao. L'hydrolyse du saccharose qui se produit pendant la fermentation des fèves fournit le pool de sucre réducteur important pour la formation d'arôme pendant le processus de torréfaction. Alors que la fermentation est essentielle à la formation de précurseurs aromatiques, l'arôme typique du chocolat ne se développe pas avant que les fèves de cacao aient été torréfiées. En effet, une destruction presque complète des sucres réducteurs se produit au cours du processus de torréfaction puisqu'ils sont impliqués dans la formation de composés volatils à partir de réactions de brunissement non-enzymatiques. Au contraire, il n'y a pas de diminution de la concentration des sucres non réducteurs, de saccharose, raffinose, stachyose et du verbascose, car ils sont incapables de subir la réaction de Maillard.

Tableau 8. Impact de la torréfaction sur les monosaccharides et oligosaccharides des fèves de cacao en fonction des pays d'origine (Bertazzo et al., 2013).

	Glucose (mg/20 g)	Fructose (mg/20 g)	Sucrose (mg/20 g)	Raffinose (mg/20 g)	Stachyose (mg/20 g)	Verbascose (mg/20 g)
Ghana						
Non torréfiées	12,4	83,6	31,6	4	15,1	1,9
Torréfiées	0,9	11,9	28,2	5,4	10,6	1,3
Côte d'Ivoire						
Non torréfiées	15,9	56	31	3	12,2	0,9
Torréfiées	1	8,7	40,5	5,5	14,4	0,9
Equateur						
Non torréfiées	16,8	34,4	96,6	12,2	20,1	0,8
Torréfiées	2,1	12,1	124,8	14,9	22,2	0,9

3.2.4. Protéines et acides aminés

Les protéines représentent environ 60% de la teneur en azote total des fèves de cacao fermentées et constituent 10 à 15% du poids sec des fèves de cacao séchées, qui sont le deuxième constituant le plus abondant après la graisse de cacao. L'azote non protéique des fèves fermentées se trouve sous la forme d'acides aminés ; environ 0,3% se présente sous forme d'amide et 0,02% sous forme d'ammoniac qui se forme lors de la fermentation des fèves et des méthylxanthines telles que la théobromine et la caféine (Bertazzo et al., 2013).

Dans les fèves de cacao fraîches, beaucoup d'enzymes peuvent être détectées, mais la plupart d'entre elles sont inactivées à la suite du processus de production. Elles comprennent la (bêta) b-glucosidase, (bêta) b-fructosidase, (alpha) a-amylase, (bêta) b-lactosidase, protéinase, phosphatases alcalines et acides, lipase, polyphénol oxydase, pectinesterase, catalase et peroxydase (Bertazzo et al., 2013).

Les protéines des cotylédons de cacao peuvent être fractionnées en albumine (soluble dans l'eau), en globulines (solubles dans les solutions salines, en glutélines (solubles dans les acides dilués et alcalins) et en prolamines (solubles dans l'alcool) (Zak et al., 1976 ; Bertazzo et al., 2013).

La teneur totale en protéines des fèves de cacao est composée de 43% et 52% de fractions d'albumine et de globuline respectivement (Voigt et al., 1993 ; Bertazzo et al., 2013). Le premier composé est décrit comme une protéine de stockage de 21 kDa avec des propriétés inhibitrices de la trypsine (Kochhar et al., 2000 ; Bertazzo et al., 2013), tandis que le second est décrit comme une protéine de stockage globulaire semblable à la viciline composée de trois sous-unités de poids moléculaire de 47, 31 et 15 kD, qui sont dérivés d'un précurseur commun de 66 kDa (Spencer et al., 1992 ; Bertazzo et al., 2013).

Les glutélines et les prolamines sont présentes dans les fèves mais en faibles concentrations ; le premier représentant 5% et le dernier étant d'environ 1%. Le processus de fermentation affecte l'altération des concentrations en protéines (Bertazzo et al., 2013) entraînant une augmentation de l'albumine et de la gluteline de 52 à 79% et une diminution du taux de globulines de 43 à 8,3%.

L'albumine de cacao, la teneur en acides aminés et leurs valeurs nutritionnelles sont fortement affectées par la torréfaction (Abecia-Soria et al., 2005). Les globulines subissent

également une dégradation importante au cours de la fermentation (Amin et al.,1997) conduisant à la production d'acides aminés et de peptides hydrophobes, considérés comme des précurseurs aromatiques du cacao (Voigt et al., 1994 ; Bertazzo et al., 2013). L'augmentation des concentrations en acides aminés libres hydrophobes comme la leucine, l'alanine, la phénylalanine et la tyrosine s'explique par l'activité de deux protéases de cacao : l'endoprotéase aspartique, qui attaque préférentiellement les protéines aux sites des acides aminés hydrophobes et la carboxypeptidase, qui libère des acides aminés hydrophobes simples (Voigt et al., 1994 ; Hashim et al., 1998 ; Bertazzo et al., 2013).

Plusieurs paramètres ont un impact sur les amines du cacao. La fermentation, la torréfaction et le séchage, ainsi que le type de sol, le climat et les conditions de récolte, affectent grandement les caractéristiques du cacao. En effet, la fermentation implique des réactions microbiologiques et enzymatiques qui conduisent à une dégradation importante des protéines de cacao avec une amélioration de la concentration en acides aminés libres qui, avec les oligopeptides et les sucres réducteurs, sont considérés comme des précurseurs de l'arôme de cacao (Adeyeye et al., 2010).

3.2.5. Minéraux

La fève de cacao contient plusieurs minéraux, dont certains sont trouvés en grande quantité dans le chocolat. La quantité disponible dans le chocolat à partir de la fève de cacao dépend de la quantité de fèves de cacao utilisée pour produire le chocolat ; par conséquent, le chocolat noir a généralement une plus grande quantité de minéraux que le chocolat au lait.

Le chocolat au lait a été préconisé comme un potentiel véhicule pour l'enrichissement en fer (Davisdson et al.,1998). De nombreux minéraux sont nécessaires pour la fonction vasculaire, mais des quantités suffisantes de magnésium, cuivre, potassium et de calcium alimentaire méritent une attention particulière pour leur rôle dans la prévention de l'hypertension artérielle et leur contribution dans la réduction des risques de maladies cardiovasculaires (Klevay, 1993 ; NCEP, 2000).

Tableau 9. Macro et micronutriments pour 100g de poudre de cacao, sirop de chocolat, chocolat noir, chocolat au lait et chocolat blanc (Briggs et al., 2015)

Produits	Energie (Kcal)	CHO (g)	Sucre (g)	Protéine (g)	Matières grasses (g)	Ca (mg)	Fe (mg)	Mg (mg)	P (mg)	K (mg)	Na (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)
Apports nutritionnels					1	8–18	300–400	700	4,7	1,5	11	0.9	
Poudre de cacao :													
100 g	228	57,9	1,8	19,6	13.7	128	13,9	499	734	1524	21	6,8	3,8
1 tbsp	12	3	< 0,1	<1	0.5	7	0,8	27	40	82	1	0,4	0,2
Sirop au chocolat													
100 g	279	65,1	50	2,1	1.1	14	2,1	65	129	224	72	0,7	0,5
2 tbsp	109	25	19	<1	<1	5	0,8	25	50	87	28	0,3	0,2
Chocolat noir (45– 59% cacao solides)	546	61,1	48	4,9	31.4	56	8	146	206	559	7	0,6	1
Chocolat noir (60–69% cacao solides)	579	52,4	37	6,1	38.3	62	6,3	176	260	567	10	0,8	1
Chocolat noir (75–85% cacao solids)	598	45,9	24	7,8	42.6	73	11,9	228	308	715	20	3,3	1,8
Chocolat au lait	535	59,4	52	7,7	29.7	189	2,4	63	208	372	79	2,3	0,5
Chocolat blanc	539	59,3	59	5,9	32.1	199	0,2	12	176	286	90	0,7	0,1

3.3. Polyphénols

3.3.1. Présentation générale

Les polyphénols constituent un groupe de substances naturelles, issues du métabolisme secondaire des plantes, avec des structures chimiques variables. L'élément structurel fondamental, qui les caractérise, est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ester ou hétéroside. Les polyphénols sont très répandus dans le règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. On les retrouve en grande quantité dans le vin rouge mais beaucoup moins dans les vins blancs. Les polyphénols sont apportés également par les fruits (peaux et grains), les céréales, le chocolat, les boissons telles que le café, le thé (Bravo, 1998).

La classe des polyphénols végétaux comprend plus de 8000 composés décrits avec une grande variété structurale allant d'un simple noyau aromatique jusqu'aux tanins complexes. Ils sont classés en deux grands groupes : les flavonoïdes et non-flavonoïdes.

Les polyphénols sont le plus grand groupe d'antioxydants naturels rencontrés dans les plantes (Arlorio et al., 2005 ; Miller et al., 2006 ; Othman et al., 2007 ; Andres-Lacueva et al., 2008). Ils sont responsables de la coloration jaune, rouge ou violet des fruits et légumes (Osman et al., 2004 ; Nazaruddin et al., 2006 ; Fraga et al, 2010). En raison de leur structure diverse, ces composés ont de nombreuses fonctions (Jaganath et Crozier, 2010). Les polyphénols sont des groupes hétérogènes de métabolites biologiquement actifs dans les plantes où ils agissent en tant que matières de support de la paroi cellulaire (Hakkinen, 2000).

3.3.2. Polyphénols du cacao

Depuis plusieurs années des études sont menées pour identifier les polyphénols contenus dans le cacao. Ces composés contenus dans les plants de cacao se rencontrent dans les cotylédons. Les polyphénols ont de nombreuses fonctions dans un cacaoyer. Les études de Mazid et al., (2011) affirment qu'ils sont responsables de la croissance des jeunes plants. Aussi, ces composés interviennent dans la production du cacao (Oracz et al., 2015). Par ailleurs, en fonction de la zone de culture, chaque cacaoyer dispose de ses propres conditions de culture (Jalil et Ismail, 2008).

Afin d'identifier les polyphénols contenus dans les cacaoyers permettant de distinguer les variétés des plants de cacaoyer, certains facteurs méritent d'être pris en compte. Entre autres les conditions climatiques et agronomiques (Rusconi et Conti, 2010). Les deux facteurs que nous venons d'énoncer sont impliqués dans l'accumulation de ces composés dans les plants de cacaoyers (Oracz et al., 2015). Nous développerons ces facteurs dans les chapitres suivants. La présence de soleil et l'utilisation d'une bonne irrigation favorisent l'augmentation des anthocyanes et des glycosides présents dans les plants de cacaoyers dont le but principal est de les protéger. Les flavonoïdes sont produits dans les plantes de cacaoyers comme des aglycones. Ces composés se retrouvent souvent sous forme de dérivés glycosidiques (Oracz et al., 2015). En plus des polyphénols et autres composés, les plants de cacaoyers contiennent aussi des composés de méthylxanthine (Scapagnini et al., 2014). Les proportions de méthylxanthines sont fonction du génotype du cacaoyer. Par ailleurs, certains composés de méthylxanthines sont à la base de certains effets physiologiques des cacaoyers (Scapagnini et al., 2014).

À l'instar du cacaoyer, les fèves de cacao et produits dérivés du cacao sont une importante source riche de polyphénols alimentaires (Cooper et al., 2007 ; Rimbach et al., 2009 ; Rusconi et Conti., 2010 ; Badrie et al., 2015,) représentant une partie du poids sec des fèves de cacao et du chocolat, particulièrement le chocolat noir (Rusconi et Conti, 2010). Le cacao et le chocolat sont riches en monomères, oligomères et polymères de flavanols (Langer et al., 2011). Le cacao contient environ 380 produits chimiques connus dont 10 composés psychoactives. Dans leur état naturel, les fèves de cacao contiennent une forte concentration de polyphénols, ce qui leur donne une saveur très amère (Andújar et al., 2012). Les polyphénols des fèves de cacao contribuent à environ 12-18% du poids sec (Bravo, 1998) ce qui rend pratiquement les fèves crues immangeables en raison de l'amertume et l'astringence (Harwood, 2013 ; Khan et al., 2014). Wollgast et Anklam (2000) ont rapporté que les catéchines, les anthocyanes et les proanthocyanidines font partie des polyphénols les plus représentatifs des fèves de cacao. Sur 8000 structures phénoliques connus, seulement 4000 flavonoïdes ont été identifiés (Harborne et Williams, 2000 ; Cheynier, 2005).

Les trois principaux groupes de polyphénols des fèves de cacao non fermentées sont les flavan-3-ols (environ 37%) ou catéchines, les anthocyanes (environ 4%) et les proanthocyanidines (environ 58%) (Misnawi, 2004). Le principal composé de polyphénol

des fèves de cacao fraîches est l'(-) - épicatéchine, suivi de la (+) - catéchine et des dimères et trimères de ces composés (Jalil et Ismail, 2008).

La principale catéchine est l'(-) - épicatéchine avec environ 35% de la teneur des polyphénols. Dans une étude (Kim et Keeney, 1984 ; Oracz et al., 2015), la teneur en (-) - épicatéchine varie de 43,27 à 34,65 mg par gramme d'échantillons de fèves de cacao dans certaines variétés. De petites quantités de (+) - catéchine ainsi que des traces de (+) gallocatéchine et (-) -épigallocatechine ont été également identifiées. La fraction anthocyanine est principalement constituée de cyanidine-3-a-l'-arabinoside et de cyanidine-3-b-d-galactoside. Les procyanidines sont la plupart du temps des flavan-3,4-diols, qui sont liés par des liaisons 4 à 8 ou 4 à 6 et condensés de dimères, trimères ou oligomères avec l'épicatéchine comme sous-unité d'extension principale (Belitz et Grosch, 1992 ; Romanczyk et al., 1997).

La teneur en polyphénols solubles dans la masse des fèves de cacao fraîches sans matière grasse est de 15 à 20% (égale à environ 6% des fèves de cacao séchées à l'air libre contenant 54% de matières grasses et 6% d'eau), dans les fèves fermentées environ 5% (10% et plus étant considérés comme un signe d'une mauvaise fermentation). Ces valeurs sont valables uniquement pour les fèves de Forastero.

Les polyphénols contenus dans les fèves de la variété Criollo représentent environ 2/3 des polyphénols totaux de la variété Forastero, les anthocyanes n'en font pas partie (Lange et Fincke, 1970).

Les polyphénols sont repartis en plusieurs groupes. Entre autres les flavonoïdes.

3.3.2.1. Flavonoïdes

Bien que de nombreux composés polyphénoliques sont présents dans la fève de cacao, la poudre de cacao est particulièrement riche en une sous-classe de polyphénols appelés flavonoïdes. Constituant le groupe le plus important, ils peuvent être divisés en 13 classes avec plus de 5000 composés (Wollgast et Anklam, 2000). Il comprend une diversité de composés rencontrés dans le cacao (Keen et al., 2002 ; Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009 ; Ferrazzano et al., 2009 ; Fernandez-Murga et al., 2011). La structure de base des flavonoïdes se composent de deux composés aromatiques (A et B) et d'un noyau hétérocycle (C) contenant un noyau d'oxygène (Manach et al., 2004 ; Jaganath et Crozier, 2010).

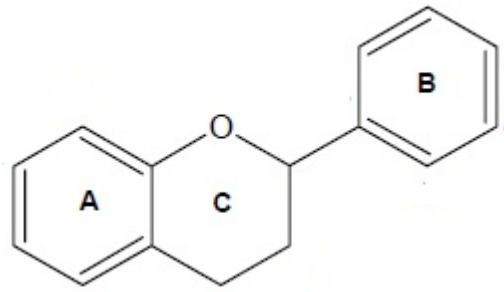

Figure 7: Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent se subdiviser en 6 sous-groupes en fonction de l'anneau hétérocyclique. Ce sont en effet les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavonols, les flavanols et les anthocyanes (Steinberg et al., 2003 ; Andres-Lacueva et al., 2008 ; Aron et Kennedy, 2008 ; Halbwirth, 2010 ; Bauer et al., 2011). Ces composés seront développés plus tard. Ces sous-groupes de flavonoïdes sont retrouvés dans plusieurs aliments (catéchines dans le thé, vin rouge et chocolat), les flavanones (les agrumes sont la source principale), les flavones et les isoflavones (la principale source est le soja) (Tomas-Barberan, 2012).

Les flavan-3-ols ou catéchines du cacao sont une sous-classe de flavonoïdes qui sont, à leur tour une sous-classe des polyphénols (Santos-Buelga et Scalbert et al., 2000 ; Fraga et al., 2005 ; Lamuela-Raventós et al., 2005 ; Ramiro-Puig et Castell, 2009 ; Neilson et Ferruzzi, 2011).

3.3.2.1.1. Flavanols

Les flavanols sont la classe la plus importante de polyphénols de cacao (Schroeter et al., 2006 ; Khan et al., 2014). Ils sont représentés par des monomères (+) - et isomères (-) - de l'épicatéchine et de la catéchine et leurs dérivés et l'accumulation de polymères de sous-unités de la catéchine (Porter, 1991).
Les flavanols sont des flavonoïdes facilement solubles dans l'eau et sensibles à la fois à l'oxydation enzymatique et non enzymatique. En général, les fèves fraîches de cacao non fermentées peuvent contenir des flavanols avec un degré de polymérisation varié à partir de monomères jusqu'à des décamères (Kelm et al., 2006).
Comme annoncé plus haut, l'(-) – épicatéchine constitue la majeure partie de la teneur en phénols de fèves de cacao tandis que d'autres tels que les catéchines à savoir la (+) - catéchine, la (+) - gallocatéchine et l'(-) - épigallocatéchine sont présents en très petites quantités. Les dimères (B1, B2, B3, B4 et B5), trimères (C1) et oligomères (tétramère D) du flavan-3,4-diols reliées par une liaison 4 → 8 ou 4 → 6 représentent des polymères (Santos-Buelga et Scalbert, 2000 ; Qin et al., 2002 ; Khan et al., 2014).

3.3.2.1.2. Procyanidines

Les procyanidines sont également présents dans les fèves de cacao. Ce sont les dimères, trimères et oligomères supérieurs et des polymères des structures des flavonoïdes principalement les flavan-3-ols (proanthocyanidines ou tanins condensés) (Hammerstone et al., 1999 ; Stark et al., 2005 ; Miller et al., 2006 ; Jonfia-Essien et al., 2008 ; Addai, 2010 ; Ortega et al., 2010). Ces composés sont constitués principalement de flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines) constitués d'épicatéchine élémentaire et / ou d'unités de catéchine liées par C4β → C8 et / ou C4β → C6 (de type B). Les procyanidines peuvent également avoir des liaisons éther

supplémentaires entre C2 → C7 (De type A) (Andres-Lacueva et al., 2008 ; Jonfia-Essien et al., 2008). Ils représentent environ 58% de la teneur totale en polyphénols des fèves de cacao brutes (Jalil et Ismail, 2008 ; Bauer et al., 2011). De ce groupe de composés, le plus souvent retrouvé dans les fèves de cacao sont les dimères de procyanidines à faible poids moléculaire (procyanidine B1, procyanidine B2), trimères (procyanidine C1), tétramère (procyanidine D), de plus grands oligomères et les polymères (Porter et al., 1991 ; Jalil et Ismail, 2008). Les tanins solubles et insolubles sont responsables de l'astringence et l'amertume typique des fèves fraîchement récoltés. Cela est dû à la capacité de ces tanins à former des complexes avec des protéines.

3.3.2.1.3. Anthocyanes

Ce groupe représente une autre grande famille de composés phénoliques comprenant principalement le cyanidine-3-O-galactoside et le cyanidine-3-O-arabinoside qui sont présents dans les fèves fraîches de cacao, représentant 4% des polyphénols totaux (Belscak et al., 2009 ; Oliviero et al., 2009 ; Bauer et al., 2011). D'autres composés phénoliques tels que les flavonols, les flavones et flavanones sous formes aglycones ou glycosylées (Jaganath et Crozier, 2010) sont également présents dans le cacao mais en petites quantités. Les principaux représentants de flavonols (Jaganath et Crozier, 2010) sont la quercétine aglycone et ses glycosides parmi lesquels on peut distinguer en particulier la quercétine-3-Oglucoside (isoquercitrine), la quercétine-3-O-arabinoside, la quercetin-3-O-galactoside (hypéroside) et la quercétine-3-O-glucuronide (Arlorio et al., 2005 ; Ramiro et al., 2005 ; Andres-Lacueva et al., 2008).

3.4. Xanthines

En plus des polyphénols, le cacao contient des composés de méthylxanthine, principalement la théobromine et la caféine mais en quantités inférieures à celles de la théobromine (Kim et al., 2014). Les teneurs moyennes en méthylxanthines dépendent du génotype du cacaoyer. La théobromine appartient au groupe des alcaloïdes de la purine ce qui peut provoquer divers effets physiologiques et ils sont synthétisés dans un nombre limité d'espèces de plantes y compris le cacao (Ashihara et al., 2011).

4. Facteurs de variation de la teneur en polyphénols des fèves et produits à base de cacao

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine des variations de teneur en polyphénols du cacao et du chocolat. Les facteurs agronomiques et génétiques influent sur la teneur en polyphénols des plantes avant la récolte. Après la récolte, la fermentation, la torréfaction, le traitement alcalin, les enzymes et d'autres facteurs réduisent la teneur en procyanidines et flavanols à faible poids moléculaire (Ariefdjohan et Savaiano, 2005). Le cacao et le chocolat, lorsqu'ils sont traités de façon appropriée, peuvent contenir des quantités relativement importantes de flavonoïdes, en particulier la catéchine et l'épicatéchine (Ariefdjohan et Savaiano, 2005).

La concentration en flavanols de tout chocolat dépendra à la fois de la teneur en flavanols des fèves de cacao et des procédés utilisés pour la transformation du cacao en chocolat (Fraga et al., 2005).

Pendant le traitement, les flavan-3-ols sont perdus et en conséquence ne sont pas nécessairement les principaux composants dans de nombreux cacao et chocolats noirs vendus dans les commerces (Gu et al., 2006). Selon les procédés de transformation de cacao et de chocolat, ces produits peuvent contenir des quantités importantes d'antioxydants, principalement les monomères flavanoliques de la catéchine et de l'épicatéchine (Hammerstone et al., 1999). Plus de 10% du poids de la poudre de cacao dans les boissons sont des flavonoïdes (Hammerstone et al., 2000).

4.1. Facteurs agricoles

La concentration des composés phénoliques dépend de la génétique et aussi de la variété des fèves (Othman et al., 2010 ; Colombo et al., 2012 ; Tomas-Barberan, 2012). Il fut démontré que ces différences de concentration sont surtout influencées par la variabilité des espèces mais également par une variabilité entre les arbres (Miller et al., 2006 ; Ortega et al., 2010). Il est connu que dans l'espèce, selon la variété, les fèves de cacao sont caractérisées par une composition différente des composés polyphénoliques (Brunetto et al., 2007 ; Rodriguez-Campos et al., 2011). Clapperton et al., (1994) ont mené des études sur les différentes variétés cultivées au Sabah (Malaisie). Leurs études ont confirmé une relation entre les caractéristiques génétiques et la teneur en polyphénols dans les fèves analysées.

La relation entre la teneur en composés phénoliques et la diversité des espèces dans les fèves de cacao non fermentées sont également indiquées dans les études de Elwers et al., (2009). Ces auteurs ont étudié l'effet du génotype sur la variabilité des substances polyphénoliques dans les fèves de cacao des variétés Forastero, Criollo et Trinitario (Elwers, 2008 ; Elwers et al., 2009). Dans tous les échantillons étudiés, l'(-) - épicatéchine, la (+) - catéchine, le cyanidine-3-O-galactoside et le cyanidine-3-O arabinoside ont été les principaux composés et aucunes différences quantitatives n'ont été observées entre les variétés (Niemenak et al., 2006 ; Elwers, 2008 ; Elwers et al., 2009). Ces auteurs ont cependant constaté qu'il y avait des différences quantitatives significatives dans la teneur en anthocyanes entre Criollo et d'autres sous-variétés de cacao. Les résultats de leurs analyses confirment que les fèves de cacao de la variété Criollo contiennent peu ou pas d'anthocyanines dans sa composition

Tableau 10. Teneurs des polyphénols totaux en fonction des variétés génétiques

Type de produits	Variétés	Composés	Teneurs en polyphénols (mg d'acide gallic / g de cacao)	Références
Fèves de cacao	Variété hybride d'mazonie (Clones CCN51)	Polyphénols totaux	84,2	Tomas-Barberan et al., 2007
	Amazone		81,4	
	Trinitario		64,3	
	Forastero		81,5	
	Forastero Amazone		72,4	
	Criollo		50	
	Criollo		40	
	Différents clones		72,42 - 82,68	Hii et al., 2009

Tableau 11. Teneurs des polyphénols totaux en fonction des variétés génétiques

Type de produits	Variétés	Pays d'origine	Composés	Teneurs en polyphénols (mg d'acide gallic / g de cacao)	Références
Fèves de cacao	Clones CCN51	Équateur	Catéchine	93,16 mg de catéchine / g de cacao	Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009
	Différents clones	Cameroun	Épicatéchine	67,00 - 149,20	Niemenak et al., 2006
	Cacao de type traditionnelle	Ghana	Acide férulique	73,8	Jonfia-Essien et al., 2008
	Hybrides (HV1 - HV4)			69,90 - 81,60	

Tableau 12. Différences entre les teneurs des polyphénols totaux des fèves de cacao de différentes variétés

Produits	Variétés	Composés polyphénoliques	Teneurs	Références
Fèves de cacao	Criollo et forastero	Polyphénols totaux	Les fèves de cacao de l'espèce Criollo représente 2/3 de celle des fèves de la variété Forastero	Clapperton et al., 1994 ; Wollgast et Anklam, 2000 ; Nazaruddin et al., 2006 ; Jalil et Ismail, 2008
	Non Communiquée (NC)	Polyphénols totaux	La teneur en polyphénols des fèves de cacao varie entre 6 et 8% du poids sec	Wollgast et Anklam, 2000 ; Ferrazzano et al., 2009
	NC	Polyphénols totaux	La teneur en polyphénols des fèves de cacao varie entre 12 et 18 % du poids sec	Dreosti, 2000 ; Othman et al., 2007 ; Tomas-Barberan et al., 2007
	NC	Monomères de flavan-3-ols et des anthocyanes	Les teneurs varient entre 14,435 - 43,903 mg / kg d'(-) - épicatéchine; 125 - 1442 mg / kg de (+) - catéchine; 466 - 4552 mg / kg de cyanidine-3-O-arabinoside et 294 - 2817 mg / kg pour la cyanindin-3-O-galactoside	Niemenak et al., 2006

Bien que la concentration des composés phénoliques et leurs propriétés sont déterminées principalement par la variété, l'impact de d'autres facteurs tels que la maturation devrait également être soulignés (De Pascual-Teresa et al., 2000 ; Prior et Gu, 2005 ; Rusconi et Conti, 2010).

La maturation des fruits affecte considérablement les concentrations et les proportions des différents polyphénols (Aron et Kennedy, 2008 ; Colombo et al., 2012).

Colombo et al., (2012) ont montré que la perte d'épicatéchine commence avant que la cabosse de cacao soit complètement mûre.

La composition phénolique qualitative et quantitative des cabosses de cacao dépend du degré de maturation des fèves (Aron et Kennedy, 2008). Au cours de la maturation des fruits, la concentration en acides phénoliques diminue alors que la teneur en anthocyanes augmente (Halbwirth, 2010). La concentration en polyphénols dans les fruits de cacao non mûrs est la plus élevée et diminue au fur et à mesure que les fèves arrivent à maturité, ce qui est associée à une réduction sensible de la perception d'astringence (Andres-Lacueva et al., 2008 ; Aron et Kennedy, 2008).

De plus, la teneur en polyphénols du cacao est fonction de son origine (Othman et al., 2007 ; Jalil et Ismail, 2008 ; Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009 ; Caligiani et al., 2010 ; Colombo et al., 2012).

Clapperton et al., (1994) ont étudié les différentes variétés cultivées à Sabah (Malaisie). Ces auteurs ont confirmé qu'il existe une relation entre les caractéristiques génétiques et la teneur en polyphénols dans des fèves analysées. Il a également été constaté que la caractéristique astringence et amertume des fèves crues est due à la présence des composés polyphénoliques en eux (Luna et al., 2002).

Des études qui définissent la relation entre la teneur en composés phénoliques totaux et les pays d'origine des fèves de cacao vous sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau 13. Teneurs des polyphénols totaux en fonction des pays d'origine avec différentes variétés

Produits	Pays d'origine	Composés phénoliques	Teneurs	Références
Fèves de cacao fermentées	Costa Rica	Polyphénols totaux	16,52 mg d'épicatéchine / g de cacao	Wollgast et Anklam, 2000 ; Andújar et al., 2012
	Jamaïque		2,66 mg de catéchine / g de cacao	
Fèves de cacao fermentées séchées	Malaisie	Polyphénols totaux	Entre 40 et 84,2 mg d'acide gallique / g de cacao	Othman et al., 2007 ; Tomas-Barberan et al., 2007
Fèves de cacao	Cameroun	Polyphénols totaux	Entre 149,2 à 67mg d'acide gallique / g de cacao	Niemenak et al., 2006

Tableau 14. Teneurs des polyphénols totaux contenus dans la liqueur de cacao de différentes variétés en fonction des pays d'origine

Type de produits	Pays d'origine	Composés	Teneurs en polyphénols (% équivalents épicatéchine / de liqueur de cacao delipidé)	Références
Liqueur de cacao	Côte d'Ivoire	Polyphénols totaux	3,13	Natsume et al., 2000
	Venezuela		1,55	
	Ghana		1,93	
	Colombie		1,2	
	Brésil		6,04	
	Équateur		9,2	
	Ghana		9,7	
	Côte d'Ivoire		4,01	
	Équateur		4,11	
	Colombie		11,4	
	Brésil		3	

Tableau 15. Teneurs des polyphénols totaux contenus dans la liqueur de cacao de différentes variétés en fonction des Pays d'origine (suite)

Type de produits	Pays d'origine	Composés	Teneurs en polyphénols (mg équivalents d'épicatéchine / g de liqueur de cacao delipidé)	Références
Liqueur de cacao	Équateur	Polyphénols totaux	8,14	Redovnikovic et al., 2009
	Venezuela		5,19	
	Ghana		4,01	
	Madagascar		12,65	
	Mexique		8,37	
	Sao tomé		4,92	

Tableau 16. Teneurs en clovamide et polyphénols contenus dans des fèves de cacao de différentes variétés en fonction des pays d'origine.

Produits	Pays d'origine	Composés	Teneurs	Références
Fèves de cacao	Sulawesi	(-) - épicatéchine	1235 mg /100 g de fèves de cacao	Othman et al., 2010
	Malaisie		270 mg /100 g de fèves de cacao	
	Ghana	Clovamide	2.637 mg / kg	Arlorio et al., 2008
	Côte-d'Ivoire		2.157 mg / kg	
	Arriba		1.358 mg / kg).	

Tableau 17. Teneurs en (-) - épi catéchine contenus dans des fèves de cacao de différentes variétés en fonction des Pays d'origine

Type de produits	Pays d'origine	Composés	Teneurs en polyphénols (mg (-) - épi catéchine / g de cacao)	Références
Fèves de cacao	Côte d'Ivoire	(-) - épi catéchine	6,22	Kim et al., 1984 ; Oracz et al., 2015
	Venezuela		3,62	
	Samoa		10,64	
	Trinité		4,68	
	Brésil		8,23	
	Ghana		4,52	
	Nigéria		4,68	
	Costa Rica		16,52	
	Équateur		8,08	
	Jamaïque		2,66	
	Équateur		3,24	Oracz et al., 2015 ; Caligiani et al. 2010
	Ghana		1,77	
	Trinité		1,94	
	Grenade		1,81	

Bien que la concentration des composés phénoliques et leurs propriétés sont déterminées par la variété et la maturation, l'impact d'autres facteurs tels que les conditions climatiques ou agronomiques, le temps de récolte, le temps et les conditions de stockage sont également soulignées (De Pascual-Teresa et al., 2000 ; Prior et Gu, 2005 ; Rusconi et Conti, 2010). En effet, les cacaoyers sont cultivés dans une zone tropicale, un climat tropical chaud et humide qui se caractérise par une forte intensité des précipitations et une température élevée et constante (Spangenberg et Dionisi, 2001). Les cacaoyers sont plantés dans des endroits où les vents forts ne parviennent pas et à l'ombre des bananiers, de palmiers ou d'autres arbres indigènes pour les protéger de la lumière du soleil (Franzen et Mulder, 2007 ; Jagoret et al., 2011). Les données de la littérature montrent un avantage significatif résultant de la culture des arbres du cacao dans une petite ombre par rapport à la croissance en plein soleil (Franzen et Mulder, 2007). Il est reconnu que de nombreux facteurs environnementaux (type de sol, exposition au soleil, pluie ou le rendement de fruits par arbre) affectent l'accumulation de polyphénols dans les plantes (Camu et al., 2008). Par ailleurs, le rayonnement solaire intense et l'irrigation stimulent la croissance du contenu des anthocyanes et des glycosides de quercétine dans la partie externe du fruit afin de protéger les plantes contre les infections. La température, l'humidité, la disponibilité des nutriments et l'utilisation des engrais affectent aussi l'accumulation de polyphénols dans les plantes (Niemenak et al., 2006 ; Chang et al., 2009). Les recherches menées par Elwers et al., (2009) ont confirmé que la fertilisation des sols peut conduire à une réduction significative de la teneur en polyphénols totaux, flavan-3-ols et anthocyanes. Il a également été constaté que la présence d'engrais dans le sol peut affecter la concentration croissante de l'aspartate et d'acide caféique (Elwers et al., 2009).

4.2. Facteurs liés à la transformation de cacao

De nombreuses études antérieures ont montré que les différentes étapes du traitement des fèves de cacao affectent de manière significative la teneur en polyphénols et leur biodisponibilité (Wollgast et Anklam, 2000 ; Summa et al., 2006 ; Ortega et al., 2009). Toutes ces opérations telles que la fermentation, le séchage, l'alcalinisation et la torréfaction provoquent une dégradation importante des composés polyphénoliques (Ortega et al., 2008 ; Schinella et al., 2010). En outre, la concentration en polyphénols dans les fèves de cacao est significativement différente de celle de la poudre de cacao et chocolat (Cooper et al., 2007 ; Ramiro-Puig et al., 2007). Lorsque le cacao est traité de façon appropriée, il peut contenir des quantités relativement importantes de flavonoïdes, en particulier la catéchine et l'épicatéchine (Ariefdjohan et Savaiano, 2005). L'impact de ces différents procédés de transformation sur la biodisponibilité des polyphénols seront développés plus tard.

4.2.1. Fermentation

La fermentation est l'une des étapes impliquées dans la transformation des fèves de cacao. Cette étape est essentielle dans la détermination de la qualité de l'arôme du cacao. Une grande partie de l'approvisionnement mondial de cacao subit une fermentation, mais des quantités importantes de cacao ne sont pas fermentées intentionnellement et sont immédiatement séchées. Ces fèves sont couramment disponibles dans le commerce des États du Chiapas (Mexique) et de Tabasco (Mexique), la République dominicaine, l'Équateur, la région de l'Amazonie du Brésil et de Sulawesi (Indonésie).

La fermentation du cacao prend normalement entre cinq à sept jours ; la production de précurseurs d'arômes pendant la fermentation est importante pour la production de l'arôme de chocolat (Hannum et Erdman, 2000 ; Camu et al., 2008 ; Frauendorfer et Schieberle, 2008). Il y a des étapes de fermentation internes et externes impliquées lors de la fermentation du cacao. La fermentation externe implique principalement le catabolisme dû aux micro-organismes tandis que la fermentation interne englobe les modifications biochimiques dans les cotylédons des fèves.

Ce procédé de transformation du cacao est un processus microbiologique spontané. L'intérieur des cabosses saines et non endommagées est stérile ou presque stérile et ne contient pas plus de quelques centaines de micro-organismes (Roelofsen, 1958, Jespersen et al., 2005). Après ouverture des cabosses, les fèves de cacao sont spontanément inoculées avec un groupe de micro-organismes (Roelofsen, 1958, Daniel et al., 2009). Au cours de la fermentation, diverses levures, bactéries lactiques, bactéries acétiques et éventuellement *Bacillus subtilis* se développent en succession, en effectuant la fermentation (Schwan et al., 2004). Le rôle de *Bacillus subtilis* dans la fermentation du cacao n'a pas été clairement élucidé. Cependant, en raison de son activité enzymatique élevée et de sa production d'acides gras à courtes chaînes ; la croissance et l'activité de *Bacillus subtilis* est susceptible d'influencer le produit final (Hugenholtz, 1993).

Pendant la fermentation, les polyphénols diffusent à partir de leurs cellules de stockage et subissent une oxydation pour devenir des composés moléculaires condensés, principalement des tanins insolubles.

Entre les deux et trois premiers jours de fermentation, la teneur en épicatéchine diminue fortement (Colombo et al., 2012).

La fermentation initie un certain nombre de transformations microbiologiques, physico-chimiques et biochimiques bénéfiques dans les fèves de cacao (Misnawi et al., 2004 ; Bertazzo et al., 2011). La fermentation a un rôle majeur dans le changement de la couleur et la réduction de l'astringence et l'arôme dans les fèves de cacao (Niemenak et al., 2006). Pour cette raison, un temps de fermentation plus long est une caractéristique souhaitée chez les fabricants de produits de chocolat (Miller et al., 2006 ; Cooper et al., 2007).

En raison du goût plus doux et moins amer qui se transmet principalement par les polyphénols contenus dans les fèves des variétés Criollo, Trinitario et Nacional, ces fèves sont souvent moins fermentées que celles des variétés Forastero (Addai, 2010). Les fèves bien fermentées appartenant à la variété Criollo cultivés en Nouvelle-Guinée sont une exception (Counet et al., 2004). La fermentation des fèves de la variété Forastero dure généralement plus longtemps que celle de la variété Criollo à savoir de cinq à six jours (Wollgast et Anklam, 2000). Les fèves de cacao du Ghana, Bahia, Cameroun et de la Côte-d'Ivoire sont des exemples de fèves bien fermentées

alors que les fèves moins fermentées viennent de Arriba (Equateur), Madagascar, Java, Trinidad, République dominicaine et Tabasco (Mexique) (Counet et al., 2004 ; Miller et al., 2006). Les fèves de cacao de l'Equateur sont fermentées pendant trois jours alors que les fèves de l'Afrique de l'ouest jusqu'à cinq jours (Cooper et al., 2007).

Le changement de couleur des fèves de cacao est un symptôme visible des processus qui se déroulent pendant la fermentation. Il y a une nette différence dans le cadre de changement de couleur entre les fèves des variétés Forastero et Criollo. Les fèves de la variété Forastero crues sont violètes car elles contiennent des anthocyanes des (cyanidine-3-O-galactoside et cyanidine-3-Oarabinoside) (Niemenak et al., 2006). Cependant dans le cas des fèves Criollo qui ne contiennent pas d'anthocyanes, après fermentation, leur couleur est brun clair (Wollgast et Anklam, 2000). Le contenu et les proportions relatives des différents polyphénols dans les fèves de cacao peuvent être étroitement liés au degré de fermentation (Counet et al., 2004).

Des chercheurs soutiennent que la fermentation est l'une des principales étapes de transformation des fèves de cacao qui affecte la perte de polyphénols (Miller et al., 2006 ; Cooper et al., 2007). Les réactions d'oxydation (à la fois enzymatiques et non enzymatiques) ont lieu au cours de la fermentation des fèves de cacao (Redovnikovic et al., 2009). En conséquence, les composés polyphénoliques sont soumis à des changements biochimiques qui conduisent à une réduction de la teneur en polyphénols solubles, ce qui conduit à atténuer le goût amer et astringent et un arôme désagréable des fèves (Bonvehí et coll, 2000 ; Misnawi et al., 2004 ; Arlorio et al., 2005).

En outre, une nette diminution du contenu en (-) - épicatéchine et (+) - catéchine a été observé après cinq jours de fermentation (Kyi et al., 2005). Wollgast et Anklam, (2000) et Nazaruddin et al., (2006) ont montré que la teneur en (-) - épicatéchine et (+) - catéchine est réduite à environ 10 à 70% au cours de la fermentation. La durée prolongée de fermentation de fèves de cacao provoque une réduction de la teneur en proanthocyanidines (Counet et al., 2004).

Selon Cienfuegos-Jovellanos et al., (2009) la concentration des procyanidines diminue au cours du processus de fermentation. Ces auteurs ont également montré que la dégradation des procyanidines en composés aromatiques de composés de faibles poids moléculaires peut contribuer à la réduction de l'amertume et l'astringence

des fèves de cacao (Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009). Après 60 heures de fermentation, une baisse de 24% de la teneur en polyphénols totaux est perceptible mais au bout de huit jours, il peut atteindre même 58% (Niemenak et al., 2006). Par ailleurs, d'autres auteurs ont montré que la teneur en polyphénols solubles lors de la fermentation est réduite à environ 20% (Wollgast et Anklam, 2000). Toutefois selon Camu et al., (2008), la teneur en polyphénols totaux est réduite d'environ 10-50%.

La stéréochimie des composés polyphénoliques du cacao est influencée par les procédés de transformations des fèves. Des chercheurs ont montré qu'après fermentation de fèves de cacao, les quantités d'(-) épicatéchine et de (+) - catéchine ont significativement baissé. Par ailleurs, il y eu une formation de (-) - catéchine. Ces auteurs ont donc conclu que la fermentation aurait eu un impact sur la stéréochimie des flavan-3-ols en favorisant la formation de cet énantiomère et la réduction des polyphénols (Hurst et al., 2011).

D'autres études ont constaté que la plupart des polyphénols contenus dans les fèves fraîches de cacao sont modifiées chimiquement lors de la fermentation. Ainsi, une démarche menée a montré l'effet de la fermentation sur les polyphénols. Dans cette étude, le cacao utilisé a été fermenté pendant 6 jours. Dès les deux premiers jours de fermentation, ces auteurs après études analytiques des fèves, ont montré une réduction significative de la teneur en polyphénol. Par ailleurs, ils ont rapporté que l'épicatéchine, composé le plus majoritaire des polyphénols a connu une diminution (Albertini et al., 2015).

Payne et al., (2010) ont également travaillé sur la stéréochimie des polyphénols des fèves de cacao lors de la fermentation. Les niveaux de l'épicatéchine et catéchine ont été déterminés dans les fèves brutes de cacao fermentés conventionnellement. Les fèves de cacao non mûres avaient des teneurs plus élevées de 29% en épicatéchine et la même teneur de catéchine par rapport aux fèves bien mûres. Par ailleurs, des diminutions (> 80%) des teneurs en catéchine et d'épicatéchine ont été observées dans les fèves fermentées par rapport aux non fermentées. Après fermentation, le niveau de (-) - catéchine dans les fèves fermentées a augmenté respectivement de 696%, 650% et 640% par rapport aux mêmes fèves non torréfiées de la même variété.

4.2.2. Action enzymatique

Une des raisons de la perte de monomères de flavan-3-ols pendant la transformation du cacao peut être les processus enzymatiques de brunissement. La polyphénol oxydase est une enzyme principale impliquée dans ces processus. Cette enzyme a la capacité de conversion en o-odihydroxyphenols benzoquinones, ce qui entraîne un brunissement qui affecte à la fois la saveur et la couleur du produit. Toutefois, dès le premier jour de la fermentation, l'enzyme est inactivée en partie. Après le premier et le deuxième jour de fermentation, l'activité enzymatique initiale augmente de respectivement de 50% et 60% (Wollgast et Anklam, 2000).

Pendant le traitement des fèves de cacao, les polyphénols diffusent à partir de leurs cellules de stockage et subissent une oxydation pour devenir des composés moléculaires condensés, principalement des tanins insolubles. Les deux processus (enzymatiques et non-enzymatiques) cités plus haut sont catalysés par la polyphénol oxydase (De Brito et al., 2002 ; Nazaruddin et al., 2006 ; Colombo et al., 2012 ;).

Des études de certains chercheurs ont également souligné que les réactions d'oxydation ont lieu au cours de la fermentation des fèves de cacao (Redovnikovic et al., 2009). Les composés polyphénoliques sont soumis à des changements biochimiques qui conduisent à une réduction de la teneur en polyphénols solubles, ce qui conduit à atténuer le goût amer et astringent et un arôme désagréable des fèves (Misnawi et al., 2004 ; Arlorio et al., 2005). De plus, sous l'influence de la polyphénol oxydase, l'(-) - épicatéchine, la (+) - catéchine et les anthocyanes sont oxydés en quinones qui peuvent réagir avec d'autres composés phénoliques ou des acides aminés et des peptides pour former des pigments jaunes et bruns (Bittner, 2006 ; Niemenak et al., 2006 ; Camu et al., 2008).

À la suite de la polymérisation de l'(-) - épicatéchine, la (+) - catéchine et les polymères à poids moléculaire élevés (tanins) qui ont une digestibilité plus faible que les monomères sont formés (Kyi et al., 2005 ; Schinella et al., 2010). Il a été constaté qu'entre le deuxième et le troisième jour de la fermentation, une diminution rapide de la teneur en (-) - épicatéchine a lieu (Wollgast et Anklam, 2000 ; Cooper et al., 2007).

Pendant la fermentation, en présence d'une enzyme glucosidase, les anthocyanes rencontrés dans les fèves de cacao sont hydrolysés en anthocyanidines

et sucres (arabinose et galactose) (Niemenak et al., 2006 ; Andres-Lacueva et al., 2008 ; Camu et al., 2008). Les transformations des anthocyanes conduisent à leur dégradation rapide. Déjà après quatre jours de fermentation, les pertes de ces composés montent à 93% (Wollgast et Anklam, 2000).

Les activités de l'endoprotéase, l'aminopeptidase, la carboxypeptidase, l'invertase, la polyphénol oxydase et glycosidase ont été étudiés au cours du traitement des fèves de cacao. Ces enzymes sont d'une importance clé dans la formation de précurseur d'arôme et de la dégradation des pigments lors de la fermentation du cacao. Les conditions d'extraction et de dosage optimales ont été établies pour caractériser les réactions des enzymes, les quantifier et comparer leurs activités enzymatiques pendant le traitement du cacao. Lors du traitement, certaines enzymes (aminopeptidase, invertase et la polyphénol oxydase) ont été inactivées pendant que la carboxypeptidase était partiellement inactivée alors que l'endoprotéase et les glycosidases sont restés actifs pendant toute la durée du processus (fermentation) (Hansen et al., 1998). Etant donné que de nombreuses enzymes sont inactivées pendant la fermentation, il est généralement admis que la durée effective de l'action enzymatique devrait être courte. Bien que ces auteurs dans leurs travaux aient montré l'inactivation totale de certaines enzymes, Ils ont également souligné que plusieurs enzymes clés ne sont pas totalement inactivées pendant la fermentation. Par conséquent, certaines réactions enzymatiques peuvent continuer pendant tout le processus de fermentation. Cela a pour conséquence, la réduction significative de composés phénoliques (Hansen et al., 1998).

4.2.3. Séchage

Le séchage qui est principalement le procédé utilisé pour réduire la teneur en eau et la croissance microbienne dans les fèves de cacao conduit à une perte d'activité de la polyphénol oxydase (Bonvehí et coll, 1997). À l'état sec, la teneur en polyphénols totaux solubles est de 15 à 20% de la masse des fèves séchées, ce qui équivaut à 6% de la masse des fèves de cacao séchées. Cependant, les réactions d'oxydation et de polymérisation des polyphénols sont maintenues, ce qui confirme la présence de réactions d'oxydation non-enzymatiques des composés phénoliques (De Brito et al.,

2001 ; Kyi et al., 2005 ; Camu et al., 2008). Les flavanols simples contenus dans les fèves de cacao subissent une dégradation supplémentaire lors du processus de séchage (Bonvehí et Coll, 1997). La réduction de ces composés qui a lieu au cours du séchage est provoquée non seulement par l'action de l'activité de la polyphénol oxydase qui est maintenue à 2% mais peut également être associée à la migration des polyphénols avec l'eau évaporée (Misnawi et al., 2004 ; Camu et al., 2008 ; Redovnikovic et al., 2009).

Le séchage de deux jours dans des conditions naturelles impliquant l'exposition de fèves fraiches de cacao non fermentées au soleil provoque une diminution de 50% de la concentration en (-) - épicatéchine (Camu et al., 2008 ; Jalil et Ismail 2008).

Kim et Keeney, (1984) ont également remarqué dans leurs travaux une diminution de 90% de la concentration d'(-) - épicatéchine (Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009) après séchage des fèves de cacao. Cependant il n'est pas mentionné si les fèves utilisées dans leurs études étaient fermentées ou pas.

En outre des auteurs indiquent que la réduction de la teneur en catéchine pendant le séchage de la variété des fèves de Criollo est plus importante que celle des fèves des variétés Forastero de la Haute Amazonie, du Forastero de la basse Amazonie et des variétés Nacional et Trinitario (Elwers et al., 2009).

Hii et al., (2009) quant à eux ont étudié l'influence des différentes méthodes de séchage (séchage au soleil, lyophilisation et séchage au four) et l'influence de la température sur la teneur en polyphénols dans les fèves de cacao fermentées. Ils ont montré que le séchage à l'étuve à la température de 70◦C par rapport au séchage au soleil provoque la réduction de la perte des composés phénoliques. Dans une autre étude, le séchage a eu un effet minime sur les teneurs d'épicatéchine et catéchine contenue dans les fèves de cacao (Payne et al., 2010).

En outre, l'application de la haute température lors du séchage permet un raccourcissement du temps de traitement, ce qui favorise la conservation des composés polyphénoliques.

Dans des études menées par des chercheurs avec un séchage artificiel à l'air chaud à 70◦ C, aucune diminution significative des teneurs en (-) - et (+) - catéchine ainsi que la teneur en polyphénols totaux n'a été observée. Par ailleurs, des teneurs

plus faibles en polyphénols totaux et (-) – épicatéchine ont été observées dans les fèves séchées au soleil (Hii et al, 2009).

4.2.4. Stockage

Les teneurs en flavan-3-ols de chocolats noirs ont été jugées stables sur des durées de conservation d'un an sous un stockage contrôlé et plus de 2 ans lors d'un stockage ambiant dans un laboratoire. Aussi, il fut rapporté par des chercheurs que certains flavan-3-ols (épicatéchine, oligomères et polymères de procyanidines) sont stables dans une salle de stockage (Hurst et al., 2008).

Le stockage après récolte peut avoir des effets variables sur la teneur en composés phénoliques dans les fèves de cacao brutes. Les changements qui se produisent au niveau de la teneur en polyphénols pendant le stockage des fèves ont été soulignés dans plusieurs travaux (Nazaruddin et al., 2006). Il a été rapporté que l'oxydation et la polymérisation de l'(-) - épicatéchine et ses produits d'oxydation peuvent jouer un grand rôle dans la dégradation de ces composés au cours des autres traitements des fèves de cacao et du stockage post-récolte (Nazaruddin et al., 2006 ; Hii et al., 2009). Les traitements pendant le stockage des fèves (de 5 à 15 jours) ont donné lieu à une quantité très réduite d'(-) - épicatéchine dans les fèves de cacao. Par ailleurs, des chercheurs ont rapporté que la prolongation de la durée de stockage n'affecte pas significativement la teneur en (+) - catéchine (Nazaruddin et al., 2006).

4.2.5. Torréfaction

Après fermentation et séchage, les fèves de cacao sont décortiquées et chauffées à différentes températures. Les différents degrés de torréfaction augmentent de manière significative la quantité de (+) - catéchine en raison de l'isomérisation d'(-) - épicatéchine (Colombo et al., 2012).

Des études ont abondé dans le même sens en indiquant que la teneur d'épicatéchine et de catéchine peut varier indépendamment les uns des autres. Il a été montré que le rapport de l'épicatéchine / catéchine (epi / cat) peut être associé au degré de transformation du cacao. Payne et al., (2010) ont également montré que la teneur en

épicatéchine a sensiblement chuté comme celle des fèves fermentées quand les fèves ont été torréfiées à 120 ° C.

Différents types de chocolat noir sont disponibles sur le marché avec des teneurs élevées en flavonoïdes. Ces chocolats sont produits avec des traitements thermiques réduits (Colombo et al., 2012).

En outre, il y a des fabricants qui produisent des chocolats à partir de fèves à haute teneur en flavonoïdes de l'Equateur et utilisent des méthodes de torréfaction spéciales qui préservent les flavonoïdes dans les fèves de cacao. En contrôlant le processus impliqué dans la préparation des chocolats ; un chocolat à haute teneur en flavonoïdes peut être produit avec jusqu'à 70% des flavonoïdes présents dans le produit fini (Colombo et al., 2012).

La torréfaction des fèves de cacao est aussi responsable de la perte des polyphénols, en particulier les flavonoïdes (Baba et al., 2001 ; Miller et al., 2006 ; Tomas-Barberan et al., 2007). Selon certaines études, au cours de la torréfaction, la dégradation de l'(-) - épicatéchine et de la (+) - catéchine a lieu (Schinella et al., 2010). Cependant, une température élevée provoque la transformation d'(-) - épicatéchine en (-) - catéchine dans une réaction d'épimérisation (Caligiani et al., 2007; Kofink et al., 2007; Aron et Kennedy, 2008).

Á l'instar de la fermentation, la torréfaction a aussi des effets sur la stéréochimie du cacao. En effet, la torréfaction a une influence sur la stéréochimie les flavonoïdes en particulier les flavan-3-ols. Dans une étude, des chercheurs ont torréfié des fèves à différentes températures. Ces chercheurs ont montré que les teneurs en (-) - épicatéchine et (+) – catéchine ont considérablement diminué. Par ailleurs, cette étude a aussi montré une augmentation de la (-) - catéchine. Il est important de souligner que la (-) - catéchine est le dernier composé à être formé lors de la fermentation (Hurst, 2011). Certains chercheurs ont également abondé dans le même sens. Dans leurs études, les fèves de cacao ont été torréfiées. Ces auteurs ont remarqué une baisse de la teneur en épicatéchine chez les fèves exposées à des températures au-dessus de 70°C. Par ailleurs, la teneur en catéchine chez les fèves torréfiées à 120°C avait considérablement augmenté. Ces résultats démontrent que la torréfaction supérieure à 70 °C génère des quantités significatives de (-) - catéchine, probablement due à l'épimérisation de l'(-) épicatéchine (Payne et al., 2010).

Certaines études menées ont également montré l'influence de la torréfaction des fèves de cacao sur la composition des monomères aux trimères flavanoliques, avec un accent particulier sur l'épimérisation. Cinq produits dimériques et deux produits trimériques potentiels d'épimérisation ont été détectés. Le degré de torréfaction du cacao lors de l'épimérisation a été montré comme étant une fonction de la température. Les données ont également montré des variations remarquables dans le changement de la teneur en flavanols. Les quantités de flavanols ont diminué respectivement d'environ 50% dans les fèves d'une variété et ont augmenté d'environ 30% dans les fèves d'une autre variété en dépit des mêmes conditions de torréfactions (Kothe et al., 2013).

Les principaux facteurs lors de la torréfaction, responsables de la dégradation des polyphénols sont un temps long et une haute température (Schinella et al., 2010). Kealey et al., (1998) ont montré que le traitement thermique des fèves de cacao à 127°C pendant 30 minutes a provoqué une diminution de 60% de proanthocyanidines. Une plus grande dégradation à 80% de ces composés a été démontré au cours du processus mené à 181°C (Kealey et al., 1998 ; Oliviero et al., 2009). Cependant De Brito et al., (2001) ont observé au cours de la torréfaction des fèves de cacao à 150°C pendant 30 minutes une diminution de 57% de la teneur en polyphénols totaux (Oliviero et al., 2009).

Pendant les procédés thermiques de traitement de fèves de cacao, la concentration d'antioxydants est réduite (Ortega et al., 2008 ; Hii et al., 2009).

Plus le cacao et le chocolat sont transformés plus les polyphénols sont perdus et tous leurs avantages pour la santé avec, car les polyphénols présents dans le cacao sont associés à ses effets santé. Ces dernières années, l'intérêt pour ces composants biologiquement actifs présents dans le cacao a considérablement augmenté en raison de leurs effets potentiellement bénéfiques sur la santé humaine (Ramiro-Puig et al., 2007 ; Visioli et al., 2009 ; Rusconi et Conti, 2010). Les études concernant les facteurs liés à la transformation influençant la biodisponibilité des polyphénols doivent être approfondies. Par ailleurs, un rapport doit être établi entre la teneur de ses composés et leur impact bénéfique sur la santé.

5. Pharmacologie et effets santé du cacao et ses produits dérivés.

5.1. Métabolisme et biodisponibilité des polyphénols du cacao

L'activité biologique des polyphénols du cacao dépend de leur biodisponibilité (Ramiro-Puig et al., 2009). La biodisponibilité des flavonoïdes chez les êtres humains est comprise entre 1% et 26%. Cette grande variabilité est également observée entre les différents composés tels que la quercétine, l'épicatéchine et les isoflavones (Hollman et al., 1997 ; Karr et al., 1997).

Les flavonoïdes circulant dans le plasma, y compris ceux dérivés du cacao, se trouvent principalement sous forme de dérivés conjugués : méthylés, glucuro ou sulfo conjugués ou des combinaisons de ceux-ci. Ils résultent des réactions de métabolisation I et II dans l'intestin grêle et le foie (Baba et al., 2000).

Afin de fournir une preuve concluante des effets santé des polyphénols du cacao dans la prévention des maladies humaines, il est essentiel de déterminer la nature et la distribution de ces composés après consommation. La biodisponibilité des polyphénols du cacao ingérés peut conduire à une exposition de l'organisme à ces composés bioactifs. Un certain nombre de facteurs influencent la biodisponibilité des polyphénols de cacao après leur consommation alimentaire et donc leur devenir dans l'organisme humain.

En général, la biodisponibilité des polyphénols est affectée par la structure chimique des polyphénols, la matrice alimentaire, les facteurs liés à la transformation des aliments et les interactions avec d'autres constituants du régime alimentaire, ainsi qu'avec certains facteurs individuels (les caractéristiques génétiques, le sexe et l'âge, l'état physiologique, le microbiote et l'activité enzymatique dans le côlon) (D'Archivio et al., 2010 ; Tomas-Barberan, 2012 ; Ackar et al., 2013). Les principaux facteurs à prendre en compte dans la biodisponibilité des polyphénols du cacao sont en particulier la biodisponibilité dans la nourriture, leur métabolisme et absorption dans le tractus gastro-intestinal, leur distribution cellulaire et tissulaire après absorption et leur forme chimique biologiquement disponible au niveau des cellules et des tissus et leur potentiel métabolisme au niveau cellulaire (Colombo et al., 2012).

La majorité des recherches et des études transversales concernant les effets santé du cacao a été effectuée en utilisant des boissons à base de cacao ou du chocolat (Arranz et al., 2013).

Plusieurs chercheurs ont fait des travaux sur le métabolisme et la biodisponibilité des polyphénols du cacao (Manach et al., 2004 ; Manach et al., 2005 ; Rimbach et al., 2009). Les composés étudiés lors de ces études sont les flavanols, l'épicatéchine et procyanidines, car ce sont les principaux polyphénols bioactifs du cacao dus à la fois à leur abondance et leur pertinence pour les activités biologiques et leurs structures physicochimiques (Bravo,1998 ; Heim et al., 2002 ; Corcoran et al., 2012).

5.1.1. Métabolisme et biodisponibilité des flavanols

Lors de l'ingestion de produits à base de cacao contenant des monomères et polymères de flavanols de cacao, ces polyphénols sont rapidement absorbés (Wang et al., 2000 ; Schramm et al., 2001). Les flavanols et les procyanidines sont relativement stables dans le milieu gastrique mais ils peuvent subir des modifications importantes au niveau de l'intestin conduisant à une famille diversifiée de molécules bioactives. Lors de la digestion et du transfert à travers l'intestin grêle et dans le foie, les flavanols sont rapidement métabolisés en phase I et II de biotransformations sous diverses formes (O-glucuronidées et O-méthylés O-sulfaté).

Chez les êtres humains qui consomment le cacao, les taux plasmatiques d'épicatéchines non méthylés tels que l'épicatéchine-7-sulfate et leurs métabolites méthylés tels que la 3'-O-methylepicatechine ont été identifiés dans les liquides biologiques à des concentrations micro-molaire 1 h après l'ingestion du cacao. Des études métaboliques ont confirmé chez l'homme la présence de ces conjugués dans le plasma et l'urine. Les flavanols ou métabolites de flavanols non métabolisés peuvent exercer des effets biologiques dépendant essentiellement du métabolisme des flavanols et de leurs présences dans le tissu cible.

L’absorption et le métabolisme des flavanols du cacao sont influencés par certaines matrices alimentaires. En effet, la matrice alimentaire est un facteur important qui peut interférer sur la biodisponibilité des polyphénols de cacao. La poudre de cacao dissoute dans le lait ne change pas la biodisponibilité des flavonoïdes du cacao en poudre chez l'homme en bonne santé (Roura, et al., 2007). Cependant, l'absorption des flavonols chez l'homme peut être augmentée de façon significative par la consommation simultanée d'hydrates de carbone (Schramm et al., 2003).

Ainsi, une bonne compréhension de la façon dont les matrices alimentaires peuvent influencer l'absorption des flavanes-3-ols peut servir d’indice pour concevoir et développer des produits fonctionnels qui influencent positivement l'absorption de flavan-3-ols et par extension leur bioactivité (Neilson et Ferruzzi, 2011).

L'effet du lait sur la biodisponibilité des flavonoïdes du cacao issus de la phase II des métabolites de l'épicatéchine a fait l'objet de discussions importantes (Roura et al., 2007 ; Badrie et al., 2015). En effet, le lait a des effets négligeables sur la pharmacocinétique plasmatique de certains métabolites des flava-3-ols (Mullen et al., 2009). Aucun effet du lait n’a été observé sur d’autres métabolites (O-méthyl- épicatéchine-O-sulfate) contenus dans le cacao. Ces auteurs ont également rapporté que le lait réduit de manière significative l’excrétion de certains métabolites urinaires de 18,3% à 10,5% (Badrie et al., 2015). Ces métabolites n’ont pas été identifiés dans cette étude.

Une étude a montré que l’épicatéchine glucuronide et l’épicatéchine sulfate ont été détectées dans l'urine excrétée après ingestion de deux boissons à base de cacao (40 g de poudre de cacao dissous dans 250 ml de lait écrémé et 250 ml de lait entier) (Roura et al., 2008).

Une autre étude portant sur l'effet du lait sur l'excrétion urinaire d'acides phénoliques microbiens après consommation de cacao en poudre chez l’homme a indiqué que sur 15 métabolites évalués, l'excrétion de neuf acides phénoliques a été affectée par la consommation de lait (Urpi-Sarda et al., 2010).

Le lait affecte partiellement la formation d'acides phénoliques microbiens issus de la dégradation d'autres composés présents dans la poudre de cacao (Urpi-Sarda et al., 2010).

Le temps maximal des flavanols du cacao ne dépasse pas 3 h et leur élimination du plasma dans la plupart des cas s'achève 6 h après la consommation de cacao (Holt et al., 2002 ; Mullen et al., 2009). Cependant, certains métabolites (catéchines) disparaissent tardivement et restent dans la circulation systémique pendant 24 h (Baba et al., 2000 ; Actis-Goretta et al., 2012). L'apparition rapide des polyphénols plasmatiques démontre que les polyphénols détectés sont principalement absorbés dans l'intestin grêle. Certains auteurs ont abondé dans le même sens (Deprez et al., 2001 ; Spencer et al., 2001 ; Actis-Goretta et al., 2013 ;).

Par ailleurs, l'absorption des flavanols dans l'intestin grêle est partielle. Non seulement elle dépend de la chimie de ces composés mais aussi de leur isomérie et stéréoisomérie structurale (Ottaviani et al., 2011). Les catéchines et épicatéchines ont des niveaux d'absorption différents (Steinberg et al., 2002 ; Holt et al., 2002) et les concentrations plasmatiques des formes (+) et (-) de catéchine se sont révélés être différentes après consommation de produits à base de cacao (Donovan et al., 2006 ; Ritter et al., 2010). Le niveau d'absorption dépend du degré de polymérisation qui limite également leur biodisponibilité (Bravo, 1998).

La chiralité est un facteur à prendre en compte dans la biodisponibilité des polyphénols. La forme (+) - catéchine est 10 fois plus absorbée que la forme (-) - catéchine (Cooper et al., 2008).

Dans le tractus gastro-intestinal, les flavanols (monomères) provenant du cacao absorbé sont reconnus par l'organisme comme des xénobiotiques et sont largement transformés en divers métabolites (Donovan et al., 2006). Entre autres l'(-) épicatéchine en sulfate, les glucuronides ou les formes de méthyle conjugués en sont les principales formes représentant environ 33, 28 et 33% du total des métabolites de l'épicatéchine dans le plasma et l'urine de l'homme (Actis-Goretta et al., 2012 ; Ottaviani et al., 2012).

En raison du métabolisme gastro-intestinal et hépatique, les métabolites conjugués sont destinés à être éliminés rapidement de l'organisme humain. Les flavanols du cacao absorbés dans l'intestin grêle sont normalement éliminés après une durée maximale de 24 h après consommation comme la majorité des polyphénols alimentaires. Une grande partie des flavanols non absorbés, par exemple des polymères et monomères sont soumis à des activités cataboliques de la microflore colique (Monagas et al., 2010 ; Stoupi et al., 2010 ;

Fogliano et al., 2011). Une autre partie non absorbée peut également s'accumuler dans le bas du tube digestif pour être finalement excrétée dans les fèces (Scalbert et al., 2000 ; Depeint et al., 2002 ; Monagas et al., 2010).

Les concentrations plasmatiques de flavonols varient considérablement selon les métabolites de flavanols, certains d'entre eux peuvent atteindre des niveaux micromolaires en réponse à la consommation de polyphénols de cacao (Urpi-Sarda et al., 2009).

En outre les glucides, les protéines (Schramm et al., 2003 ; Ferruzzi et al., 2012) et les produits à base de cacao à l'état physique (liquide ou solide) (Neilson et al., 2009 ; Neilson et Ferruzzi, 2011) peuvent également interférer dans le mécanisme d'absorption des flavanols, affectant la bioaccessibilité et la biodisponibilité des polyphénols de cacao chez l'homme.

La présence de sucres et des huiles augmente la biodisponibilité des polyphénols tandis que celle des protéines la diminue (Tomas-Barberan, 2012). Neilson et al., (2010) ont montré que les protéines du lait et du saccharose modulent le métabolisme, la pharmacocinétique plasmatique et la biodisponibilité des catéchines à partir de produits de confiserie au chocolat. Ils ont constaté que les protéines du lait réduisent la biodisponibilité de l'épicatéchine dans la confiserie de chocolat. Les travaux de Schramm et al., (2003) ont observé l'absorption accrue des flavanols aglycones quand ils ont été consommés immédiatement après un repas riche en glucides. Par ailleurs Peters et al., (2010) ont abondé dans le même sens.

Bien que les niveaux de circulation des métabolites polyphénoliques du cacao semblent être dépendants de la dose (Richelle et al., 1999 ; Wang et al., 2000), une grande variabilité interindividuelle principalement définie par les phénotypes métaboliques individuels (Rice-Evans, 2001 ; Martin et al., 2009) a été signalée dans pratiquement toutes les études de biodisponibilité. De grandes différences interindividuelles dans la bioconversion colique des flavanols attribuées à la composition du microbiote colique individuel, a également un impact sur la variation de la biodisponibilité des polyphénols de cacao (Van Duynhoven et al., 2011 ; Bolca et al., 2013). Cette variabilité est difficile à contrôler au niveau de la population en raison de la nature de la matière ; par conséquent il reste encore l'une des principales préoccupations dans les études interventionnelles concernant les activités bénéfiques pour la santé des polyphénols, car elle compromet l'estimation précise et l'interprétation correcte des résultats obtenus.

5.1.2. Métabolisme et biodisponibilité des procyanidines

Des études ont montré que des procyanidines et des monomères ont pu être détectés dans le plasma dès 30 mn et la concentration plasmatique maximale de ces composés a été atteinte environ deux heures après l'ingestion du cacao (Wang et al., 2000 ; Schramm et al., 2001). Mais on ne sait pas dans quelle mesure les oligomères des procyanidines du cacao sont absorbés. Cependant, l'activité biologique des procyanidines plus élevée peut être au moins partiellement attribuable à leurs produits de dégradation y compris les acides phénoliques (Crozier et al., 2009).

Des composés comme les isoflavones et les acides phénoliques ont une absorption plus élevée, suivie par les catéchines, les flavanones, les glucosides et les quercétines alors que les proanthocyanidines, les anthocyanidines et les catéchines sont mal absorbées (Han et al., 2007).

Il y a des avis différents concernant la biodisponibilité des composés phénoliques en général et ceux dérivés du cacao en particulier.

Des études supplémentaires visant à déterminer la biodisponibilité des dimères et oligomères les plus importants des polyphénols du cacao sont nécessaires en raison de leurs effets biologiques potentiellement différents.

Le cacao possède de très nombreux effets santé sur différents systèmes de l’organisme. Les effets sur le syndrome métabolique et ses complications seront principalement développés dans la partie suivante.

5.2. Effets du cacao et produits dérivés sur le syndrome métabolique et ses complications

5.2.1. Syndrome métabolique (Smet)

5.2.1.1. Historique et contexte du Smet

Le concept du syndrome métabolique existe depuis au moins 80 ans (Cameron et al., 2004 ; Eckel et al., 2005). Cet ensemble de perturbations métaboliques et tous les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires ont été décrits pour la première fois dans les années 1920 par Kylin, un médecin suédois, sous la forme d'une association d'hypertension, d'hyperglycémie et d'autres pathologies (Kylin, 1923 ; Eckel et al., 2005). Par ailleurs, deux concepts biomédicaux clés ont été formulés en 1988 (Bol et al., 2009 ; Bruce et Hanson, 2010). Le scientifique Reaven a introduit le concept du syndrome d'insulino-résistance (Reaven, 1988 ; Campion et al., 2009) qui théorisait que l'insulino-résistance était la cause de l'intolérance au glucose, de l'hyperinsulinisme, de l'augmentation des lipoprotéines de très basses densités et de l'hypertension. Vingt ans plus tard, le syndrome d'insulino-résistance est devenu le syndrome métabolique, une combinaison de déterminants du risques cardiovasculairse, notamment l'obésité, l'intolérance au glucose et la dyslipidémie (y compris l'hypertriglycéridémie, augmentation des acides gras et du cholestérol-HDL). En outre, un certain nombre d'autres caractéristiques ont été associées à l'apparition du Smet, comme la stéatose hépatique non alcoolique, le syndrome des ovaires polykystiques, l'athérosclérose, l'état pro-inflammatoire et le stress oxydatif (Bruce et Hanson, 2010). La prévalence du Smet augmente rapidement dans le monde entier, principalement en raison de l'épidémie d'obésité. Dans de nombreux cas, l'utilisation de l'algorithme Smet (en particulier les mesures de tour de taille) présente une méthode relativement simple pour calculer un risque accru de maladies cardiovasculaires avec la possibilité de prédire des manifestations cliniques autrement non détectées (Ferrannini, 2007).

Néanmoins, il existe un débat entourant l'étiologie et la pathogenèse du Smet, car un seul mécanisme unificateur reste à découvrir (Ferrannini, 2007). Des analyses ont mis en évidence l'obésité, l'accumulation de graisses ectopiques et un état inflammatoire de bas grade du Smet (Bruce et Hanson, 2010). Cependant, toutes les personnes obèses ne

développent pas de Smet et toutes les personnes atteintes de Smet ne sont pas obèses. Il est donc probable que ces caractéristiques et le Smet lui-même ont une étiologie multifactorielle impliquant des interactions complexes entre le fond génétique, et le mode de vie, en particulier hygiéno-diététique du sujet. En effet, les études considérant le Smet comme simplement un déséquilibre entre l'apport énergétique et la dépense n'ont pas réussi à élucider des stratégies thérapeutiques utiles (Campion et al., 2009). Par conséquent, le centre d'intérêt de la recherche s'est déplacé vers une approche biochimique et moléculaire qui se concentre sur les gènes métaboliques clés et leur contrôle transcriptionnel qui, lorsqu'il est perturbé, augmente le risque de développer le Smet et ses séquelles cliniques. Un indice de cette prédisposition du Smet vient du deuxième de ces concepts clés, les bases de prédisposition génétique de la santé et de la maladie (Bruce et Hanson, 2010).

5.2.1.2. Pré-disposition génétiques et développementales au Smet

Les données épidémiologiques précoces sont concentrées sur des études cliniques rétrospectives associant une mauvaise nutrition au cours du développement du sujet à un risque accru de maladies cardiovasculaires (Barker et al., 1990 ; Barker et al., 1993). Les effets néfastes de cette inadéquation sont observés dans les sociétés en développement dont la richesse augmente et où les populations humaines subissent des changements socio-économiques. En outre, une grande partie des données a été générée à partir d'études expérimentales sur les animaux (Vickers et al., 2003 ; Bispham et al., 2005 ; Bruce et Hanson, 2010). Un certain nombre de données expérimentales suggérent que des modifications des protéines fœtales peut modifier le processus d'expansion des cellules des îlots pancréatiques conduisant à une petite masse de cellules bêta à la naissance et des effets néfastes persistants sur l'homéostasie du glucose (Boujendar et al., 2002). Des preuves moléculaires ont montré qu'une restriction protéique maternelle suivie d'une croissance de rattrapage de la progéniture peut altérer les profils d'expression génique des adipocytes et que les changements physiologiques qui persistent jusqu'à l'âge adulte contribuent à l'apparition des caractéristiques de Smet (Bruce et Hanson, 2010).

Ces conditions deviennent très répandues dans les sociétés occidentales et peuvent perpétuer les cycles transgénérationnels de la maladie métabolique. Selon des

estimations aux États-Unis, un tiers des femmes en âge de procréer sont obèses (Bruce et Hanson, 2010).

5.2.1.3. Définition et concept

Le Smet est un ensemble d'anomalies métaboliques communs qui résulte de la prévalence croissante de l'obésité (Eckel et al., 2005). Ce trouble est défini de diverses manières, mais de nouvelles définitions sont applicables dans le monde entier. La physiopathologie semble être largement attribuable à la résistance à l'insuline avec un flux excessif d'acides gras impliqués (Eckel et al., 2005). Le risque accru de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires exige une attention thérapeutique pour les personnes à risque élevé. Au cours des deux dernières décennies, une augmentation frappante du nombre de personnes atteintes du Smet dans le monde a eu lieu. Cette augmentation est associée à l'épidémie mondiale d'obésité et de diabète (Zimmet et al., 2001 ; Eckel et al., 2005). Avec le risque élevé non seulement de diabète mais aussi de maladies cardiovasculaires dues au Smet (Grundy et al., 2004 ; Eckel et al., 2005), il convient de mettre en place de façon urgente des stratégies pour prévenir l'épidémie mondiale (Zimmet et al., 2001 ; Eckel et al., 2005). Le Smet est un maître du déguisement puisqu'il peut se présenter de diverses manières selon les différentes composantes qui constituent le syndrome. Le Smet est également connu sous le nom de syndrome X (Reaven, 1988), le syndrome d'insulino-résistance (DeFronzo et al., 1991) et le quartet mortel (Kaplan, 1989).

5.2.1.4. Définitions du Smet selon des organismes

Un certain nombre de groupes d'experts ont tenté d'élaborer une définition unificatrice pour le Smet. Les définitions les plus largement utilisées ont été produites par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le Groupe européen pour l'étude de la résistance à l'insuline (GEERI) et le Programme national de formation sur le cholestérol - Troisième panel de traitement des adultes (NCEP ATP III) (OMS, 1999 ; NCEP, 2001) et d'autres organismes. Tous ces groupes sont d'accord sur les composants de base du Smet : l'obésité, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'hypertension. Cependant, ils fournissent différents critères cliniques pour identifier un tel groupe. Par exemple, contrairement à certaines définitions, la définition de l'ATP III ne nécessite pas

obligatoirement une régulation du glucose altérée ou une résistance à l'insuline en tant que composant essentiel. De plus, les niveaux établis pour chaque composant et la combinaison des composants requis pour diagnostiquer le Smet sont légèrement différents dans ces trois recommandations.

5.2.1.4.1. Définition de l'Organisme Mondial de la Santé (OMS)

Les recommandations initiales de l'OMS n'ont pas été conçues pour être une définition exacte, mais ont été formulées comme une ligne de conduite à s'améliorer à l'avenir. Les recommandations faisaient partie d'un rapport de l'OMS sur la définition, le diagnostic et la classification du diabète. La définition de l'OMS est basée sur l'hypothèse que la résistance à l'insuline est l'un des principaux contributeurs sous-jacents au Smet. Il nécessite donc une résistance à l'insuline (ou son substitut probable, une régulation du glucose altérée, c'est-à-dire une tolérance au glucose altérée ou un diabète) pour être présent pour le diagnostic. En plus de la résistance à l'insuline, au moins deux autres composants doivent également être présents pour diagnostiquer le Smet. Les seuils de pression artérielle systolique et diastolique ont été modifiés entre la publication provisoire en 1998 et la publication définitive en 1999 (OMS, 1999).

Les critères de travail développés par l'OMS ont été critiqués. L'inclusion de la microalbuminurie en tant que composant est considérée par certains comme controversée. De plus, l'inclusion d'une mesure de la résistance à l'insuline est également critiquable, car déterminer si un individu est ou non dans le quartile inférieur de sensibilité à l'insuline est pratiquement impossible en pratique clinique ou dans des études épidémiologiques (Alberti et al.,1998). Enfin, la mesure la plus appropriée de l'obésité centrale est également contestée. Bien que le rapport taille / hanche puisse contenir des informations pertinentes pour les paramètres de la maladie, il s'agit d'un indice de l'accumulation relative de la graisse abdominale. Le tour de taille est un indice grossier mais pertinent de la quantité absolue de graisse abdominale et il a été trouvé que sa corrélation avec les dépôts graisseux viscéraux mesurée par tomodensitométrie était meilleure (Pouliot et al., 1994).

Tableau 18. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon l'OMS 1999 (Alberti et al.,1998 ; Kaur, 2014)

Résistance à l'insuline	Altération de la tolérance au glucose, Altération de la glycémie à jeun, Diabète sucré de type 2 ou diminution de la sensibilité à l'insuline plus 2 des élements suivantes :
Poids	Hommes : rapport taille-hanches> 0,90 ; femmes : rapport taille-hanches> 0,85 et / ou indice de masse corporelle > 30 kg / m2
Lipides	Tryglicérides ≥ 150 mg / dL et / ou HDL-C <35 mg / dL chez les hommes ou <39 mg / dL chez les femmes
Tension artérielle	≥140/90mmHg
Glucose	Altération de la tolérance au glucose, altération de la glycémie à jeun, diabète sucré de type 2
Autres	Taux d'excrétion urinaire de> 20 mg / min ou albumine : rapport de créatinine> 30 mg / g.

5.2.1.4.2. Définition du Groupe Européen pour l'Etude de la Résistance à l'Insuline (GEERI)

À la suite de la publication de la définition de l'OMS en 1999, le GEERI a proposé une version modifiée pour les sujets non diabétiques, plus simple à utiliser dans les études épidémiologiques puisqu'elle ne nécessite pas de clamp euglycémique pour mesurer la sensibilité à l'insuline (Balkau et al., 1999). Le GEERI a proposé l'utilisation de taux d'insuline à jeun pour estimer la résistance à l'insuline et l'altération du glucose à jeun comme substitut de l'intolérance au glucose. Il présentait également des seuils légèrement modifiés pour l'hypertension, les triglycérides, le cholestérol, les lipoprotéines de haute densité et la mesure de l'obésité centrale en fonction du tour de taille.

Tableau 19. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon selon le GEERI (Balkau et al., 1999 ; Kaur, 2014).

Résistance à l'insuline	Insuline plasmatique > 75ème centile plus 2 des suivants
Poids	Tour de taille ≥94 cm chez les hommes ou ≥ 80 chez les femmes
Lipides	Triglycérides ≥ 150 mg / dL et / ou HDL-C <39 mg / dL chez les hommes ou les femmes
Tension artérielle	≥140 / 90mmHg ou sur l'hypertension Rx
Glucose	Altération de la tolérance au glucose ou Altération de la glycémie à jeun (mais sans diabète)

5.2.1.4.3. Définition du programme national de traitement du cholestérol III (NCEP : ATP III, 2001) (Kaur, 2014)

La définition de l'ATP III a été présentée en 2001 dans le cadre d'un programme éducatif pour la prévention des maladies coronariennes. Cette définition a été conçue pour faciliter le diagnostic en pratique clinique et différait de deux façons importantes des autres définitions. Premièrement, il ne comportait pas de mesure de la résistance à l'insuline en tant que composant, et deuxièmement, il n'était pas « centré sur le glucose » et traitait les anomalies du glucose d'une importance égale avec les autres composants pour établir le diagnostic. Les lignes directrices ATP III indiquent que le Smet peut être diagnostiqué quand une personne a trois ou plus de cinq composants. Ces composants sont : l'obésité centrale, une élévation du taux de triglycérides, un taux de cholestérol-HDL réduit, une

tenssion artérielle élevée et une glycémie à jeun élevée. Fait important, la définition de l'ATP III comprend le tour de taille comme mesure de l'obésité.

Tableau 20. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selonl'ATP III (Cleeman et al., 2001 ; Kaur, 2014).

Résistance à l'insuline	Aucune, mais 3 des 5 caractéristiques suivantes
Poids	Tour de taille ≥102 cm chez les hommes ou ≥88 chez les femmes
Lipides	Tryglicérides ≥ 150 mg / dL HDL-C <40 mg / dL chez les hommes ou < 50 mg / dL chez les femmes
Tension artérielle	≥130/85mmHg
Glucose	> 110mg / dL (comprend le diabète)

5.2.1.4.4. Définition de l'Association américaine d'endocrinologie clinique (AACE)

L'AACE a fait une communication sur le « syndrome de résistance à l'insuline » (ACETFIR, 2003). Dans ce document, plusieurs facteurs sont listés comme identifiant les anomalies du syndrome. Ceux-ci comprennent des taux élevés de triglycérides, un cholestérol-HDL réduit, une tension artérielle élevée et une glycémie élevée à jeun et post-charge. Des facteurs supplémentaires qui augmentent la probabilité que le syndrome soit présent, tels que l'obésité et l'hypertension, sont également énumérés. La déclaration de l'AACE ne donne pas délibérément de définition spécifique du syndrome et permet au diagnostic de s'appuyer sur un jugement clinique.

Tableau 21. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon l'AACE, 2003 (Einhorn et al., 2003 ; Kaur, 2014)

Résistance à l'insuline	Altération de la tolérance au glucose, Altération de la glycémie à jeun plus l'un des éléments suivants en fonction du jugement clinique
Poids	Indice de masse corporelle ≥ 25 kg/m2
Lipides	Tryglicérides ≥ 150 mg / dL HDL-C <40 mg / dL chez les hommes ou < 50 mg / dL chez les femmes
Tension artérielle	≥130/85mmHg
Glucose	Altération de la tolérance au glucose, Altération de la glycémie à jeun (mais sans diabète)
Autres	Autres caractéristiques de la résistance à l'insuline

5.2.1.4.5. Définition de la Fédération Internationale du Diabète (FID)

L'objectif principal de l'atelier de la FID était de produire un outil de diagnostic simple à utiliser dans la pratique clinique et dans la recherche dans le monde entier. Cela devrait faciliter une meilleure compréhension du syndrome et cibler les soins aux personnes qui bénéficieraient de la réduction du risque cardiovasculaire. Dans cette optique, il a été décidé d'utiliser comme point de départ la définition de l'ATP III de 2001, la modifier et de la mettre à jour pour refléter les objectifs actuels (Alberti et al., 2006). Par conséquent, bien qu'il soit reconnu que la résistance à l'insuline est un composant important du Smet, sa mesure n'est pas essentielle à la nouvelle définition car elle est difficile à mesurer dans la pratique clinique quotidienne, alors que l'obésité abdominale est beaucoup plus facile à mesurer.

Tableau 22. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon FID (FID, 2005 ; Kaur ; 2014)

Résistance à l'insuline	Aucune
Poids	Augmentation de l'indice de masse corporelle (spécifiques à la population) plus 2 des éléments des suivants
Lipides	Tryglicérides ≥ 150 mg / dL ou Tryglicérides. HDL-C <40 mg / dL chez les hommes ou <50 mg / dL chez les femmes ou sur HDL-C
Tension artérielle	≥ 130mmHg systolique ou ≥ 85 mm Hg diastolique ou sur l'hypertension Rx
Glucose	≥100mg / dL (diabète inclus)
Autres	Autres caractéristiques de la résistance à l'insuline

5.2.1.4.6. Définition de l'American Heart Association (AHA)

Les critères de définition du NCEP-ATP III ont été confirmés par l'AHA en 2005 avec quelques modifications.

Tableau 23. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon l'AHA 2005.

Trois critères parmi les suivantes :	
Obésité abdominale : tour de taille	≥ 102 cm pour les hommes
	≥ 88 cm pour les femmes
Dyslipidémie ou traitement de l'anomalie lipidique	Triglycérides ≥1,7 mmol / L
	HDL-C < 1,03 mmol /L pour les hommes
	< 1,30 mmol / L mmol / L pour les femmes
Hypertension artérielle systolique ou diastolique ou traitement anti-hypresseur	Pression arterielle systolique ≥ 130
	Pression arterielle diasystolique≥ 85
Glycémie à jeun ou traitement de l'anomalie	≥ 5,6 mmol / L

5.2.1.4.7. Définition de l’FID et de l’AHA/NHLBI

Afin de fournir plus de cohérence dans les soins cliniques et la recherche des patients vivants avec le Smet ; FID, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHBLI), AHA, la Fédération mondiale du coeur et l'Association internationale pour l'étude de l'obésité ont publié une déclaration commune en 2009 qui a fourni une définition "harmonisée" du Smet (Alberti et al., 2009 ; Lam et LeRoith, 2015). Selon cette déclaration conjointe, un diagnostic du Smet est posé lorsque 3 des 5 facteurs de risques suivants sont présents :

Tableau 24. Critères diagnostiques proposés pour le diagnostic clinique du Smet selon l’FID et l’AHA/NHLBI (Lam et LeRoith, 2015).

Mesure	Coupe de points par catégories
Tour de taille	Définitions spécifiques à la population et au pays
Triglycérides	≥ 150 mg / dL
Cholestérol lipoprotéique à haute densité (HDL-c)	Hommes <40 mg / dL Femmes <50 mg / dL
Pression artérielle	≥ 130 / ≥85
Glucose à jeun	≥ 100 mg / dL

5.2.1.5. Causes du Smet

5.2.1.5.1. Sédentarité

Etre sédentaire signifie ne pas faire suffisamment d'exercice physique régulier. En dessous, d'une activité équivalente à une demi-heure (30 mn) de marche par jour, on est considéré comme sédentaire (OMS). Ce qui compte, c'est la régularité. En effet, une personne qui monte 5 étages 7 jours sur 7 est moins sédentaire qu'une personne qui monte 35 étages une fois par semaine. C'est aussi le type d'effort : on peut aller et venir toute la journée dans un bureau et être sédentaire. En revanche, faire le ménage toute la journée n'est pas de la sédentarité. Au niveau mondial, près de 31% des adultes âgés de 15 ans et plus manquent d'activité physique en 2008 (hommes 28% et femmes 34%). Environ 3,2 millions de décès chaque année sont attribuables au manque d'exercice. En 2008, la prévalence de la sédentarité était la plus élevée dans les régions des Amériques et de la Méditerranée orientale (OMS). Dans ces deux régions, près de 50% des femmes étaient trop sédentaires, tandis que la prévalence de la sédentarité chez les hommes s'élevait à 40% dans le continent Américain et à 36% en Méditerranée orientale. La région de l'Asie du sud-est avait les pourcentages les plus faibles (15% pour les hommes et 1% pour les femmes). Dans l'ensemble des régions les hommes étaient plus actifs que les femmes physiquement, la différence la plus nette en matière de prévalence entre les deux sexes étant observée en méditerranée orientale. Cela était également le cas dans pratiquement tous les pays. Plusieurs raisons expliquent ce mode de vie. En effet, les niveaux actuels de sédentarité sont en partie dus à un manque de pratique de l'exercice physique pendant les temps de loisirs et à une augmentation des comportements sédentaires au cours des activités professionnelles et domestiques. De même, une augmentation de l'utilisation des modes de transport « passifs » a également été associée à la baisse des niveaux d'activité physique. La sédentarité fait partie des principales causes du Smet car elle participe à l'accumulation des graisses abdominales. Par ailleurs, les risques associés à la sédentarité sont loin d'être négligeables. Le professeur Michel Galinier, chef du service de cardiologie au CHU de Toulouse disait qu'au-delà de quatre heures passées en position assise par jour, chaque nouvelle heure augmente la mortalité de 2 %, et au-delà de huit heures en position assise par jour, la mortalité augmente de 8 %. Au-delà de dix heures par jour, elle est même majorée de 34 %. Rester assis peut donc être considéré comme étant potentiellement mortel. Rester debout toute la journée

est différent car cela fait travailler a minima les muscles des jambes et contribue donc à faire diminuer la mortalité cardiovasculaire. Ainsi, le simple fait de passer de la position assise à debout, un quart du temps de la journée, diminue d'environ 21 % la mortalité cardiovasculaire par conséquent le risque de développer les pathologies du Smet.

5.2.1.5.2. Alimentation

L'alimentation désigne, par définition, l'action de s'alimenter. Elle relève donc de la nourriture et par conséquent des aliments qui permettent à un organisme de fonctionner, de survivre. Les aliments qui composent notre alimentation peuvent être classés en 7 groupes en fonction de leurs apports en constituants alimentaires caractéristiques. Les vitamines, les minéraux, les antioxydants et d'autres phytonutriments devraient être obtenus par l'alimentation plutôt que par des suppléments, en particulier en raison des risques et des déséquilibres associés aux apports excessifs de nutriments isolés (aliments riches en légumes, légumineuses, grains entiers, fruits et noix) (Vaskonen, 2003 ; ADA Reports 2004).

Le déséquilibre alimentaire peut être à l'origine de l'apparition de symptômes caractéristiques du Smet. La consommation fréquente de boissons gazeuses et sucrées, de viandes grasses, de charcuterie et de pâtisseries favorise l'apparition des facteurs du Smet. Près d'un quart des jeunes et des adultes européens vont vers ce genre de problème si l'on ne s'en occupe pas. C'est déjà ce qui se passe pour près de la moitié des plus de 60 ans aux Etats-Unis en raison de la "malbouffe". Cette "malbouffe" est constituée de "mauvais gras" dans lequel se perdent les hormones, notamment l'insuline, d'où une résistance à l'insuline : cette hormone, au lieu de jouer son rôle de contrôle de la glycémie, fait entrer encore plus de gras et de sucre dans les cellules graisseuses de stockage. Elle s'y noie et parallèlement la glycémie ne cesse de monter. Ce même gras se concentre dans le foie, provoque une hépatite de stase graisseuse qui conduit au foie gras. Ces conditions créent un désordre métabolique dans l'organisme et favorisent l'apparition de maladies chroniques et du Smet.

5.2.1.5.3. Inactivité physique

L’inactivité physique est un état de repos physique relativement complet qui ne stimule pas suffisamment les organes humains pour les entretenir et réguler leur fonctionnement. L’inactivité physique est de plus en plus répandue dans les comportements des populations mondiales. C’est est un facteur de risque important pour les maladies chroniques aux conséquences graves. Ses déterminants sont individuels et socio-environnementaux. Le simple fait de réinstaurer des déplacements à pied et du mouvement dans la vie de tous les jours améliore la santé, la qualité de vie et la longévité de la plupart des adultes.

Les personnes inactives réalisent au maximum les actes de la vie quotidienne. La corrélation entre inactivité physique et mauvaise santé est un fait établi. Plus les personnes sont inactives, plus elles sont en mauvaise santé (OMS, 2002). L’inactivité physique des adultes est un phénomène social en extension qui gagne du terrain sur la sédentarité. De plus, au cours des dernières années, la condition physique des jeunes s’est détériorée à tel point qu’un nombre croissant d’entre eux présente des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2 (CSKQ, 2011).

Le comportement d’inactivité physique persistant pendant plusieurs années s’associe à un risque d’altérer la santé ou de raccourcir la vie (Sittarame et al., 2013). En Europe, la morbidité imputable à l’inactivité physique représente 3,5% de la morbidité globale et 5 à 10% des décès, selon le rapport 2002 de l’OMS (OMS, 2002). C’est la quatrième cause de mortalité au monde. Les conséquences biomédicales les mieux documentées sont le développement ou l’aggravation des maladies cardiovasculaires et métaboliques. L’inactivité physique est un cofacteur du développement des multiples affections chroniques (Sittarame et al., 2013).

L’inactivité physique entraîne de sérieuses répercussions sur la productivité et le nombre d’années de vie de personnes en bonne santé (GACPAISPAH, 2010). La première cause de mortalité évitable dans les pays occidentaux est désormais devenue depuis 2012 l'insuffisance d'activité physique et ceci derrière le tabac. L'insuffisance d'activité physique tue davantage que le tabac. L'OMS précise que l'inactivité physique est responsable de 10% des décès évitables en Europe.

De plus, une personne sur dix dans le monde meurt chaque année en raison de l'inactivité physique (Lee et al., 2012). L'inactivité physique est un facteur de risque de l'embonpoint, de l'obésité et de plusieurs maladies chroniques. Cependant, une activité physique régulière et soutenue diminue l'apparition des facteurs de risques du Smet (Cook et al., 2003). La combinaison de perte de poids et d'exercice pour réduire l'incidence du diabète de type 2 chez les patients souffrant d'intolérance au glucose ne devrait pas être écartée (Tuomilehto et al., 2001). Non seulement l'augmentation de l'activité physique aide à la perte de poids mais elle a également des effets bénéfiques sur les autres facteurs de risque métaboliques et surtout réduit le risque des maladies cardiovasculaires artérioscléreuses globales (Franklin et al., 2004).

5.2.1.6. Mécanismes d'actions

5.2.1.6.1. Résistance à l'insuline

L'hypothèse la plus acceptée et la plus unificatrice pour décrire la physiopathologie du Smet est la résistance à l'insuline. La résistance à l'insuline a traditionnellement été définie avec une vue glucocentrique, c'est-à-dire lorsqu'un défaut d'action de l'insuline entraîne une hyperinsulinémie à jeun pour maintenir l'euglycémie (Eckel et al., 2005). Cependant, avant même qu'une hyperinsulinémie à jeun ne se développe, il existe une hyperinsulinémie postprandiale.

L'une des causes majeures du développement de la résistance à l'insuline est la surabondance d'acides gras circulants. L'insuline est importante à la fois pour l'antilipolyse et pour la stimulation de la lipoprotéine lipase. Il faut noter que la voie d'action de l'insuline la plus sensible est l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux (Jensen et al., 1989 ; Eckel et al., 2005). Ainsi, lorsque la résistance à l'insuline se développe, la lipolyse des molécules de triacylglycérol stockées dans le tissu adipeux produit plus d'acides gras, ce qui peut inhiber l'effet de l'insuline l'antilipolyse, créant une lipolyse supplémentaire.

En atteignant les tissus sensibles à l'insuline, les acides gras excédentaires créent une résistance à l'insuline par la disponibilité supplémentaire du substrat et en modifiant la signalisation en aval. Dans le muscle, les acides gras peuvent altérer l'activation de la protéine kinase C-λ (Kim et al., 2002). Dans le foie des rats nourris avec un régime riche en graisses, la résistance à l'insuline peut être attribuée à une anomalie de la

phosphorylation de la tyrosine du substrat 1 du récepteur de l'insuline stimulée par l'insuline et du substrat 2 du récepteur de l'insuline. Ces changements sont associés à l'activation de la protéine kinase C et c-Jun N-terminal kinase-1 (Samuel et al., 2004). Cependant, dans le foie, il semble y avoir une certaine discordance dans les effets métaboliques des acides gras libres sur le métabolisme du glucose et des lipides à médiation par l'insuline. Alors que les acides gras circulants augmentent la production de glucose hépatique et diminuent l'inhibition de la production de glucose par l'insuline, la lipogenèse, une voie liée aux effets stimulants de ces acides et de l'insuline sur la protéine de liaison des éléments de réponse au stérol, continue (Eckel et al., 2005).

Les changements biochimiques dans les voies de signalisation médiées par l'insuline se traduisent également par des diminutions du transport du glucose induit par l'insuline et du métabolisme dans le Smet (Eckel et al., 2005).

5.2.1.6.2. Obésité et augmentation du tour de taille

Mécaniquement, une distinction entre un grand tour de taille en raison de l'augmentation du tissu adipeux sous-cutané par rapport à la graisse viscérale est discutée. Cette distinction peut être faite avec la tomodensitométrie ou l'imagerie par résonance magnétique (Lee et al., 2004). Avec des augmentations du tissu adipeux intra-abdominal ou viscéral, on peut s'attendre à un flux plus élevé d'acides gras libres dérivés du tissu adipeux vers le foie par la circulation splanchnique, alors qu'une augmentation de la graisse sous-cutanée abdominale libérerait les produits de lipolyse dans la circulation générale et éviterait des effets plus directs sur le métabolisme hépatique (production de glucose, synthèse de lipides et sécrétion de protéines prothrombotiques comme le fibrinogène et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1) (Aubert et al., 2003). Malgré ces différences potentielles dans les mécanismes liés à la distribution excessive des tissus adipeux abdominaux, le diagnostic clinique du Smet ne fait pas de distinction entre les augmentations de graisse sous-cutanée et viscérale. Pourtant, par un mécanisme lié au flux et au métabolisme des acides gras libres, la prédominance relative du tissu adipeux viscéral plutôt que sous-cutané avec un tour de taille croissant chez les Asiatiques et les Indiens d'Asie rend la prévalence relative du syndrome élevée dans un contexte hygiéno-diététique inapproprié (Bajaj et al., 2004). Cependant, il existe des preuves que la libération élevée d'acides gras libres postprandiale chez les femmes obèses du haut du corps provient de la graisse du haut du corps non splanchnique et non du dépôt viscéral (Guo et

al., 1999). Ces résultats suggèrent que la graisse viscérale pourrait être un marqueur pour, mais pas la source de l'excès d'acides gras libres postprandiaux dans l'obésité.

5.2.1.6.3. Intolérance au glucose

Les défauts de l'action de l'insuline dans le métabolisme du glucose comprennent des déficiences dans la capacité de l'hormone à inhiber la production de glucose par le foie et les reins et à réguler l'absorption du glucose et le métabolisme dans les tissus insulino-sensibles. La relation entre l'hyperglycémie à jeun ou l'altération de la tolérance au glucose et de la résistance à l'insuline est bien étayée par des études sur des humains, des primates non humains et des rongeurs (Eckel et al., 2005). Pour compenser les défauts de l'action de l'insuline, la sécrétion de l'insuline doit être modifiée pour maintenir l'euglycémie. Si cette compensation échoue, les défauts de la sécrétion d'insuline prédominent (Eckel et al., 2005).

La résistance à l'insuline dans les cellules des îlots pancréatiques implique que les signaux qui génèrent une sécrétion d'insuline glucose-dépendante ont été modifiés de manière défavorable et les acides gras sont des candidats de choix. Bien que les acides gras libres puissent stimuler la sécrétion d'insuline, l'exposition croissante et prolongée à des concentrations excessives entraîne une baisse de la sécrétion d'insuline (Lee et al., 1994). Le mécanisme de cette altération a été attribué à la lipotoxicité par plusieurs mécanismes différents possibles (Yaney et al., 2003).

Lorsque le récepteur de l'insuline est délété dans le muscle squelettique, il n'y a pas d'hyperglycémie (Bruning et al., 1998) ; cependant, l'élément spécifique du récepteur de l'insuline entraîne une intolérance progressive au glucose et au diabète (Kulkarni et al., 1999). Chez les personnes ayant le diabète, le stress de l'environnement insulino-résistant sur la fonction de la cellule provoque une intolérance au glucose et finalement un risque plus élevé de diabète et par conséquent de Smet.

5.2.1.7. Conséquences

Les conséquences du Smet sur la santé sont nombreuses. Certaines de ces conséquences seront abordées dans ce travail.

5.2.1.7.1. Obésité

L'obésité est un excès de poids pour une stature donnée en raison d'une augmentation de la masse adipeuse (OMS, 1999). L'obésité abdominale est le paramètre de graisse corporelle le plus étroitement associé au Smet (NCEP, 2002 ; Carr et al., 2004). Les définitions de l'obésité abdominale varient selon la population (Eckel et al., 2005). La prise en charge clinique de l'obésité doit respecter plusieurs principes bien établis (Grundy et al., 2004). Une réduction efficace du poids améliore tous les facteurs de risque associés au Smet (CGIETOOA, 1998) et réduit davantage le risque de diabète de type 2 (Knowler et al., 2002 ; Zimmet et al., 2003).

À ce jour, les médicaments de perte de poids n'ont pas été particulièrement efficaces pour le traitement de l'obésité ; quelque part aux États-Unis, la chirurgie bariatrique est de plus en plus utilisée pour traiter les patients atteints d'obésité morbide (Brolin, 2002). L'efficacité et la sécurité de la chirurgie bariatrique chez les patients atteints du Smet ont été assez encourageantes, 95% des patients ayant été libérés du syndrome un an après l'opération (Lee et al., 2004). Des périodes d'observation plus longues après la stabilisation du poids sont cependant nécessaires.

L'obésité contribue à l'hypertension, à un taux élevé de cholestérol sérique, à un faible taux de cholestérol-HDL et à l'hyperglycémie et s'accompagne d'un risque accru de maladies cardiovasculaires (Carr et al., 2004 ; Eckel et al., 2005 ; Standl, 2005). L'obésité abdominale est particulièrement corrélée avec les facteurs de risques métaboliques. L'excès de tissu adipeux libère plusieurs produits qui exacerbent apparemment ces facteurs de risque. Ils comprennent les acides gras non-estérifiés, les cytokines, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 et l'adiponectine. Un niveau élevé d'acide gras non estérifiés plasmatiques surcharge le muscle et le foie avec des lipides, ce qui contribue à l'état de résistance à l'insuline. Des niveaux élevés de C-reactive protein (CRP) accompagnant l'obésité peuvent signifier un excès de cytokine et un état pro-inflammatoire. Un inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 élevé contribue à un état

prothrombotique, tandis que les faibles niveaux d'adiponectine qui accompagnent l'obésité sont en corrélation avec l'aggravation des facteurs de risque métaboliques.

Plusieurs changements délétères dans le métabolisme des lipides sont souvent observés chez les personnes obèses. Ces changements sont plus étroitement corrélés avec la quantité de graisse viscérale plutôt que la graisse corporelle totale. En général, l'obésité a tendance à élever le taux de cholestérol total et de triglycérides plasmatiques à jeun et à réduire les taux plasmatiques de cholestérol-HDL. Bien que les taux plasmatiques de cholestérol-LDL restent légèrement élevés ou normaux, les petites particules de cholestérol-LDL athérogènes denses tendent à augmenter en particulier chez les patients présentant une résistance à l'insuline associée à une adiposité viscérale. Ces changements augmentent le risque d'athérosclérose.

5.2.1.7.2. Diabète de type 2

Le diabète se caractérise par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire un excès de sucre dans le sang. Les personnes non diabétiques mais qui développent déjà les symptômes du Smet courent un risque très élevé pour le développement du diabète de type 2. Le risque de diabète est jusqu'à cinq fois plus élevé chez les patients atteints du Smet (Stern et al., 2004). Ceci est principalement dû au fait que la dérégulation du glucose est souvent déjà présente. Il est important de souligner qu'une personne atteinte de Smet est deux à quatre fois plus exposé à un accident cardiovasculaire (Nakagami et al., 2004). Les données de Framingham ont montré que la plupart des hommes atteints de diabète avaient un risque de maladies coronariennes sur 10 ans : 20% ; en revanche les femmes ont rarement dépassé le niveau de 20%. Certaines autorités estiment que l'amélioration de l'évaluation des risques chez les personnes atteintes de diabète cliniquement utile dans la gestion des risques. Les investigateurs d'Oxford ont donc développé un moteur de risque (disponible sur le World Wide Web) (OCDEMDTU, 2003) basé sur une grande base de données UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) qui contient 500 types de maladies cardiovasculaires. Il diffère de l'algorithme de Framingham en ce qu'il inclut une mesure de la glycémie et de la durée du diabète. Des enquêtes menées auprès d'autres populations diabétiques par des chercheurs du UKPDS ont montré que les équations de Framingham sous-estiment considérablement le risque de maladies coronariennes et

d'accidents vasculaires cérébraux, tandis que le moteur de risques UKPDS fournit une estimation plus robuste.

5.2.1.7.3. Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont les maladies qui concernent le cœur et la circulation sanguine. Dans les pays occidentaux, l'expression la plus courante est la maladie coronarienne. L'une des principales observations concernant le regroupement des troubles métaboliques est l'association de ces caractéristiques avec un risque accru de maladies cardiovasculaires.

Puisque le Smet comprend des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, on peut s'attendre à ce que le syndrome soit un prédicteur important de ces maladies. Il est établi que plusieurs facteurs de risque confèrent plus de risques qu'un seul facteur de risque. Les conclusions qui ont mené au développement du score de risque de Framingham (SRF) sont basées sur cette observation (Cornier et al., 2008). L'ATP III a souligné que le risque de maladies cardiovasculaires peut être réduit par la modification des facteurs de risque au-delà de la diminution du cholestérol-LDL (ATP III, 2001). Ainsi, le Smet a été identifié comme un regroupement de facteurs qui augmentent encore le risque de maladies cardiovasculaires.

La grande majorité des études a montré que les patients atteints de Smet ont plus de maladies cardiovasculaires (Lakka et al., 2002 ; Hu et al., 2004 ; Jeppesen et al., 2007 ; Cornier et al., 2008). En effet, une étude de l'étude Botnia, impliquant plus de 4000 adultes finlandais et suédois, a montré que ceux qui avaient le Smet selon les critères de l'OMS de 1999 étaient trois fois plus susceptibles d'avoir des antécédents de maladies coronariennes que ceux sans syndrome. De plus dans une étude qui comprenait 36 différents rapports, il fut rapporté un risque important de troubles cardiovasculaires et des décès chez des personnes atteintes de Smet (Cornier et al., 2008). Plusieurs travaux menés par des chercheurs ont également associé la présence du Smet à une augmentation significative de la mortalité cardiovasculaire (Hong et al., 2007 ; Cornier et al., 2008 ; Craen et al., 2008).

5.2.1.7.4. Dyslipidémie

La dyslipidémie désigne une concentration trop élevée d'un ou plusieurs lipides présents dans le sang : le cholestérol et les triglycérides. Elle se caractérise également par un spectre d'anomalies lipidiques qualitatives reflétant des perturbations dans la structure, le métabolisme et les activités biologiques des lipoprotéines athérogènes et des cholestérols-HDL anti-athérogènes, qui incluent une élévation des lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B, des particules de cholestérols-LDL et de faibles niveaux de cholestérols-HDL.

En général avec l'augmentation du flux d'acides gras libres vers le foie, il se produit une production accrue de lipoprotéines de très basse densité riches en triglycérides contenant de l'apolipoprotéine B (Lewis et al., 1995).

Une perturbation majeure des lipoprotéines dans le Smet est la réduction du cholestérol-HDL. Cette réduction est une conséquence des changements dans la composition et le métabolisme du cholestérol-HDL. La modification de la composition des lipoprotéines entraîne également une augmentation de l'élimination du cholestérol-HDL (Brinton et al., 1991). La relation entre ces changements de cholestérol-HDL et l'insulinorésistance est probablement indirecte, en liaison avec les changements du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides.

La résistance à l'insuline entraîne une dyslipidémie athérogène de plusieurs façons. Tout d'abord, l'insuline supprime la lipolyse dans les adipocytes de sorte qu'une signalisation d'insuline altérée augmente la lipolyse, ce qui entraîne une augmentation du taux de matières grasses. Dans le foie, les acides gras libres servent de substrat pour la synthèse des triglycérides. Les acides gras libres stabilisent également la production de l'apolipoprotéine B, la plus grande lipoprotéine des particules de lipoprotéines de très basse densité, ce qui se traduit par une production plus importante de lipoprotéines de très basse densité. Deuxièmement, l'insuline dégrade l'apolipoprotéine B par des voies dépendant de la phosphoinositide 3-kinase de sorte qu'une résistance à l'insuline augmente directement la production de lipoprotéines de très basse densité. L'insuline régule l'activité de la lipoprotéine lipase, limitante et médiatrice majeure de la clairance des lipoprotéines de très basse densité. Ainsi, l'hypertriglycéridémie dans la résistance à l'insuline résulte à la fois d'une augmentation de la production de lipoprotéines de très basse densité et d'une diminution de la clairance des lipoprotéines de très basse densité.

Ces anomalies sont étroitement associées à un stress oxydatif accru et à un dysfonctionnement endothélial, renforçant ainsi le caractère pro-inflammatoire des maladies macrovasculaires artérioscléreuses.

5.2.2. Effets du cacao et produits dérivés sur le Smet

5.2.2.1. Cacao, chocolat, obésité

L'obésité est l'un des principaux facteurs dans le développement des maladies cardiovasculaires (Latif, 2013). La cause fondamentale de l'obésité et du surpoids est un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et dépensées. Comme certains aliments, le cacao contient une importante quantité de matières grasses faisant de lui un aliment très énergétique. Le cacao contient également des composés chimiques qui réduisent l'obésité. Les composés responsables seraient les flavanols. En effet il fut démontré que les flavonoïdes peuvent réduire la masse corporelle via la synthèse des acides gras et contribué à l'amélioration de la dépense énergétique. Cette capacité de ces flavanols à stimuler le métabolisme oxydatif en améliorant la structure et la fonction de la mitochondrie est l'un des meilleurs mécanismes qui explique la diminution de l'indice de masse corporelle chez un sujet (Gutiérrez-Salmeán et al., 2015).

Katz et al., (2011) ont montré que les épicatéchines augmentent l'expression de certains co-activateurs transcriptionnels tels que le co-activateur récepteur-gamma activé par un proliférateur de Peroxisome-1 alpha (PGC-1α). Cette protéine stimule des voies thérapeutiques telles que celles de la mitochondriogenèse. Higashida et al., (2009) rapportent également que cette protéine favorise l'augmentation de la glycémie et des lipides en activant la β-oxidation (Gutiérrez-Salmeán et al., 2015).

La satiété influe sur la morphologie des personnes obèses. Lee, (2006) rapporte dans son étude que le cacao et ses produits dérivés présentent un effet anorexigène. Cela diminue l'apport calorique et tend à induire une perte de masse corporelle (Gutiérrez-Salmeán et al., 2015).

Une étude pré-clinique sur des rats soumis à une alimentation riche en matières grasses provenant du cacao pendant vingt-un jour a montré que le cacao diminue significativement la masse corporelle, le taux de tissus adipeux et la triglycéridémie (Latif, 2013). Une analyse ADN fut effectuée sur certains organes. Cette étude a révélé une réduction de l'expression de certains gènes favorables au transport des acides gras et une

augmentation de l'expression des gènes associés à la thermogénèse (Latif, 2013). Il est important de souligner que les polyphénols responsables de ces effets n'ont pas été identifiés lors de cette étude.

5.2.2.2. Cacao, chocolat, résistance à l'insuline

Les polyphénols influent sur le métabolisme des glucides en améliorant la libération de l'insuline et l'absorption du glucose au niveau des cellules (Solayman et al., 2016).

Les polyphénols du cacao stimulent la sécrétion d'insuline et favorisent la réduction de la production de glucose hépatique. Cependant, ces composés bioactifs améliorent aussi la consommation du glucose dépendante (Kim et al., 2016).

Une consommation d'aliments composés de haute teneur en polyphénols tels que le cacao prévient les symptômes du Smet (Rios et al., 2015) et améliore la résistance à l'insuline (Isomaa et al., 2001 ; Pajunen et al., 2011 ; Gutiérrez-Salmeán et al., 2015).

Jalil et al., (2008) ont montré que les fibres ou extraits de cacao améliorent la sensibilité à l'insuline. Des travaux similaires ont été menés par d'autres scientifiques. Sánchez et al., (2010) ont également abordé dans le même sens (Fernández-Murga et al., 2011). Cependant, les études de Muniyappa et al., (2013) n'ont souligné aucun changement au niveau de la sensibilité à l'insuline après 15 jours de consommation chez des sujets avec une tension artérielle élevée.

Ces contradictions au niveau des résultats peuvent laisser croire que les effets du cacao concernant la sensibilité ou résistance à l'insuline ne peuvent pas être seulement l'affaire des composés polyphénoliques mais aussi d'autres composés présents dans le cacao.

De plus, une étude conduite par Grassi et al., (2005) a rapporté qu'une administration de chocolat noir a été suivie par une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez des sujets en bonne santé (Franco et al., 2013).

Cependant les résultats de Osakabe, (2013) ont montré qu'une consommation régulière de produits riches en flavonoïdes influe sur les facteurs de risques du Smet tels que la dysglycémie. Mais ces résultats doivent être pris avec réserve car ils ne disent pas si cette étude a été conduite avec le cacao.

Nous retenons que l'insuline joue un rôle important dans les maladies du Smet. En effet, l'insensibilisation des récepteurs cellulaires membranaires chez des sujets à cette

hormone peptidique augmente le taux de glycémie sanguin. Cela entraine une situation d'intolérance au glucose et par conséquent le début d'un diabète de type 2.
Par ailleurs, plusieurs de ces études ont montré des résultats avec des incertitudes et donc doivent être pris avec beaucoup de prudence.

5.2.2.3. Cacao, chocolat, dyslipidémie

Les anomalies lipidiques jouent un rôle dans les symptômes du Smet. Le cholestérol présent dans l'organisme a une double origine. Il provient premièrement de l'alimentation (300 à 700 mg / jour) ou peut être biosynthétisé (700 à 1250 mg / jour).

Les matières grasses contenus dans le cacao sont essentiellement composées de triglycérides. Kris-Etherton et al., (2002) ont montré qu'une consommation d'acides gras saturés peut être associée aux maladies du cœur. Cependant leurs travaux n'ont montré aucun effet de l'acide stéarique sur le cholestérol-LDL du plasma. Selon Jones et al., (1999) la teneur de cet acide gras est inférieure à celle des autres dans l'organisme. L'acide stéarique est par ailleurs faiblement absorbé. En outre, selon Mursu et al., (2004) les lipides contenus dans le chocolat inhibent l'oxydation des cholestérols-LDL.

Le chocolat riche en polyphénols améliore le profil des lipides du sang en augmentant le taux de cholestérol-HDL et abaissant celui du cholestérol-LDL (Al-Dujaili et al., 2013).

Des études ont également montré les effets bénéfiques du cacao sur les lipides du sang. Ces effets ne sont pas liés aux matières grasses mais plutôt aux polyphénols présents dans le cacao, en particulier aux flavonoïdes antioxydants (Galli, 2013). Les travaux de Baba et al., (2007) ont rapporté que ces polyphénols ont réduit l'oxydation du cholestérol-LDL et la concentration du cholestérol-LDL oxydés. La dose de cacao utilisé dans cette étude est de 15 à 75 g / jour.

Des études comparatives ont été effectuées évaluant les effets de différentes préparations de produits dérivés de cacao contenant des quantités croissantes de polyphénols. Les travaux conduits par Wan et al., (2001) ont montré une relation significative entre ces polyphénols et les taux de cholestérol-LDL. Il est important de souligner que la dose moyenne de chocolat est de 30 g / jour. Cet auteur dans cette même étude a réussi a montré qu'une consommation régulière de 40 g de chocolat par jour augmente les effets des polyphénols qu'il contient sur les cholestérols-HDL. Les études similaires menées par Mursu et al., (2004) ont également abondé dans le même sens.

Leurs travaux se sont effectués avec une dose de 75 g / jour de chocolat. Cependant ces précédentes études n'ont pas spécifié les molécules responsables de ces effets. D'autres études de Mursu et al., (2004) ont montré qu'une consommation pendant un mois de 22 g de cacao contenant 446 mg de procyanidines par des sujets bien portants favorise la réduction du temps d'oxydation de 8% du cholestérol-LDL. Cependant les travaux de certains scientifiques ont démontré le contraire. Les recherches de Vinson et al., (2006) ont rapporté que les polyphénols du cacao ont prolongé le temps de latence de l'oxydation des LDL+VLDL (Galli, 2012).

Aussi, il fut rapporté par les études de Mellor et al., (2010) que la consommation régulière du cacao a protégé des patients atteints du diabète de type 2 contre un profil lipidique athérogène (De Araujo et al., 2016).

D'autres études ont été menées avec de petites doses de chocolat. Dans une analyse conduite par Jia et al., (2010), 215 sujets se sont vus administrés du chocolat. Dans leurs travaux, ces scientifiques ont observé une légère diminution du cholestérol total et LDL. Aucun effet significatif n'a été mentionné au sujet des cholestérol-HDL (De Araujo et al., 2016).

Puisque le cacao contient des acides gras saturés, il est possible d'en déduire qu'une consommation régulière de cette denrée augmente la teneur de cholestérol-LDL présent dans l'organisme. Cependant les études de Galli, (2012) ont rapporté qu'une consommation régulière de chocolat favorise la réduction de cholestérol-LDL

5.2.2.4. Cacao, chocolat, hypertension artérielle

L'hypertension artérielle se traduit par une hausse anormale de la pression du sang sur les parois des artères.

Dans une étude conduite par Buijsse et al., (2006), ces auteurs ont montré que le cacao a un effet sur les sujets hypertendus et pré-hypertendus (Ried, 2013 ; Correa-Matos et Christie, 2013 ; Gutiérrez-Salmeán et al., 2015).

De plus, la tension artérielle systolique de base et la pression diastolique chez les sujets ayant consommé du cacao diminua par rapport à celles des témoins (personnes n'ayant pas consommé du cacao). Cependant, les sujets avec une consommation importante de cacao avaient une tension artérielle systolique de base inférieure que ceux qui en ont consommé moins (Lippi, 2009 ; Gutiérrez-Salmeán et al., 2015).

Par ailleurs dans une étude menée à grande échelle au Pays-Bas, Il fut constaté

que les sujets qui ont consommé régulièrement du chocolat avait une tension artérielle plus faible que ceux qui n'en consommaient pas (Latif, 2013). Les travaux de cet auteur ont également rapporté que la consommation de barres de chocolat noir pendant deux semaines réduit la tension artérielle systolique chez les jeunes sujets sains et chez les personnes du troisième âge. Il est important de souligner que ces études épidémiologiques n'expliquent pas le mécanisme par lequel le cacao agit sur la pression artérielle.

5. 2.3. Effets du cacao sur les complications du Smet

5.2.3.1. Cacao, chocolat, dysfonctionnement endothéliale

Le dysfonctionnement endothélial et les symptômes du syndrome métabolique évoluent en fonction de l'état nutritionnel d'un individu. La littérature rapporte que le dysfonctionnement de l'endothélium apparait en même temps que le dysfonctionnement vasculaire. Ces deux marqueurs précèdent les maladies liées au système cardiovasculaire (Davison et Howe, 2015).

La consommation de produits à base de cacao a un effet important sur la fonction cardiométabolique (Schini-Kerth, 2014 ; Davison et Howe, 2015 ; Sansone et al., 2015).

Les travaux de Helm et Macdonald (2015) ont rapporté que les flavanols du cacao réduisent les risques de maladies cardiovasculaires. Cependant, les quantités de ces composés agissantes n'ont pas été définies dans cette étude.

Il est vrai que la consommation du cacao et ses produits dérivés a été souligné par plusieurs scientifiques pour promouvoir la santé cardiovasculaire. Cependant, les résultats des scientifiques sur les effets protecteurs du chocolat sont souvent controversés.

Dans une étude, quatre groupes de souris se sont vus injectés du chocolat à différentes concentrations en polyphénols. Les résultats obtenus ont révélé les effets défavorables sur la santé vasculaire chez ces sujets. Ces auteurs ont donc déduit que les effets du cacao sur la santé cardiométabolique est attribuée à la composition et la quantité de chocolat consommé (Yakala et al., 2013).

Les anthocyanidines et les flavanols contenus dans le cacao influencent l'apparition de risque de diabète de type 2 et les dysfonctionnements vasculaires (Van Dam., 2013 ; Osakabe, 2013). Le chocolat riche en polyphénols favorise la protection contre le dysfonctionnement endothélial chez les patients atteints de diabète sucré de type 2 (Zomer

et al., 2012 ; Mellor, 2013 ; Grassi, 2013). Le chocolat avec une teneur élevée en polyphénols contribue à améliorer la fonction endothéliale chez les sujets hypertendus (Nogueira et al., 2012).

Cependant, des contradictions ont été rapportés par d'autres chercheurs. Leurs travaux n'ont réussi à établir aucune relation entre la consommation du chocolat et la prédominance du Smet (Tokede et al., 2012). Il est vrai que le cacao et ses produits dérivés influencent la santé cardiovasculaire, mais des recherches plus approfondies pour clairement identifier les molécules agissantes et les quantités maximales de biocomposés doivent être menées.

5.2.3.2. Cacao, chocolat, stress oxydant

Le chocolat noir agit dans la correction de certaines perturbations métaboliques en agissant sur l'activité cholinergique (Madhavadas et al., 2016).

Par ailleurs, à l'instar des facteurs de risque d'apparition de maladies cardiovasculaires, de la sensibilité à l'insuline, du cholestérol contenu dans le sérum et de la fonction endothéliale ; le cacao intervient également dans la diminution du stress oxydant et l'agrégation des plaquettes (Cordero-Herrera et al., 2015 ; Loffredo et al., 2016).

En outre, les polyphénols du cacao favorisent la survie et le bon fonctionnement des cellules bêta pancréatiques chez les rats (Fernández-Millán et al., 2015). Aussi ces polyphénols contenus dans les produits naturels interviennent également dans la restauration, l'intégrité et la physiologie des cellules bêta. Des études expérimentales effectuées avec les animaux et des humains ont montré que ces composés optimisent le processus cognitif (Dragan et al., 2015).

Une étude comparative conduite par des scientifiques a permis d'évaluer l'impact des composés chimiques rencontrés dans deux substances naturelles (cacao et capuassu) sur le Smet. Certains paramètres y compris le stress oxydatif et les activités des enzymes ont été étudiés. Les résultats ont rapporté que ces deux extraits associés au régime de matières grasses ont favorisé la réduction de l'oxydation des lipides par modération des lésions hépatiques. De plus, une augmentation des activités antioxydantes des tissus et plasma furent constatés. Ces résultats rapportent que les composés actifs du cacao agissent sur le processus oxydatif (Amiot et al., 2016).

5.2.3.3. Cacao, chocolat, inflammation

Les polyphénols rencontrés dans le cacao sont associés aux réactions anti-inflammatoires de l'organisme. Perez-Cano et al., (2009) ont montré que les procyanidines et les dimères de flavonoïdes rencontrés dans le cacao ont un rôle anti-inflammatoire et modulent la sécrétion des médiateurs biologiques tels que les cytokines et l'oxyde nitrique (Mao et al., 2000 ; Lee et al., 2006 ; Ramiro-Puig et al., 2007 ; Al-Dujaili et al., 2013 ; Castell et al., 2013). En outre les études de Sies et al., (2005) ont rapporté que les polyphénols contenus dans le cacao diminuent l'inflammation en utilisant plusieurs mécanismes (Sanbongi et al., 1997 ; Lippi et al., 2009 ; Al-Dujaili et al., 2013).

Le cacao diminue la concentration des protéines C réactives sériques, marqueurs biologiques qui jouent un rôle important dans les réactions inflammatoires (Badrie et al., 2015).

Le cacao réduit aussi l'inflammation en inhibant l'activation des cellules T et B et interviennant également dans la réduction de la production de l'interleukine-2 (Lippi et al., 2009).

Le cacao favorise la réduction de la synthèse de TNF-α, IL-1 et d'IL-6. En effet, en fonction des différents traitements effectué avec le cacao, l'ARNm de l'interleukine-1 reste à un niveau très bas et l'expression de l'ARNm du TNF-α induit par les lipopolysaccharides (LPS) est réduite. Le cacao ayant réduit la production de TNF-α influe sur les niveaux de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'interleukine-6 (Andújar et al., 2012).

Les effets exercés par les polyphénols du cacao sont produits au niveau transcriptionnel. En effet, activé par de nombreux stimuli incluant les cytokines pro-inflammatoires (TNF-α), les mitogènes de cellules T et B, les bactéries et les lipopolysaccharides ; le facteur de transcription « nuclear factor-*kappa B* » (NF-Kb) est régulé par les flavanols du cacao (Andújar et al., 2012). En effet, les flavonoïdes du cacao favorisent l'inhibition de l'activation du NF-Kb. Cela entraine une réduction de l'activité de la liaison NF-kB - ADN (acide désoxyribonucléique) dont le but est la réduction de la production de l'interleukine-2 (Andújar et al., 2012).

Le chocolat par ses effets anti-inflammatoires inhibe la voie de la lipoxygénase. Cette enzyme protéique catalyse l'oxydation des acides gras.

L'(-)-épicatéchine est le flavonoïde majoritaire qui inhibe les activités de la dioxygénase, la leucotriène A4 synthase et celles de la 5-lipoxygénase. En effet d'après

les travaux de Schewe et al., (2002), ces enzymes interviennent dans les effets anti-inflammatoires putatifs des produits à base de cacao chez l'homme (Badrie et al., 2015).

Mao et al., (2000) ont également montré dans leurs études qu'en plus de l'(-)-épicatéchine, d'autres flavonoïdes interviennent dans la modulation des cytokines y compris le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) et le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β) (Lippi et al., 2009).

Cependant les travaux conduits par Mathur et al., (2002) n'ont pu démontrer l'impact du chocolat sur certains marqueurs biologiques responsables de l'inflammation y compris l'interleukine-6 (Lippi et al., 2009).

5.3. Autres effets santé du cacao et produits dérivés

5.3.1. Cacao, chocolat, système nerveux central

Le système nerveux est un système biologique responsable de la coordination des actions avec l'environnement extérieur et de la communication rapide entre les différentes parties du corps. Le système nerveux a un rôle de réception, de traitement, d'intégration et d'émission des messages nerveux. Le rôle du système nerveux peut être influencé par plusieurs composés chimiques. Entre autres l'oxyde nitrique. Ce composé joue un rôle important de neurotransmetteur entre les cellules nerveuses. Toutefois, il joue également un rôle clé dans la circulation cérébrale où il favorise la perfusion cérébrale (De Araujo et al., 2016). Plusieurs aliments tels que le cacao et ses produits dérivés peuvent améliorer la disponibilité de l'oxyde nitrique.

Selon De Araujo et al., (2016), le flux sanguin est amélioré par la consommation du chocolat riche en flavanols. La stimulation de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique par le chocolat est à l'origine de l'amélioration de ce flux sanguin (Pate et al., 2008). De plus, Il fut constaté que la vitesse du flux sanguin des sujets augmenta après consommation du cacao (Francis et al., 2006 ; Sorond, 2008 ; Field et al., 2011 ; Walters et al., 2012 ; Latif, 2013).

Sorond et al., (2010) ont réussi à montrer des changements de la vitesse du flux sanguin mesurée par la technique d'Imagerie de perfusion par marquage de spins et de l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Larsson et al., (2012) démontrent que la consommation du chocolat favorise la réduction des accidents vasculaires cérébraux.

Les polyphénols du cacao jouent un rôle dans la réduction des maladies liés aux neurones tels que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (De Araujo et al., 2016).

Le cacao intervient dans la réduction de l'expression de certains peptides tels que la calcitonine. Cet élément est responsable des inflammations des cellules souches au niveau du cerveau et le développement de la migraine (Li et al., 2008).

Les travaux de Bisson et al., (2008) montrent que les polyphénols du cacao retardent l'apparition des effets cognitifs du cerveau. Ces effets ont un rapport avec l'âge et jouent un rôle important dans l'augmentation de la dopamine urinaire.

Nurk et al., (2009) montrent une amélioration des fonctions orchestrées par le cerveau après une consommation du chocolat.

Les flavonoïdes du cacao sont des polyphénols qui pour certains auteurs contribuent à l'écoulement des lésions des cellules nerveuses (Badrie et al., 2015).

Les flavonoïdes représentent des médicaments pour lutter contre les inflammations des cellules nerveuses (Spencer et al., 2012). Ces flavonoïdes ont un impact positif dans l'apprentissage et sur la mémoire humaine (Sorond et al., 2008).

Il fut prouvé que la mort des cellules du système nerveux des personnes ayant la maladie d'Alzheimer a pour principale voie l'apoptose (Badrie et al., 2015). En effet, certains composés tels que le 4-hydroxynonénal sont présents dans le cerveau des personnes atteints de la maladie d'Alzheimer et ce sous l'action de l'apoptose et du stress oxydatif. Les marqueurs de mort de ces cellules nerveuses par voie apoptotique auraient été bloqués par le cacao (Badrie et al., 2015).

5.3.2. Cacao, chocolat, système cardiovasculaire

Les données actuellement disponibles indiquent que la consommation quotidienne de chocolat riche en cacao ou d'extraits de cacao enrichis en polyphénols réduit le risque de maladies cardiovasculaires (Gómez-Juaristi et al., 2011 ; Khawaja et al., 2011). Plusieurs études épidémiologiques ont démontré l'association favorable du cacao et ses produits dérivés avec un risque décroissant de mortalité dû aux maladies cardiovasculaires (Kris-Etherton et al., 2002 ; Buijsse et al., 2006 ; Corti et al., 2009 ; Khan et al., 2014). Dans ces études, le rôle des polyphénols contenus dans le cacao est celui qui a été étudié pour leur effet sur le système cardiovasculaire, ce qui conduit à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires. Les principaux paramètres intervenants dans les maladies cardiovasculaires sont: l'oxyde nitrique (NO) (Heiss et al., 2005 ; Schroeter et al., 2006),

l'oxydation des cholestérols-LDL (Osakabe et al., 2001 ; Baba et al.,2007 ; Khan et al., 2012), le dysfonctionnement endothélial (Heiss et al., 2005 ; Faridi et al., 2008), le profil lipidique (Khan et al., 2012 ; Baba et al., 2007 ; Sarria et al., 2014), la pression artérielle (Ried et al., 2013 ; Fisher et Hollenberg, 2006 ; Heiss et al., 2007) et l'agrégation des plaquettes (Rein, 2000 ; Osakabe et al., 2001 ; Vita, 2005 ; Fernández-Murga et al., 2011).

5.3.3. Cacao, chocolat, système respiratoire

De nombreuses études épidémiologiques ont été menées sur la santé des consommateurs avec le cacao. Cependant le domaine du système respiratoire n'a pas connu un développement approfondi.

Des scientifiques ont mené des recherches pour étudier l'action des proanthocyanidines sur la souris. Yasuda et al., (2008) affirment que lors de la supplémentation en cacao chez une souris, les proanthocyanidines empêchent une lésion des poumons qui est due à des particules diesel.

Chez le fumeur, il fut démontré que les flavanols agissent sur l'effet pro-thrombotique dans le cadre d'un excès de vasoconstricteurs (Heiss et al., 2005).

5.3.4. Cacao, chocolat, système gastro-intestinal

Une consommation de chocolat au lait ne produit pas de troubles gastro-intestinaux majeurs (Järvinen et al., 2003).

Les travaux de Tzounis et al., (2011) ont mis en évidence l'effet sélectif des flavanols contenus dans des boissons à base de cacao par rapport à certaines bactéries lactiques. Les résultats de cette étude ont montré que la boisson contenant une teneur élevée de flavanols après quatre semaines de consommation influe significativement sur la croissance de ces bactéries en augmentant le nombre des bifidobactéries et celui des lactobacillus. Cependant, il fut également constaté dans cette même étude une réduction des clostridiums.

Il est intéressant dans des études futures de se projeter sur le potentiel prébiotique des autres polyphénols contenus dans le cacao.

5.3.5. Cacao, chocolat, système endocrinien

Le système endocrinien regroupe l'ensemble des organes et des tissus qui sécrètent des hormones. Produites par les glandes endocrines, ces hormones interviennent dans la régulation de la croissance et le développement tissulaire mais également dans la coordination du métabolisme. Parmi les glandes endocrines les plus connues figurent la thyroïde, l'hypothalamus, le pancréas ou encore les ovaires et les testicules. Les hormones sont libérées dans le sang par ces différentes glandes situées dans tout le corps et agissent comme des messagers chimiques qui donnent les informations nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Le système endocrinien peut être modulé par les polyphénols du cacao. En effet Tomaru et al., (2007) ont rapporté qu'après avoir administré de la liqueur de chocolat contenant des procyanidines à la souris, les niveaux de glycémie et de fructosamine ont considérablement diminué.

5.3.6. Cacao, chocolat, dermatologie

Grant et Anderson, (1965) ont été parmi les premiers scientifiques à établir une relation entre l'acné et la consommation du chocolat. Leurs résultats n'ont pas montré la responsabilité du cacao dans l'apparition de l'acné. Des auteurs ont également discuté cette idée de rapprocher l'acné à la consommation du cacao. Aucun signe d'apparition d'acné n'a été constaté par ces personnes (Fulton et al., 1969 ; Anderson, 1971 ; Fries, 1978 ; Ferdowsian et Levin, 2010). Cependant, des chercheurs ont affirmé que le chocolat favorise l'acné (De Araujo et al., 2016). Les composés actifs n'ont pas énuméré dans cette étude. Ces chercheurs ne disent pas non plus, les conditions dans lesquelles, ces travaux ont été réalisés. Ainsi des études méritent d'être effectuées afin d'éclaircir la position de ces auteurs.

Heinrich et al., (2006) ont montré que les flavanols du cacao influent positivement sur la circulation sanguine cutanée et favorisent l'hydratation de la peau. Les flavanols interviennent également dans la photoprotection endogène (Heinrich et al., 2006).

La rugosité de la peau des sujets qui ont consommé du chocolat avec une teneur élevée diminua plus que chez ceux qui ont consommé du chocolat avec une faible teneur en flavanols (Heinrich et al., 2006). Cela s'explique par une hausse du débit sanguin dans les tissus de la peau chez le premier groupe qui favorise l'hydratation de la peau (Heinrich et al., 2006).

Neukam et al., (2007) ont également montré dans leurs études les effets du cacao riche en flavonoïdes sur la circulation du sang. Selon ces auteurs, les flavanols ont influé positivement sur la circulation sanguine. Des études menées par certains auteurs ont par ailleurs montré les effets des composés polyphénoliques du cacao sur les cellules humaines. Martin et al., (2008) ont démontré que les polyphénols du cacao protègent le corps contre l'oxydation des cellules (Cellules HepG2).

De plus, des auteurs ont démontré que les flavonoïdes du cacao interviennent aussi dans la protection de la peau contre les dommages ultra-violets (Stahl, 2011). Les travaux de Jorge et al., (2011) ont montré que le cacao empêche les effets de l'érythème produit par les UV. Enfin les recherches de Jorge et al., (2011) ont montré qu'une ingestion du cacao réduit la déshydratation de la peau.

5.3.7. Cacao, chocolat, propriétés antibactériennes

Les aspects comme l'effet antibactérien du cacao ont été étudiés par des scientifiques (Osawa et al., 1990 ; Percival et al., 2006 ; Summa et al, 2008 ; Fapohunda et Afolayan, 2012). Les résultats des travaux de Santos et al., (2014) sur les effets antibactériens vous sont rapportés dans le tableau ci-après.

Tableau 25. Inhibition de la croissance bactérienne par un extrait fermenté de coques de cacao (Santos et al., 2014)

Souches microbiennes	Croissance bactérienne (%)		
	1.0 mg/mL	5.0 mg/mL	10.0 mg/mL
Gram-positive			
Bacillus subtilis	113.5 (± 6.6)	109.8 (± 3.5)	100.9 (± 1.7)
Staphylococcus aureus	134.1 (± 3.1)	144.5 (± 2.7)	103.2 (± 1.3)
S. epidermidis	100.9 (± 2.7)	98.3 (± 0.9)	92.5 (± 1.4)
Gram-négative			
Klebsiella pneumoniae	34.9 (± 3.6)	27.1 (± 4.2)	3.0 (± 0.2)
Pseudomonas aeruginosa	37.0 (± 3.6)	0.1 (± 2.1)	29.4 (± 9.4)
Salmonella choleraesuis	19.7 (± 5.2)	0.1 (± 8.8)	0.1 (± 1.1)

Ce tableau ci-dessus montre que l'extrait de cacao a eu un effet sur les bactéries Gram négatives (*Pseudomonas aeruginosa et Salmonella choleraesuis, Klebsiella pneumoniae).* Par ailleurs les extraits de cacao n'ont eu aucun effet sur les bactéries Gram positif.

Les polyphénols de cacao interviennent dans l'inhibition de certaines enzymes telle que la dextransucrase. Cette enzyme est responsable de la production de plaques extracellulaires des polysaccharides. Des auteurs ont attribué aux polyphénols de la poudre de cacao, la responsabilité de la formation de carie dentaire (Ferrazzano et al., 2009).

Les travaux de Srikanth et al., (2008) ont montré que la masse de cacao a été utilisée pour fabriquer un produit pour rincer la bouche des enfants. L'usage de ce produit par les enfants a diminué la formation des plaques dentaires chez ces derniers (Ferrazzano et al., 2009). Nous déduisons que les composés chimiques contenus dans le cacao sont efficaces à la surface des dents.

6. Mécanismes d'actions des polyphénols du cacao sur les cibles biologiques

Les polyphénols alimentaires offrent une stratégie complémentaire potentielle intéressante qui peut améliorer le Smet à multiples facettes. Alors que les flavanols provenant de diverses sources alimentaires semblent prometteurs, les flavanols de cacao représentent une approche émergente pour l'intervention dans le Smet.

Les mécanismes par lesquels les polyphénols du cacao préviennent les pathologies du syndrome métaboliques sont nombreux mais ne sont pas aujourd'hui clairement définis. Il est donc indispensable de définir ces différents mécanismes et les différencier des différents effets des polyphénols du cacao.

Composés	Cibles	Mode d'actions	Effets	Résultats des traitements avec le cacao	Modèle	Références
Flavanols	Troubles métaboliques	Module la digestion des hydrates de carbone	Ralentissement de la digestion et l'absorption des hydrates de carbone dans l'intestin	Maintien l'homéostasie du glucose	In vivo (Chez l'homme)	Yilmazer-Musa et al., 2012 ; Aydin et al., 2007 ; Williamson 2013 ; Li et al., 2005 ; Barrett et al., 2013 ; Yamashita et al., 2012 ; Andújar et al., 2012 ; Gu et Lambert, 2013.
	Hyperglycémie, intolérance au glucose, diabète, maladies cardiovasculaires	Inhibition de l'α-amylase	Réduction de la digestion des amidons	Ralentissement de l'absorption du glucose		
		Inhibition de la glucosidase	Ralentissement de la dégradation des hydrates de carbone	Atténuation de l'élévation de la glycémie post-prandial		

Flavanols	Hyperglycémie, Résistance à l'insuline	Inhibition de la glucosidase	Suppression de la réponse hyperglycémique après l'ingestion de glucides, qui était accompagnée d'une translocation améliorée de GLUT4 chez les souris, Amélioration de la tolérance au glucose	Augmentation de l'absorption du glucose d'une manière dose-dépendante et promotion de la translocation de la GLUT4 à la membrane plasmique des myotubes L6 ; favorise la translocation de GLUT4 dans le muscle squelettique de souris	In vivo (souris ICR et C57BL / 6)	Yamashita et al., 2012 ; Andujar et al., 2012
Flavanols	Diabète, troubles métaboliques	Inhibition des transporteurs de glucose (GLUT2 et SGLT1)	Atténuation de l'excursion du glucose après un repas	Favorise l'homéostasie du glucose	In vivo (études cliniques chez l'homme)	Kwon et al., 2007 ; Hossain et al., 2002 ; Williamson 2013
Flavanols	Diabète, troubles métaboliques	Modulation de la sécrétion et des activités des hormones critiques	Régulation du glucose sanguin	Maintien de l'homéostasie du glucose	In vivo (études cliniques chez l'homme)	Dj et Ma 2006 ; Flint et al., 2001 ; Toft-Nielsen et al., 2001 ; Weisburger, 2001
		Stimulation de la libération et réponse des incrétines	Augmentation de la réponse des incrétines			
		Stimulation de la production du glucagon-like peptide 1 (GLP-1)	Augmentation de la réponse du glucagon			

Flavanols	Inflammation	Inhibition de la production de cytokines	Réduction de la sécrétion et de l'expression de l'IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF-α et MCP -1	Modulation de la production des cytokines	In vivo (Chez l'homme)	Gu et Lambert, 2013 ; Mao 2000 et 2002 ; Ramiro et al., 2005
		Inhibition de l'activation et de la translocation du NF-KB ; Inhibition de l'activation de la kinase régulée par un signal extracellulaire ; de la kinase Jun-terminale	Diminution de la production de cytokines régulées par le NF-kB	Modulation de la signalisation du NF-KB		Recio et al., 2011 ; Vazquez-prieto et al., 2012 ; Zhang et al., 2006
	Inflammation	Inhibition de la production de NO induite par le LPS et l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS)	Augmentation de la relaxation dépendante de l'endothélium (In vivo)	Modulation de la production de l'oxyde Nitrique	In vitro et In vivo (Chez l'homme)	Ono et al., 2003 ; Ramirez-Sanchez et al., 2011 ; Persson et al., 2011

Flavanols	Inflammation	Modulation du microbiote intestinal humain ; Modulation de la composition et de la fonction du microbiome intestinal ; Amélioration de la fonction de la barrière intestinale et l'amélioration de la signalisation de l'insuline.	Effets prébiotiques	Atténuation de l'endotoxémie métabolique	In vitro et In vivo (études cliniques chez l'homme) et les rats	Dorenkott et al., 2014 ; Gu et al., 2014 ; Strata et al., 2016 ; Tzounis et al., 2008 ; Massot-Cladera et al., 2012 ; Tzounis et al., 2011 ; Goodrich et al., 2012 ; Song et al., 2011.
Flavanols	Troubles métaboliques	Inhibition de l'accumulation des lipides dans les cellules	Protection des cellules b	Ralentissement du Diabète de type 2	In vivo (chez le rat Zucker)	Strata et al., 2016
Flavanols	Troubles métaboliques	Stimulation de la sécrétion d'insuline	Aucun effet sur la résistance à l'insuline et augmentation des concentrations sériques d'insuline	Augmentation de la masse cellulaire b fonctionnelle	In vivo (chez l'homme et le rat)	Basu et al., 2015 ; Jalil et al., 2008 ; Fu et al., 2013
Flavanols	Syndrome métabolique,	Modulation de la signalisation de l'insuline	Augmentation de la réponse à l'incrétine	Favorisation de la sécrétion d'insuline	In vivo (chez l'homme)	Strat et al., 2016
			Amélioration de la fonction de barrière intestinale ; Réduction du LPS et de l'inflammation chronique	Amélioration de la signalisation de l'insuline		
			Réduction de la résistance à l'insuline	Favorise l'homéostasie du glucose		

Flavanols	Inflammation	Modulation du microbiote intestinal humain ; Modulation de la composition et de la fonction du microbiome intestinal ; Amélioration de la fonction de la barrière intestinale et l'amélioration de la signalisation de l'insuline.	Effets prébiotiques	Atténuation de l'endotoxémie métabolique	In vitro et In vivo (études cliniques chez l'homme) et les rats	Dorenkott et al., 2014 ; Gu et al., 2014 ; Strata et al., 2016 ; Tzounis et al., 2008 ; Massot-Cladera et al., 2012 ; Tzounis et al., 2011 ; Goodrich et al., 2012 ; Song et al., 2011.
Flavanols	Troubles métaboliques	Inhibition de l'accumulation des lipides dans les cellules	Protection des cellules b	Ralentissement du Diabète de type 2	In vivo (chez le rat Zucker)	Strata et al., 2016
Flavanols	Troubles métaboliques	Stimulation de la sécrétion d'insuline	Aucun effet sur la résistance à l'insuline et augmentation des concentrations sériques d'insuline	Augmentation de la masse cellulaire b fonctionnelle	In vivo (chez l'homme et le rat)	Basu et al., 2015 ; Jalil et al., 2008 ; Fu et al., 2013
Flavanols	Syndrome métabolique,	Modulation de la signalisation de l'insuline	Augmentation de la réponse à l'incrétine	Favorisation de la sécrétion d'insuline	In vivo (chez l'homme)	Strat et al., 2016
			Amélioration de la fonction de barrière intestinale ; Réduction du LPS et de l'inflammation chronique	Amélioration de la signalisation de l'insuline		
			Réduction de la résistance à l'insuline	Favorise l'homéostasie du glucose		

Flavanols	Syndrome métabolique	Module la production d'oxyde nitrique	Diminution de l'oxyde nitrique	Réduction des maladies cardiovasculaires	In vivo (chez l'homme)	Hooper et al., 2008
Flavanols	Stress oxydatif ; obésité ; syndrome métabolique	Inhibition de la peroxydation lipidique	Réduction des espèces réactives d'oxygène	Protection contre les effets du stress oxydatif et amélioration de la fonction vasculaire	In vivo (chez l'homme)	Rios et al., 2002
Flavanols	Inflammation	Inhibition de l'absorption des lipides	Diminution des lipides dans le sang	Réduction de l'infiltration des macrophages dans les adipocytes abaissant le tonus inflammatoire	In vivo (chez l'homme)	Gu et al., 2014
		Inhibition des lipases digestives	Augmentation de la teneur en lipides dans les matières fécales			
Flavanols	Troubles métaboliques	Modulation du taux de cholestérol et triglycérides	Diminution du LDL Cholestérol et cholestérol total	Diminution de risques de maladies cardiovasculaires	In vivo (chez l'homme)	Jia et al., 2010
Flavanols	Troubles métaboliques	Modulation de la digestion des lipides en améliorant indirectement le contrôle de la glycémie	Réduction de l'hyperlipidémie et ses effets délétères subséquents sur l'homéostasie du glucose.	Maintien de l'homéostasie du glucose	In vivo (chez la souris)	Cremonini et al., 2016

Flavanols	Obésité	Inhibition de l'adipogenèse chez les préadipocytes 3T3 L1 ; Inhibition des enzymes digestives impliquées dans la digestion des graisses ;	Influence sur la dégradation et l'absorption des glucides et des lipides	Réduction de l'obésité	In vitro et in vivo (Chez l'homme)	Farhat et al., 2014 ; Gu et Lambert, 2013
Polyphénols totaux ; Flavanols ; épicatéchine	Diabète du type 2	Inhibition de l'inactivation de la voie PI3K / AKT et de l'AMPK ; Inhibition de l'augmentation des teneurs de PEPCK ; Inhibition de la diminution de l'absorption du glucose	Diminution de la tyrosine phosphorylée ; Diminution des teneurs récepteur d'insuline et substrats récepteur d'insuline ; Diminution des teneurs de GLUT-2;	Amélioration de la sensibilité à l'insuline de l'HepG2 ; Retardement du dysfonctionnement hépatique ;	In vitro	Cordero-Herrera et al., 2014
Polyphénols totaux	Obésité ; Maladies métaboliques	Régulation du métabolisme des lipides ; Activation des facteurs de transcription	Induction de l'expression de gènes métaboliques qui jouent un rôle dans le métabolisme de l'énergie	Diminution des maladies métaboliques liées à l'obésité ; Atténuation de l'inflammation chronique.	In vivo (Chez l'homme et le rat); In vitro	Ali et al., 2014
Flavanols	Maladies cardiovasculaires	Régulation positive de la NO endothéliale synthase (eNOS)	Augmentation de la production de l'oxyde nitrique (NO)	Diminution de la tension artérielle et augmentation de la vasodilatation ; Amélioration de la fonction endothéliale	In vivo (Chez l'homme)	Latham et al., 2014

Procyanidines	Obésité	Inhibition de l'α-amylase pancréatique, de la lipase pancréatique et de la phospholipase A2	Diminution de la masse corporelle	Ralentissement de l'obésité	In vitro	Gu et al., 2011
Flavonoïdes	Diabète	Activation de la peroxyde dismutase	Contrôle de la glycémie posprandial; Réduction des acides gras plasmatiques	Amélioration du système de défense antioxydant	In vivo (chez les rats)	Jalil et al., 2008
Flavanols	Troubles métaboliques	Inhibition de l'absorption des lipides, l'accumulation de graisse et de l'hyperlipidémie	Amélioration de la glycémie postprandiale	Prévention de l'accumulation des lipides ; Maintien de l'homéostasie du glucose ; Préservation de la flexibilibilé métabolique et de la sensibilité à l'insuline	In vivo (chez l'homme)	Eckardt et al., 2011 ; Martins et al., 2012 ; Fernandez-Millan et al., 2015 ; Eckel et al., 2005
Flavanols	Diabète de type 2	Stimulation de la libération d'insuline dans le sang	Intensification de la sensibilité à l'insuline	Amélioration du contrôle du taux de glucose chronique	In vivo (chez l'homme)	Martin et al., 2014 ; Mubarak et al., 2015
			Augmentation de la libération d'insuline	Amélioration du contrôle du taux de glucose aigue		

Flavanols	Obésité	Activation du système de l'oxyde nitrique	Induction d'une vasodilatation	Protection contre les maladies cardiovasculaires	In vivo (chez l'homme)	Fisher et al., 2003
Flavanols	Troubles métaboliques	Inhibition de l'activité des espèces réactives de l'oxygène ; Inhibition de l'oxydation du cholestérol LDL	Augmentation du taux plasmatique d'antioxydants	Prévention des facteurs de risques cardiométaboliques ; Protection contre les maladies cardiaques	In vivo (chez l'homme)	Weisburger, 2001
Procyanidines	Troubles lipidiques	Inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol et des acides biliaires	Diminution de la solubilité micellaire du cholestérol	Régulation de la cholestérolémie	In vivo (chez l'homme et le rat)	Yasuda et al., 2008
Catéchine, épicatéchine	Troubles métaboliques	Activation de la production de NO endothéliale	Diminution modérée de la pression artérielle ; Diminution de l'agrégation des plaquettes ; Augmentation des cellules progénitrices angiogéniques.	Prévention des maladies cardiométaboliques	In vivo (chez l'homme)	Belz et Mohr-Kahaly, 2011
Flavanols	Inflammation	Inhibition des enzymes générant des eicosanoïdes ; Inhibition des activités de la dioxygénase et de la LTA4 synthase du 5-LOX humain	Contrôler la formation de niveaux des eicosanoïdes dans les cellules inflammatoires	Modulation du métabolisme des eicosanoïdes	In vitro et in vivo (chez l'homme)	Schewe et al., 2001 et 2002 ; Schramm et al. 2001 ; Gu et Lambert, 2013

Flavanols	Maladies cardiovasculaires	Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine	Diminution de la tension artérielle	Ralentissement des maladies cardiovasculaires	In vivo (Chez l'homme)	Latham et al., 2014 ; Grassi et al., 2010 ; Actis-Goretta et al., 2006 ; Persson et al., 2011
Flavanols	Obésité	Inhibition de l'activité kinase des récepteurs d'insuline et ses marqueurs de signalisation (ERK et Akt) dans les préadipocytes 3T3-L1 ; Inhibition de la différenciation cellulaire et l'accumulation de lipides dans les préadipocytes 3T3 -L1	Atténuation du gain de poids corporel et l'accumulation de graisse	Empêchement du développement de l'obésité	In vivo (Chez la souris)	Min et al., 2013

Catéchine ; Epicatéchine ; Flavanols	Diabète du type 2	Inhibition de la digestion des glucides et de l'absorption du glucose dans l'intestin; Stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques β; Modulation de la libération du glucose par le foie, Activation des récepteurs de l'insuline et de l'absorption du glucose; Modulation des voies de signalisation intracellulaires et de l'expression des gènes; Inhibition des activités de l'α-glucosidase; Inhibition de l'absorption du glucose; Inhibition des activités des activités de l'α-amylase	Protection des cellules □ ; Augmentation de la sécrétion d'insuline ;	Prévention de l'insulino-résistance, du syndrome métabolique et éventuellement du diabète de type 2 ; Maintien l'homéostasie du glucose et des hydrates de carbone	In vitro et in vivo (Chez l'homme)	Kwon et al., 2007 ; Kwon et al., 2008 ; Hanhineva et al., 2010
Flavanols	Maladies cardiovasculaires	Activation de la production de S-nitrosoglutathione	Augmentation de la production d'oxyde nitrique vasodilatateur	Réduction de la tension artérielle	In vivo (chez l'homme)	Taubert et al., 2007
Flavanols	Obésité	Modulation du métabolisme lipidique ; Diminution de la synthèse des acides gras	Suppression de l'expression de gènes pour les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras ; Réduction de l'expression de gènes des molécules liées au transport des acides gras	Empêchement de l'obésité induite par un régime riche en matière grasse	In vivo (Chez le rat)	Matsui et al., 2005

Polyphénols totaux	Stress oxydant ; inflammation	Inhibition de l'expression du stress du réticulum endoplasmique hépatique	Réduction du taux de cholestérol plasmatique et de l'athérosclérose aortique ; Réduction de plusieurs gènes liés à l'apoptose, au métabolisme des lipides et de l'inflammation ; Augmentation du Bcl2	Amélioration de l'hyperlipidémie et l'athérosclérose	In vivo (chez la souris)	Guan et al., 2016
Procyanidines	Troubles métaboliques	Inhibition de la synthèse des lipides dans les cellules Hep G2	Diminution du taux de graisses dans les cellules	Réduction de la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires	In vitro	Guerrero et al., 2013 ; Grassi et al., 2005
Polyphénols totaux	Stress oxydant ; inflammation	Modulation du métabolisme des lipides cellulaires	Diminution de la formation des plaques athérosclérotiques	Protection contre le développement de l'athérosclérose	In vivo (Chez l'homme)	Zanotti et al., 2015
Flavonoïdes	Troubles métaboliques	Modulation du métabolisme des glucides	Restauration de l'intégrité et de la physiologie des cellules β; Amélioration de l'activité libératrice d'insuline et de l'absorption du glucose	Prévention des maladies cardiométaboliques.	In vitro	Grassi et al., 2015 ; Dragan et al., 2015
Flavanols	Troubles métaboliques	Modulation de la lipolyse et la biogenèse mitochondriale	Diminution de la pression artérielle ; Augmentation du taux de protéine de la carnitine palmitoyltransférase 2 ; Augmentation des taux de protéine découplante (UCP) 1	Réduction du risque de syndrome métabolique	In vivo (Chez la souris)	Watanabe et al., 2014

Flavanols	Hyperglycémie chronique et Diabète	Activation de la superoxyde dismutase (SOD) et inhibition de l'hème oxygénase (HO-1)	Diminution de la masse corporelle, du taux de glucose et d'insuline, de la tolérance au glucose et résistance à l'insuline Réduction des teneurs d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et la teneur en carbonyle dans le foie	Protection des hépatocytes en améliorant les compétences antioxydantes dans le foie	In vivo (Chez le rat Zucker)	Cordero -Herrera et al., 2015
Flavanols	Diabète de type 2	Inhibition de la caspase-3 ; Activation de la glutathion peroxydase ;	Augmentation des teneurs des gènes anti apoptotiques tels que Bcl-xL; Diminution des teneurs des gènes pro-apoptotiques tels que de Bax	Atténuation de l'hyperglycémie ; Réduction de la résistance à l'insuline et augmentation de la masse et la fonction des cellules bêta ; retardement de la perte de la masse des cellules bêta fonctionnelles et retardement de la progression du diabète	In vivo (Chez le rat)	Fernández-Millán et al., 2015

Chapitre 2. Etudes expérimentales

2.1. Obtention des extraits de cacao et analyses

2.1.1. Obtention des échantillons des fèves de cacao

La récolte des cabosses de cacao (variété Forastero) a été faite sur la station du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) de Guyane. La récolte a été séparée en deux, une partie de la récolte a été séchée directement au soleil pendant 7 jours (lot non fermenté) ; l'autre a été fermentée en boite isobox (60 cm wide, layer depth : 50 cm) pendant 6 jours, un brassage a été réalisé à 2 et 4 jours de fermentation puis à 6 jours les fèves ont été séchés au soleil pendant 7 jours (lot fermenté). Les fèves ont été conservée sous vide jusqu'à leur analyse.

2.1.2. Obtention de la poudre de cacao

Un kilogramme de fèves marchandes a été broyé dans un broyeur de type Capco (John Gordon®, London, Angleterre). Les amandes ont été ensuite séparées des coques par ventilation puis congelées dans de l'azote liquide par trempage avant d'être réduites en poudre dans un moulin de type Mixeur (Seb®, Selongey, France). Tous les échantillons de poudre de cacao ont été tamisés (mailles de 0,5 µm) puis placés dans des pots en verre hermétiquement fermés et enfin conservés à -20°C jusqu'aux analyses.

2.1.3. Délipidation et extraction des polyphénols totaux

240 g de poudre de cacao ont été soumis à une délipidation puis à une extraction des polyphénols selon la méthode décrite par Andrés-Lacueva et al., (2000) avec quelques modifications. Après délipidation, par 3 L d'hexane (SIGMA-ALDRICH, PURISS. P.A., ACS REAGENT, REAG. PH. EUR., ASSAY (GC) ≥ 99 %) dans un

montage soxhlet équipé d'un ballon à fond rond de 5L de rodage 29 / 32 et d'une cartouche en cellulose de type Thimbles (75*250 mm ; C/25 ; Statorius Stedim). La poudre obtenue a été macérée dans un mélange acétone (SIGMA ALDRICH, 24201, PURISS., MEETS ANALYTICAL SPECIFICATION OF PH. EUR., BP, NF, 99 % (GC)) / eau distillée avec une proportion (V/V) (1400 mL / 600mL) sous agitation mécanique pendant 1 heure à température ambiante. La phase liquide a été filtrée sur un papier filtre qualitatif (600 medium filtration rate particile rention : 10-20 µm ; V W R) afin d'éliminer les résidus de poudre de cacao puis saturée en NaCl (USP, BP, PH. EUR., JP, PURE, PHARMA GRADE, ASSAY (ARG) CALC A.D.S : 99, - 100,5 %) pour permettre à celle-ci de se séparer en deux phases : phase supérieure (phase acétonique) et phase inférieure (phase aqueuse) contenant respectivement des procyanidines et xanthines, et les acides hydroxycinnamiques. La phase acétonique a été concentrée sous vide réduite puis reprise avec 200 mL d'eau distillée pour être congelée à -20°C avant d'être séchée avec un lyophilisateur (Heto power Dry LL15a ; Electron corporation).

2.1.4. Composition chimique des extraits de cacao

2.1.4.1. Dosage des polyphénols totaux par la méthode du Folin-Ciocalteu

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu est une méthode de référence Folin et Denis (1915). Folin et Dénis (1915) ont décrit une méthode pour la détermination des phénols libres et conjugués, à l'aide d'un réactif phosphomolybdique qui, en présence de carbonate de sodium, donne une réaction colorée avec les phénols. Le réactif en milieu basique oxyde les composés phénoliques et dévient bleu après réduction. Le dosage des phénols sera réalisé par spectrophotométrie d'absorption selon la loi Beer-Lambert. Cependant cette méthode

a été modifiée (Agbor et al., 2014). Une gamme d'étalonnage à cinq niveaux de concentration (50, 100, 150, 200 et 250 mg / L) d'acide gallique (Sigma-Aldrich, assay : ≥ 99%) a été préparé à partir d'une solution mère préparée à 2,5 g / L dans de l'eau distillée contenant 1 % de DMSO. Trois échantillons contrôles qualité (CQ) ont été réalisés (75 -125 et 225 mg / L). Le blanc est de l'eau distillée contenant 1 % DMSO. Des extraits de cacao fermentés et non fermentés (10 mg) ont été dissouts dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (Prolabo, P.E / BP : 189°C, P. F/M. P : 18,4°C) (DMSO). Une sonication de 5 min a été effectuée afin de solubiliser les extraits dans le DMSO. Une dilution au 1/10 a été effectuée dans de l'eau distillée afin d'obtenir des solutions à 1 % de DMSO. 250 µl de chaque solution (extrait de cacao, solutions filles, CQ et blanc) sont prélévés dans des tubes à hémolyses et le réactif Folin-Ciocalteu est ajouté à raison de 60 µL dans chaque tube. Une agitation mécanique a été réalisée afin que les solutions soient en contact. Suite à une homogénéisation par agitation mécanique (vortex) pendant 2 minutes ; les tubes sont laissés au repos pendant 2 mn à l'abris de la lumière. 625 µl de carbonate de sodium (Sigma-Aldrich, SA 81432, 99%) à 4% est rajoutée à chaque tube (extrait à 1% de DMSO, solutions filles, contrôles et le blanc). Les tubes sont agités et laissés reposer pendant 1 mn. Les tubes ont été complétés avec de l'eau distillée afin d'avoir un volume final de 5 mL. Les tubes sont laissés à l'obscurité pendant 45 mn. Une lecture fut effectuée avec un spectrophotomètre (Beckman, DU 640) à une longueur d'onde 765 nm. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique / gramme de cacao.

2.1.4.2. Identification et quantification des polyphénols

2.1.4.2.1. Analyses qualitatives : LC-MS-UV

Les analyses sont effectuées sur une UPLC Acquity H-Class (Waters), équipée d'une colonne Luna Omega 1,6µm Polar C18, 100 x 2,1 mm (Phenomenex), maintenue à 25°C tout le long de l'analyse. Le chromatogramme UV est enregistré sur un PDA détecteur entre 200 et 400nm. Les phases mobiles utilisées sont de l'eau avec 0.1% (v/v) d'acide formique (A) et de l'acétonitrile avec 0.1% (v/v) d'acide formique (B). La séparation est effectuée en appliquant le gradient suivant : de 12% à 24% de B de 0 à 5 minutes, puis de 24% à 100% de 5 à 6 minutes et enfin 100% de B pendant 2 min avant retour aux conditions initiales en 1 min et une étape d'équilibration de 3 min avant la prochaine injection, à un débit constant de 0,4 ml/min. Le volume d'injection est de 10µl. Le spectromètre de masse couplé à la chaîne chromatographique est un Synapt G2-S (Waters) équipé d'une source ESI opérant en mode Haute résolution. Le spectre de masse est enregistré en mode négatif, entre 50 et 1500 Da. La tension de capillaire est de 2kV et la tension de cône de 30 V. Les températures de sources et de désolvatation sont respectivement de 140 et 450°C.

2.1.4.2.2. Analyses quantitatives : LCMSMS

Les analyses sont effectuées sur une UPLC Nexera X2 (Shimadzu), équipée d'une colonne Luna Omega 1,6µm Polar C18, 100 x 2,1 mm (Phenomenex), maintenue à 25°C tout le long de l'analyse. Les phases mobiles utilisées sont de l'eau avec 0.1% (v/v) d'acide formique (A) et de l'acetonitrile avec 0.1% (v/v) d'acide formique (B). La séparation est effectuée en appliquant le gradient suivant : de 12% à 24% de B de 0 à 5 minutes, puis de 24% à 100% de 5 à 6 minutes et enfin 100% de B pendant 2 min avant retour aux conditions initiales (idem UPLC-MS-UV), à un débit

constant de 0,4 ml/min. Le volume d'injection est de 10µl. Le spectromètre de masse LCMS 8050 (Shimadzu) est équipé d'une source de type ESI et d'un triple quadripôle opérant en mode négatif. Les composés sont détectés en mode MRM selon le tableau suivant :

Composés	Espèce chimique	Ion précurseur	Ion fragment	Energie de collision	LOQ*
Catéchine	$[M-H]^-$	289.10	245.15	15	0.5 mg/ml
Epicatéchine	$[M-H]^-$	289.10	245.15	15	0.5 mg/ml
Procyanidine B	$[M-H]^-$	577.20	407.20	24	0.5 mg/ml

Les paramètres de source ont été optimisés avec les valeurs suivantes : Gaz nébuliseur 3L/min, gaz chauffant 10L/min, température de l'interface 300°C, température de la ligne de désolvatation 250°C, température du bloc chauffant 400°C et enfin débit de gaz séchant 10L/min.

2.1.5. Activités antioxydantes in vitro

2.1.5.1. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Le principe du test DPPH est basé sur la mesure du pouvoir réducteur et le calcul de l'IC50 (concentration pour laquelle on observe 50 % de l'effet attendu) des polyphénols contenus dans l'extrait. Lorsque le DPPH réagit avec un composé antioxydant, celui-ci lui cède un hydrogène, le DPPH est alors réduit.

Le pouvoir réducteur des extraits de cacao a été mesuré selon la méthode de Mensor et al., (2001) avec quelques modifications.

Pour mesurer le pouvoir réducteur des extraits de cacao et calculer leur IC50, une gamme d'étalonnage DPPH a été préparée à partir d'une concentration mère de 100 µM. 9,9 mg de DPPH ont été dissout dans 250 mL de méthanol HPLC (FICHER CHEMICAL, HPLC GRADIENT GRAVE, ASSAY (GC) : ≥ 99,99 %) sous agitation à l'abris de la lumière. Des dilutions de DPPH ont été préparées (100 – 75 – 50 – 25 et 12,5 µM) pour la droite de calibration puis 250 µl de chaque concentration de la gamme ont été déposés en triplicate par puits dans une plaque de 96 puits. Les extraits de cacao fermenté et non fermenté ont été dissouts dans du méthanol selon les concentrations suivantes (1000 – 500 – 250 – 100 – 50 – 25 et 12,5 µg / mL). 10 µl de chaque concentration des extraits de cacao ont été déposés en triplicate dans des puits ainsi qu'un blanc contenant 10 µl de méthanol. 240 µl de DPPH à 100 µM a été ajouté dans tous les puits contenant les extraits de cacao et le blanc. Le changement de couleur du violet au jaune clair est mesuré à 515 nm est mesurée par un spectromètre UV (Thermo scientific Multiskan EX, Cat, 200 - 240 V) toutes les 10 mn.

2.1.5.2. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Le test Orac (Oxygen Radical Absorbance Capacity ou capacité d'absorption des radicaux libres) est basé sur l'oxydation de la fluorescéine via un transfert d'atomes d'hydrogène par des radicaux, le 2-2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (granular, 97%, 440914 -25 G ; Sigma Adrich). L'oxydation est observée par la diminution de l'intensité de la fluorescence en spectrofluorométrie. En présence d'un antioxydant, on observe une prolongation de la fluorescence. Le pouvoir antioxydant a été mesuré selon la méthode de Morel et al., (2011) avec quelques modifications. Pour quantifier la protection par un antioxydant, on mesure l'aire sous la courbe de l'échantillon testé et on peut la comparer à l'air sous la courbe d'un antioxydant de référence comme le Trolox. Pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits de cacao, une solution de tampon phosphate est préparée suite au mélange d'une solution de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4 : S5011-5005 ; FW119.98 ; 99% ; Sigma) à 0,15 M et hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO4 : EMB 45053 ; 28026.360 ; 99% ; Prolabo) à 0,15 M. Dans un erlern, 81 mL de solution Na_2HPO4 avec 19 mL de NaH_2PO_4 pour constituer la solution de tampon phosphate. Une gamme d'étalonnage de Trolox (C53188-07-1 ; 98% ; Fluka chemika) fut préparée avec des concentration de 75 – 50 – 25 – 12,5 et 6,25 µM. Les extraits de cacao fermentés ou non sont testés à 12, 5 µg / mL. Deux solutions témoins : Romarin éthanolique et acide chlorogénique (C3878 ; 98% ; Sigma Aldrich) sont testées à 12,5 µg / mL et 8,8µm respectivement. 20 µl de chaque solution (gamme de Trolox, Romarin, acide chlorogénique, extraits de cacao fermentés et non fermentés) sont déposés dans une plaque de 96 puits en triplicate. 100 µl de Tampon phosphate et de fluorescéine sont rajoutés à tous les puits sachant que la fluorescéine (CI 45350 ; CAS-2321-07-5 ; Panreac Aplichem) est préparée juste après dépôt des solutions

précédentes dans les puits. Une incubation de la plaque est réalisée à 37°C pendant 10 mn sous agitation mécanique. Pendant l'incubation, la solution d'AAPH a ensuite été préparée à 103,2 mg / mL puis rajoutée à raison de 50 µl par puits avant la lecture. Le volume final dans les puits étant 270 µl. La lecture est effectuée à l'aide d'un spectophotomètre de type Berthold (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Tristar, LP941, Germany) toutes les 5 mn pendant 70 mn à 535 nm avec une longueur d'excitation de 485 nm. Les résultats sont exprimés en µmol équivalents Trolox par microgramme d'extrait sec (µmol TE / µg d'extrait sec).

2.1.6. Activités antiinflammatoires et immunomodulatrices *in vitro*

2.1.6.1. Viabilité cellulaire

2.1.6.1.1. Culture cellulaire

Des cellules J774A.1 (Mus musculus, mouse, Ascites, Macrophage, TIB-67, ATTC) ont été maintenues dans un incubateur humidifié contenant 5% de CO2 et 95% d'air à 37 ° C. Elles ont été cultivées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI medium) 1640 (1X) + GlutaMax^{Tm}-I (61870-10 ; gibco ; UK) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (10270-06 ; 42F2567 K ; GIBCO) de 1% des antibiotiques suivants : pénicilline et streptomycine (150 70-063 ; GIBCO).

2.1.6.1.2. Evaluation de la cytoxicité

La viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant le test de MTS / PMS selon la méthode de Erlich-Hadad et al., (2017) avec quelques modifications. Les cellules ont été ensemencées à raison de 500 000 cellules par puits dans des plaques à 96 puits (F96-Polysorp ; NUNC-IMMUNO ; Thermo scientific). Après 2H d'incubation des

cellules en plaque à 96 puits, les extraits de cacao préalablement préparés (50-25-12,5 µg / mL) sont rajoutés à raison de 100 µl / puits. La plaque est ensuite incubée pendant 20 h. Le lendemain, les solutions de MTS (G111A) et PMS (6110A) sont mélangées à raison de 2 mL de MTS + 100 µl de PMS dans un tube à essai à l'abris de la lumière. Le mélange est ensuite distribué dans tous les puits à raison de 20 µl / puits puis une incubation est réalisée pendant 4H. Avant la lecture, une agitation mécanique de la plaque est nécessaire pendant 15mn afin que le milieu soit homogène. L'absorbance de chaque puits a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaques à 490 nm.

2.1.6.2. TNF-α

Le dosage du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) fut effectué suivant les instructions contenus dans le KIT-ELISA (Certificat of analysis Mouse TNF alpha ELISA Ready-Set-Go ; 88-7324-88 ; 4322627 ; ThermoFisher Scientific). 100 µl de solutions d'anticorps de capture (Anti-Mouse TNF-alpha Purifed (250X), 14-7423-68 A, 4305508 ; ThermoFisher Scientific) sont déposées dans une plaque de 96 puits de type maxisorp, sauf dans les puits blancs. La plaque a ensuite été bien scellée puis incubée toute la nuit entre 4 ° C. Le lendemain, une solution de lavage (volume final : 500ml) fut préparée. Un lavage (3 fois) de la plaque à 96 puits fut effectuée avec le wash buffer à intervalle d'1mn par lavage. La plaque fut séchée sur du papier absorbant pour éliminer tout tampon résiduel (tous les lavages qui suivent sont effectués comme précédemment). La plaque 96 puits a ensuite été saturée avec le liquide diluant ELISA / ELISOP 1X (00-4202-55-55 ; 4311082, ThermoFisher Scientific) puis une incubation fut réalisée pendant 1 heure à température ambiante. Une gamme de solution standard (TNF-alpha Lyophilised Standard ; 29-8321-60 ; 4315671 ; ThermoFisher Scientifi) fut préparée à raison de 1000 -500- 250- 125- 62,5-

31,25- 15,62- 7,8 ng/mL. Les surnageants de culture ont été prélevés. Les échantillons témoins cellules et cacao sans LPS / IFN sont dilués au 1/10. Les échantillons témoins LPS/IFN et les extraits des autres concentrations de cacao sont dilués au 1/50. Les solutions (gamme d'étalonnage, extraits de cacao, témoins cellules et LPS/IFN) sont déposées à raison de 100 µl/puits selon le plan de plaque. La plaque est scellée et incubée à température ambiante pendant 2 heures. La plaque est lavée 5 fois selon le même mode de lavage précédent. Ajout de 100 µl / puits d'anticorps de détection (Ani-Mouse TNF-alpha Biotin, 13-7341-68A ; ThermoFisher Scientifi) dilués dans le diluant ELISA / ELISPOT 1X. La plaque est scellée et incubée à température ambiante pendant 1 heure. Laver 5 fois la plaque. Ajout de 100 µl / puits de solutions d'avidine-HRP (00-4100-94 ; 4314842 ; ThermoFisher Scientifi) diluée dans le diluant ELISA / ELISPOT 1X. La plaque est scellée et incubée dans la pièce à température ambiante pendant 30 minutes. Laver 7 fois la plaque comme précédemment. Ajout de 100 µl / puits de solution de TMB 1X (00-4201-56 ; E102875 ; ThermoFisher Scientific) dans tous les puits. La plaque est incubée à température ambiante pendant 15 minutes. Ajout de 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Lecture de la plaque à 450 nm puis analyse les données.

2.1.6.3. Dosage des Nitrites

2.1.6.3.1. Culture cellulaire

Des cellules J774A.1 (Mus musculus, mouse, Ascites, Macrophage, TIB-67, ATTC) ont été maintenues dans un incubateur humidifié contenant 5% de CO2 et 95% d'air à 37 ° C. Elles ont ensuite été cultivées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI medium) 1640 (1X) + GlutaMaxTm-I (61870-10 ; gibco ; UK)

additionné de 10% de sérum de veau fœtal (10270-06 ; 42F2567 K ; GIBCO) et de 1% des antibiotiques suivants : pénicilline et streptomycine (150 70-063 ; GIBCO).

2.1.6.3.2. Dosage des nitrites par la méthode de Griess

Le taux de nitrite est déterminé selon Ranneh et al., (2016) avec quelques modifications en utilisant la méthode de griess (diazotation d'une amine primaire aromatique en présence d'un nitrite en milieu acide puis copulation avec une autre amine aromatique). Les cellules sont reprises par aspiration et refoulement dans une flasque de culture dans le but de décrocher les cellules de la flasque. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1000 Tours / mn pendant 5 mn avec une centrifugeuse de type CL31R (Multispeed THERMO SCIENTIFIC). Une numération cellulaire (en cellule mallasez) fut effectuée. 0,5 $*10^6$ cellules par puits ont été ensemencées dans deux plaques de 24 puits puis incubées à 37°C dans une étuve de type Heraeus instruments (G. BEYNEIX) à 5% de CO2 pendant 2H. Les extraits de cacao fermenté et non fermenté sont rajoutés dans les plaques à raison de 50-25-12,5-6,25 et 3,125 µg /mL. Les plaques sont incubées pendant 24H. Les cellules sont stimulées avec du LPS à 100 ng / mL (Ecoli L2880 ; GIBCO) et IFN gamma (PMC 4031 ; GIBCO) à 10 ng /mL. Les plaques sont de nouveau incubées pendant 24H. Une gamme d'étalonnage de nitrite de sodium (99 % ; CAS : 7632-00-0, EC 231-555-9 **;** SIGMA ALDRICH) est réalisée suivant ces concentrations : 100 – 50 – 25- 12,5- 6,25 – 3,125 et 1,56 µM puis déposée dans une plaque de 96 puis de type polysorp (THERMO SCIENTIFIC) à raison de 100 µl / puits. La révélation est réalisée grâce à la méthode de Griess avec un mélange à part égale des solutions de N - (1-Naphthyl) ethyylenediamine dihydrochloride (CAS : 1465 -24- 4 ; 98% ; FLUKA ANALYTICAL) et Sulphanilamide (p-Aminobenzene-sulfonamide ; 99% ; S-9251 ; SIGMA-ALDRICH). Le réactif de Griess est reparti dans tous les puits de la plaque à raison de 100 µl / puits. Une lecture

est effectuée à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque de type Kinetic microplate reader UV max (VIETECH SARL).

Chapitre 3. Résultats et discussions

3.1. Teneur en polyphénols totaux de cacao obtenus après extraction

Tous les résultats obtenus dans cette étude ont été traités tout en considérant les résultats des masses des extraits polyphénoliques obtenus après délipidation. L'analyse des rendements d'extraction a montré une différence des extraits phénoliques du cacao selon que celui-ci ait été ou non fermenté. La fermentation a diminué de 55,87 % la teneur en polyphénols totaux des fèves de cacao fermentés.

Tableau 26. Teneurs en extraits polyphénoliques totaux dans les fèves de cacao

Echantillons	Masse de poudre utilisée (g)	Masse d'extrait polyphénolique de cacao (g)
Cacao non fermenté	240	6,0995
Cacao fermenté	240	3,4081

Après délipidation de la poudre de cacao puis extraction des polyphénols, la masse d'extrait polyphénolique totale de cacao non fermenté a représenté 2,54 % de la masse initiale des fèves de cacao alors que celle de l'extrait polyphénolique total de cacao fermenté a représenté 1,42 %. Par ailleurs, des études ont montré que les polyphénols des fèves de cacao contribuent à environ 12%-18% de la masse de cacao sec (Bravo, 1998 ; Harwood, 2013 ; Khan et al., 2014). La teneur en polyphénols solubles dans la masse des fèves de cacao fraîches est de 15 à 20% dans les fèves

non fermentées et 5% dans les fèves fermentées (Albertini et al., 2015). Ces valeurs sont valables uniquement pour les fèves de Forastero. Le rendement des extractions que nous avons effectuées montrent que les fèves de cacao analysés sont faibles en polyphénols. Les résultats sont largement inférieurs à ceux rencontrés dans la littérature (Bravo, 1998). Plusieurs raisons pourraient expliquer cette différence au niveau des résultats. En effet la masse des composés phénoliques dans le cacao dépend de plusieurs paramètres. La fermentation est l'un des principaux processus qui dégrade les polyphénols du cacao (De Pascual-Teresa et al., 2000 ; Counet et al., 2004 ; Prior et Gu, 2005 ; Brunetto et al., 2007 ; Cooper et al., 2007 ; Rusconi et Conti, 2010). Lors de la fermentation, les composés polyphénoliques subissent des changements biochimiques qui conduisent à une réduction de la masse des polyphénols solubles (BonvehÍ et Coll, 2000 ; Arlorio et al., 2005). L'extrait non fermenté a une masse en composés phénoliques supérieur à l'extrait fermenté. La fermentation a donc influé sur le taux de rendement après extraction. A l'instar de la fermentation, certains paramètres devraient être pris en compte pour évaluer la masse des polyphénols du cacao.

Les changements intervenus dans la teneur en composés phénoliques au cours du stockage des fèves de cacao sont rapportés par plusieurs études (Clapperton et al., 1992, Nazaruddin et al., 2006). En effet, l'oxydation et la polymérisation de certains flavanols jouent un rôle majeur dans la dégradation de ces composés au cours du traitement post-récolte et du stockage (Nazaruddin et al., 2006 ; Hii et al., 2009). Les traitements de stockage des fèves (de 5 à 15 jours) entrainent une réduction considérable de certains flavonoïdes dans les fèves de cacao. Cependant, la prolongation de la durée de stockage n'affecte pas de manière significative la teneur en de certains flavanols (Nazaruddin et al., 2006). Les fèves de cacao fermentés et

non fermentés ont été conservées plus de 15 jours. Ce long temps de conservation aurait influé sur la masse de polyphénols obtenus.

De plus la variété génétique des fèves de cacao (Clapperton et al., 1994 ; Luna et al., 2002 ; Niemenak et al., 2006 ; Othman et al., 2010). La variété Forastero est plus riche en polyphénols que les autres variétés. La masse en composés phénoliques des fèves de cacao se différencie non seulement de la variété génétique mais aussi des variations individuelles des espèces de cacaoyer (Tomas-Barberan et al., 2007). En effet, au sein d'une même espèce, cette masse peut varier et dépend de nombreux facteurs. Certaines fèves de cacao d'une même variété produites en région tropicale peuvent être riches en polyphénols tandis que d'autres fèves de cette même variété cultivées dans d'autres pays de cette région peuvent produire des fèves avec des teneurs faibles en polyphénols (Kim et Keeney 1984 ; Tomas-Barberan et al., 2007 ; Caligiani et al., 2010).

Les conditions agricoles, agronomiques (Jaganath et al., 2010) et climatiques durant la croissance influent également sur la masse de polyphénols de cacao (Aron et al., 2008 ; Fraga et al., 2010). En effet, les cacaoyers sont cultivés dans une zone tropicale avec un climat tropical chaud et humide, caractérisé par une forte intensité de précipitations, une température constante et une forte insolation (Spangenberg et al., 2001). Ils sont plantés à l'ombre des bananiers, des palmiers ou d'autres arbres indigènes pour éviter les vents violents (Franzen et al., 2007 ; Jagoret et al., 2011). De nombreux facteurs environnementaux (type de sol, exposition au soleil, pluviométrie ou rendement des cabosses par arbre) affectent l'accumulation de polyphénols dans les plantes (Camu et al., 2008). La lumière intense du soleil et l'irrigation stimulent l'augmentation des teneurs en anthocyanes dans la partie externe de la cabosse afin de protéger les plantes. La température, l'humidité, la disponibilité des éléments

nutritifs, l'utilisation d'engrais et des infections affectent également l'accumulation de polyphénols dans les plantes (Niemenak et al., 2006 ; Chang et al., 2009). Par ailleurs, Elwers et al., (2009) ont confirmé que la fertilisation du sol peut entraîner une réduction significative de la teneur en polyphénols totaux, en flavan-3-ols et en anthocyanes.

Le processus de maturation des cabosses de cacao diminue la masse de polyphénols de cacao (Aron et al., 2008 ; Fraga et al., 2010). Au cours de la maturation des cabosses, la concentration d'acides phénoliques diminue tandis que la teneur en anthocyanes augmente (Halbwirth, 2010). La concentration de polyphénols dans les cabosses de cacao non mûrs est plus élevée et diminue au fur et à mesure que la fève devient mûre, ce qui est associé à une réduction de l'astringence. Lors de la maturation des fèves de cacao, la masse des composés phénoliques de nos extraits auraient connu une dégradation importante. Ce qui explique également la faible teneur en polyphénols de nos extraits de cacao.

3.2. Impact de la fermentation sur la composition chimique des extraits de cacao

3.2.1. Impact de la fermentation sur les polyphénols totaux des extraits de cacao

L'extrait non fermenté contient une teneur en polyphénols totaux plus élevée (15533 ± 316 µg d'acide gallique / g de cacao) que l'extrait fermenté (5727 ± 101 µg d'acide gallique / g de cacao). La fermentation a réduit la teneur en polyphénols totaux de 63 %. Des études antérieures montrent que les différentes étapes du traitement des fèves de cacao affectent significativement la teneur en polyphénols (Wollgast et Anklam, 2000 ; Ortega et al., 2009 ; Oracz et al., 2015). La fermentation provoque une dégradation importante des composés polyphénoliques (Counet et al., 2004 ; Miller et al., 2006 ; Cooper et al., 2007 ; Ortega et al., 2008 ; Schinella et al., 2010). Par conséquent, la concentration de polyphénols dans les fèves de cacao brutes est

significativement différente de celle de la poudre de cacao et des produits de chocolat (Cooper et al., 2007 ; Ramiro-Puig et al., 2007 ; Oracz et al., 2015). Dans cette partie de notre travail, nous avons évalué la teneur en polyphénols totaux des extraits de cacao non fermentés et fermentés. La fermentation des fèves s'est effectuée pendant 6 jours. L'identification des composés présents dans les extraits de cacao et la quantification de l'épicatéchine, la catéchine et la procyanidines B ont été faits. Plusieurs méthodes existent pour quantifier la teneur en polyphénols totaux. Les polyphénols totaux peuvent être déterminés par les méthodes du Bleu de Prusse et Folin-Ciocalteu. Les polyphénols totaux dans un extrait peuvent aussi être évalués en dosant la catéchine dans cet extrait. Le dosage de la catéchine peut se faire par la méthode de dosage de la vanilline-HCl. La teneur en polyphénols totaux d'un extrait peut s'exprimer en fonction de la masse d'acide gallique par gramme d'extrait ou en fonction de la masse de catéchines par gramme d'extrait. Quant aux proanthocyanidines, ces composés peuvent être déterminés en faisant le dosage butanol-HCl (Makkar, 1989 ; McMurrough et al., 1992 ; Lee et al., 1996 ; Markham et al., 1998). Dans notre travail, le test de Folin-Ciocalteu a été utilisé pour déterminer les teneurs en polyphénols totaux présents dans les deux extraits de cacao.

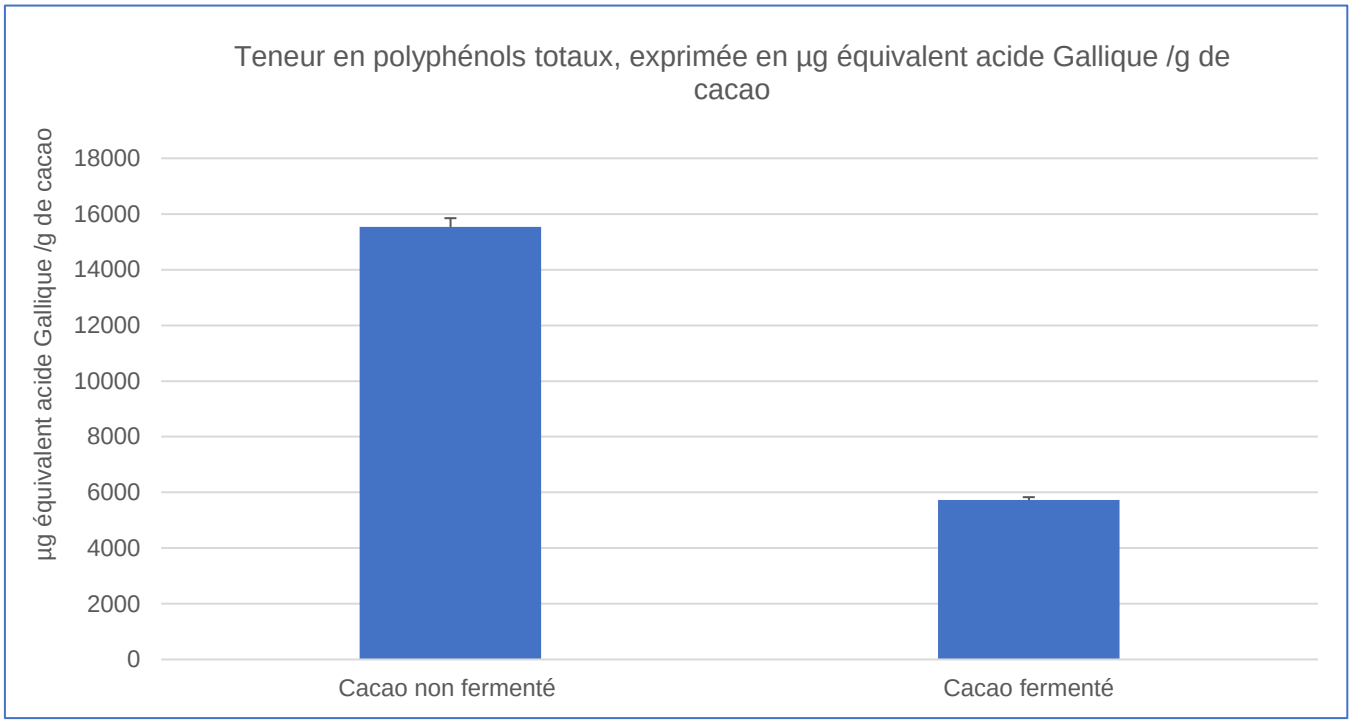

Figure 8. Impact de la fermentation sur la teneur en polyphénols totaux des extraits de cacao non fermentés et fermentés

La fermentation a réduit significativement la teneur en polyphénols totaux. Ces résultats sont en phase avec ceux rencontrés dans la littérature (Camu et al.,2008 ; Hurst et al., 2011 ; Afoakwa et al., 2012 ; Oracz et al., 2015 ; Albertini et al., 2015 ; Cruz et al., 2015 ; Pedan et al., 2017). Une différence significative a aussi été observée au niveau de la teneur de l'épicatéchine, la catéchine et de la procyanidines B. Les résultats obtenus sont également en phase avec ceux rencontrés dans la littérature (Kim et Keeney, 1984 ; Wollgast et Anklam, 2000 ; Nazaruddin et al., 2006 ; Payne et al., 2010 ; Hurst et al., 2011 ; Cruz et al., 2015 ; Albertini et al., 2015 ; Oracz et al., 2015 ; Peláez et al., 2016 ; Pedan et al., 2017). Par ailleurs, les teneurs en sucre ont augmenté dans l'extrait fermenté. Cette diminution des polyphénols observée serait due à l'effet de la fermentation. En effet pendant la fermentation, les polyphénols diffusent à partir de leurs cellules de stockage et subissent une oxydation pour devenir

des composés macromoléculaires condensés principalement des tanins insolubles (Jalil et al., 2008). Ce processus implique à la fois des réactions enzymatiques et non enzymatiques catalysées par la polyphénol oxydase (Redovnikovic et al., 2009). Cette enzyme est fortement inactivée au cours des premiers jours de la fermentation, cependant environ 50 et 60% de l'activité enzymatique après le premier et le deuxième jour est conservée (Hansen et al., 1998 ; Wollgast et Anklam, 2000 ; Jalil et al., 2008b ; Oracz et al., 2015). Par ailleurs, pendant le premier jour de la fermentation, la pulpe entourant la fève devient liquide et s'écoule, la température augmentant régulièrement. Dans des conditions anaérobies, les micro-organismes produisent de l'acide acétique et de l'éthanol. Ces processus inhibent la germination des fèves et contribuent aux changements structurels dans les fèves fermentées tels que l'élimination des enzymes et des substrats. Les liquides cellulaires se déplacent à travers les parois cellulaires et se répandent sur le cacao. Cela se produit généralement après 24 ou 48 h de fermentation. Au troisième jour, la masse de fève aura été assez uniformément chauffée à jusqu'à 45°C et restera entre cette température et 50°C jusqu'à la fin de la fermentation (Wollgast et Anklam, 2000). En conséquence, les composés polyphénoliques subissent des changements biochimiques qui conduisent à une dégradation et réduction de la teneur en polyphénols, ce qui conduit à atténuer le goût amer, astringent et l'arôme désagréable des fèves (Bonvehí et al., 2000, Arlorio et al., 2005 ; Oracz et al., 2015).

De plus, l'une des raisons de la perte des teneurs en monomères de flavanols pendant la fermentation peut être les procédés de brunissement enzymatique (Oracz et al., 2015). En effet, les polyphénols sont oxydés en composés quinoniques, qui s'associent à d'autres flavanols et anthocyanes pour former des tanins condensés de masse moléculaire élevée, essentiellement insolubles (Bruinsma et al., 1999 ; De Brito

et al., 2002 ; Nazaruddin et al., 2006 ; Oracz et al., 2015). La polyphénol oxydase est l'enzyme principale impliquée dans ces processus (Oracz et al., 2015).

Les anthocyanes font aussi partie des polyphénols totaux. Pendant le processus de fermentation, les anthocyanines sont hydrolysées en anthocyanidines et en sucres (arabinose et galactose) (Niemenak et al., 2006, Andrés-Lacueva et al., 2008 ; Camu et al., 2008 ; Oracz et al., 2015). Ces derniers composés polymérisent avec des catéchines simples pour former des tanins complexes. Ainsi, la teneur en anthocyanes a été considérée comme un bon indice pour la détermination du degré de fermentation des fèves de cacao (Lange et al., 1970 ; Pettipher, 1986 ; Wollgast et Anklam, 2000). Les anthocyanidines sont très instables sous la forme aglycone et peuvent également être rapidement transformés en procyanidines polymériques connues sous le nom de tanins condensés (Kyi et al., 2005 ; Oracz et al., 2015). Les transformations des anthocyanes conduisent à leur dégradation rapide. Déjà après quatre jours de fermentation, les pertes de ces composés atteignent 93% (Wollgast et Anklam, 2000 ; Oracz et al., 2015). Selon Cienfuegos-Jovellanos et al., (2009) la concentration de procyanidines diminue 3 à 5 fois pendant le processus de fermentation (Oracz et al., 2015). Aussi, après 60 heures de fermentation, une diminution de 24% de la teneur totale en polyphénols est perceptible. Cette diminution peut atteindre 58% des polyphénols totaux après 3 jours (Niemenak et al., 2006 ; Oracz et al., 2015). Ces données corroborent les résultats que nous avons trouvé.

3.2.2. Identification des composés présents dans les extraits de cacao

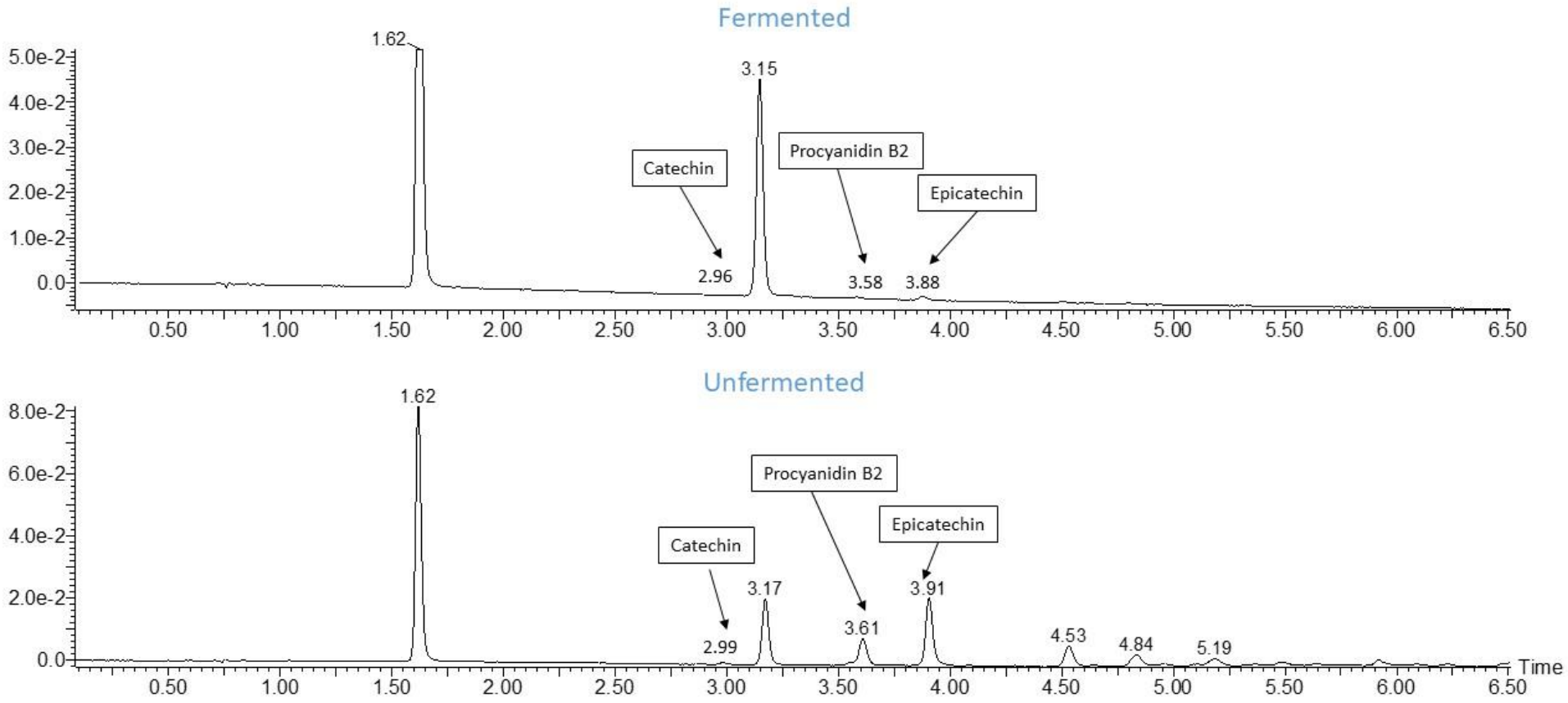

Figure 9. Chromatogrammes des extraits de cacao non fermentés et fermentés obtenus par UPLC-UV à 280 nm

Tableau 27:Composés identifiés dans l'extrait non fermentés par UPLC-MS

Composés	RT (min)	Aire	%Aire	m/z	Masse moléculaire	Formule brute	Identification
1	1,62	7070,86	17,53	181,07	180	C6H12O6	Glucose
2	2,99	240,984	0,60	289,07	290	C15H13O6	Catéchine
3	3,17	2102,995	5,21	369,03	370	Inconnu	Inconnu
4	3,56	329,131	0,82	865,2	866	C45H38O18	Isomère Procyanidines C
5	3,61	4745,264	11,77	577,13	578	C30H26O12	Procyanidines B
6	3,75	68,322	0,17	1153,26	1154	C61H45N4O20	Inconnu
7	3,91	14121,411	35,01	289,07	290	C15H14O6	Epicatéchine
8	4,08	62,916	0,16	577,13	578	C30H26O12	Isomère Procyanidines B
9	4,53	3170,24	7,86	865,2	866	C45H38O18	Isomère Procyanidines C
10	4,83	2096,773	5,20	1153,26	1154	C61H46N4O20	Inconnu
11	4,96	634,411	1,57	865,2	866	C45H38O18	Isomère Procyanidines C
12	5,10	364,958	0,90	1153,26	1154	C61H45N4O20	Inconnu
13	5,19	1541,743	3,82	1441,33	1442	C70H62N2O32	Inconnu
14	5,37	517,234	1,28	1441,33	1442	C70H62N2O32	Inconnu
15	5,48	1000,843	2,48	393,18	394	C17H30O10	Inconnu

16	5,64	537,913	1,33	1008,22	2014,5	Inconnu	Inconnu
17	5,80	347,015	0,86	1152,26	2302,5	Inconnu	Inconnu
18	5,92	1024,207	2,54	577,13	578	C30H26O12	Isomère Procyanidines B
19	6,09	244,756	0,61	865,2	866	C45H38O18	Isomère Procyanidines C
20	6,23	111,317	0,28	737,17	738	C36H34O17	Inconnu

Tableau 28: Composés identifiés dans l'extrait fermenté par UPLC-MS

Composés	RT (min)	Aire	%Aire	m/z	Masse moléculaire	Formule brute	Identification
1	1,62	10771,318	65,71	181,07	180	C6H12O6	Glucose
2	2,96	33,813	0,21	289,07	290	C15H13O6	Catéchine
3	3,15	4909,734	29,95	195,09	194	C7H14O6	Bornesitol / Pinitol
4	3,58	127,335	0,78	577,13	578	C30H26O12	Procyanidines B
5	3,88	302,844	1,85	289,07	290	C15H14O6	Epicatéchine
6	4,51	146,644	0,89	865,2	866	C45H38O18	Isomère Procyanidines C
7	4,81	100,785	0,61	1153,26	1154	C61H45N4O20	Inconnu

3.2.3. Impact de la fermentation sur les polyphénols quantifiés

Les teneurs en épicatéchine, catéchine et procyanidine B sont supérieures dans l'extrait non fermenté (5,90 ± 0,14 ; 0,31 ± 0,002 ; 5,18 ± 0,08 µg / g de cacao) par rapport à l'extrait fermenté (0,21 ± 0,001 ; 0,03 ± 0,00 ; 0,13 ± 0,001 µg / g de cacao). Les flavonoïdes ont connu une dégradation respectivement de (96,40 ; 89,05 et 97,50%).

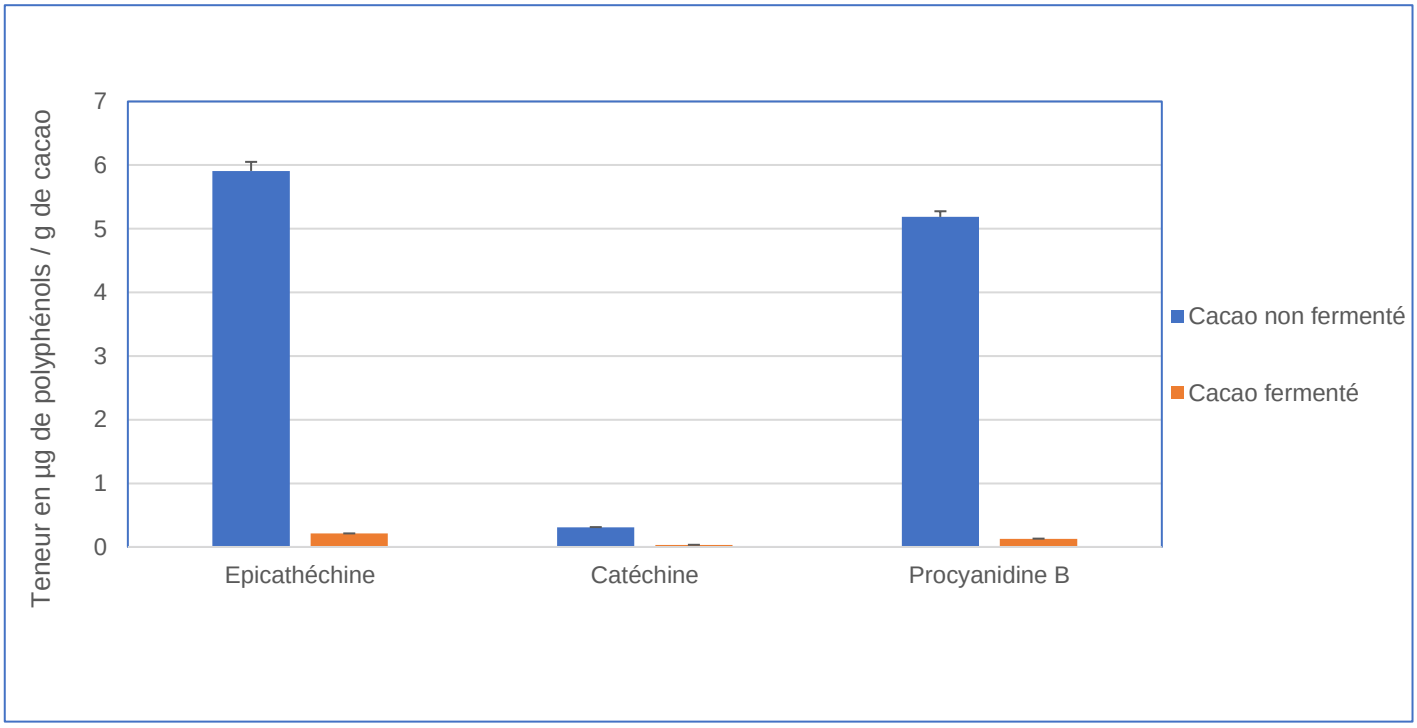

Figure 10. Impact de la fermentation sur les flavonoïdes identifiés des extraits de cacao

Sous l'influence de la polyphénol oxydase l'(-) - épicatéchine, la (+) - catéchine et les procyanidines sont oxydés en quinones correspondantes, qui peuvent réagir avec d'autres composés phénoliques ou acides aminés et peptides pour former des pigments jaunes et bruns (Wollgast et Anklam, 2000 ; Bittner, 2006 ; Camu et al., 2008 ; Oracz et al., 2015). Par ailleurs, entre le deuxième et le troisième jour de la fermentation une diminution rapide de la teneur en (-) - épicatéchine a lieu (Wollgast

et Anklam, 2000 ; Cooper et al., 2007 ; Oracz et al., 2015). De plus, une réduction des teneurs en (+) catéchine est observée après cinq jours de fermentation (Kyi et al., 2005 ; Oracz et al., 2015). Il ressort de cette analyse que la fermentation a favorisé la dégradation des composés phénoliques présents initialement dans les extraits. Les fèves de cacao que nous avons utilisées non seulement ont été fermentées ou non mais séchées.

En plus de la fermentation, tous ces paramètres discutés plus haut ont influé sur la masse d'extraits de cacao et les polyphénols obtenus après délipidation puis extraction des polyphénols. Une non-maitrise ou variation significative de ces paramètres pourrait entrainer une diminution de la teneur en polyphénols. Ce qui pourrait avoir un impact sur la quantité de polyphénols totaux après extraction.

3.3. Impact de la fermentation sur les activités antioxydantes

La capacité antioxydante des extraits végétaux dépend largement de leur composition physico-chimique (Schinella et al., 2010). Les effets antioxydants d'une substance naturelle peuvent être caractérisés par plusieurs méthodes. Il est donc nécessaire de réaliser plus d'un type de mesure de la capacité antioxydante pour prendre en compte les différents mécanismes qui contribuent à l'action antioxydante. Dans cette étude, nous avons utilisé deux méthodes différentes pour évaluer l'activité antioxydante des deux extraits de cacao. Les tests α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) et Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC).

3.3.1. Test DPPH

Le test a été réalisé à partir des extraits fermentés et non fermentés. Afin de permettre une meilleure comparaison de l'impact de la fermentation sur la capacité réductrice des fèves de cacao, les résultats sont ici rapportés non plus en concentration d'extrait mais en concentration de poudre de cacao. La poudre de cacao fermenté a montré un IC50 supérieur (899,37 ± 28,76 µg / mL) par rapport à celle non fermenté (226,42 ± 52,77 µg / mL) et au témoin : acide gallique (1,51 ± 0,3 µg / mL).

L'extrait non fermenté avec un IC50 plus faible par rapport à l'extrait fermenté a une capacité réductrice plus importante que l'extrait fermenté. Nos résultats sont en phase avec ceux rencontrés dans la littérature (Mensor et al., 2001 ; Lee, 2003 ; Othman et al., 2007 ; Schinella et al., 2010 ; Pedan et al., 2016 ; Caporaso et al., 2018).

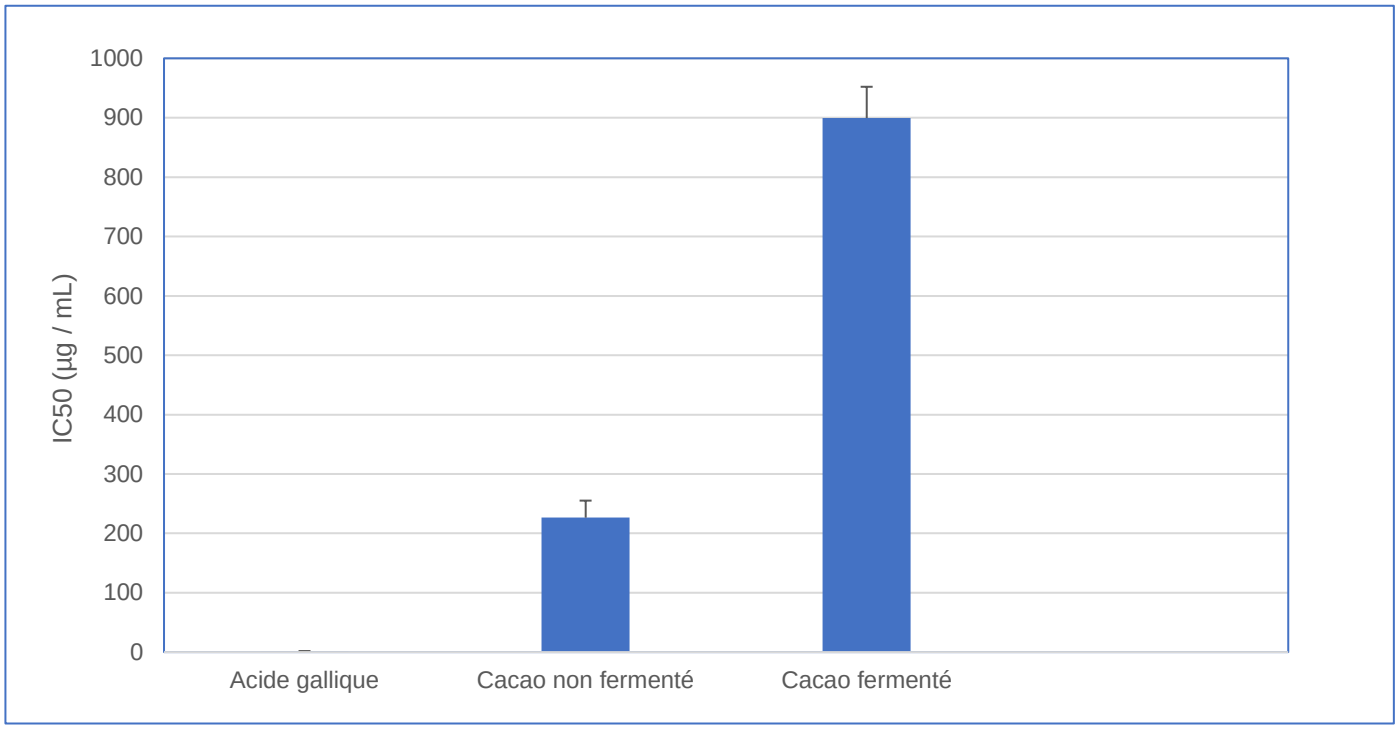

Figure 11. Test DPPH des extraits de cacao

3.3.2. Test ORAC

La méthode ORAC nous a permis de mesurer le potentiel des composé présents dans les extraits de cacao à réduire les radicaux péroxyles (ROO°). Une étude cinétique consistant à suivre la perte de la fluorescence de la fluorescéine a été faite. Nous avons observé que l'extrait non fermenté avec une forte concentration en polyphénols a une valeur en ORAC plus élevée ; diminuant le plus la fluorescéine que l'extrait fermenté qui, quant à lui est moins riche en polyphénols. Nos résultats sont en phase avec ceux rencontrés dans la littérature (Miller et al., 2006 ; Ortega et al., 2008 ; Crozier et al., 2011 ; Jolić et al., 2011 ; Kobori et al., 2013 ; Carrillo et al., 2014). La fermentation a donc un effet sur les activités antioxydantes du cacao. En effet, comme beaucoup de végétaux, le cacao contient des polyphénols. Ces composés ont des activités de piégeages des radicaux libres (oxygène nocif très réactif) qui sont fabriqués par l'organisme. Ces radicaux libres, lorsqu'ils sont produits par l'organismes favorisent le vieillissement des cellules humaines et contribuent au développement de certaines pathologies telles que le cancer et des maladies du système

cardiovasculaire. En outre, lors de la fermentation des fèves, les polyphénols sont dégradés et rendus inactifs. Ainsi, un extrait de cacao fermenté aura une activité antioxydante faible due à sa faible teneur en polyphénols.

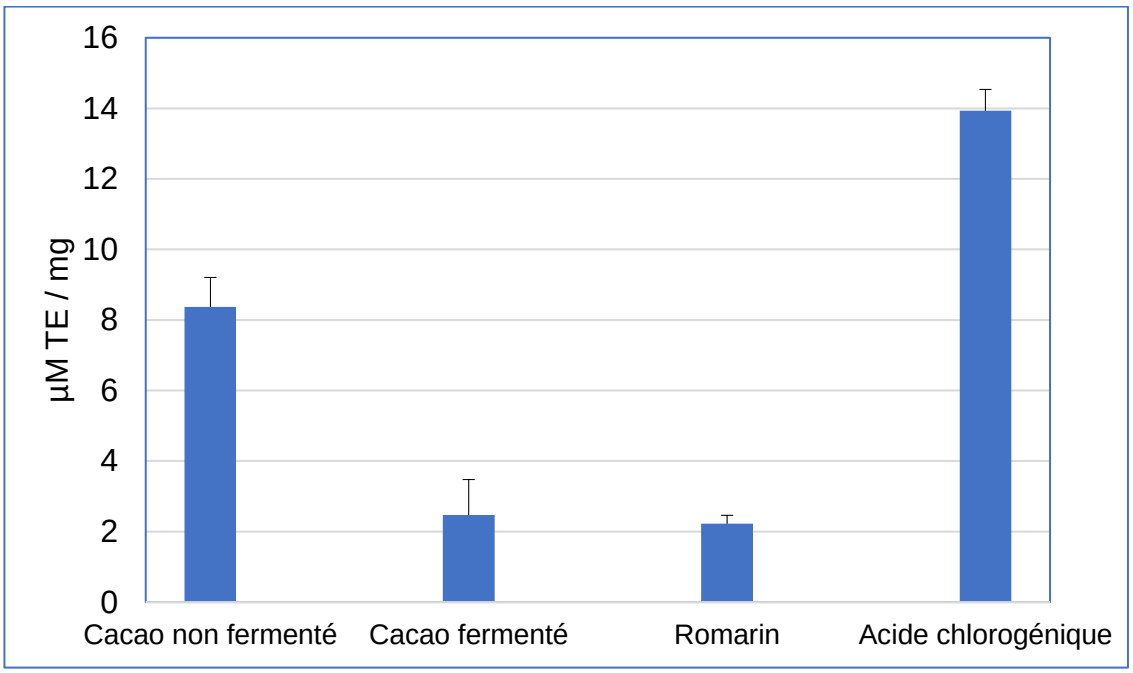

Figure 12. Test ORAC des extraits de cacao

3.4. Influence de la fermentation sur les activités inflammatoire et immunomodulatrice *in vitro*

3.4.1. Viabilité cellulaire

Le test de viabilité cellulaire (MTS / PMS) a été effectué pour évaluer la cytoxicité des extraits de cacao. En outre, après une exposition des cellules aux extraits de cacao, nous observons des absorbances presqu'identiques à celles du témoin cellule non traité avec du cacao. Le nombre de cellules n'a pas varié entre 3,125 et 50 µg /mL.

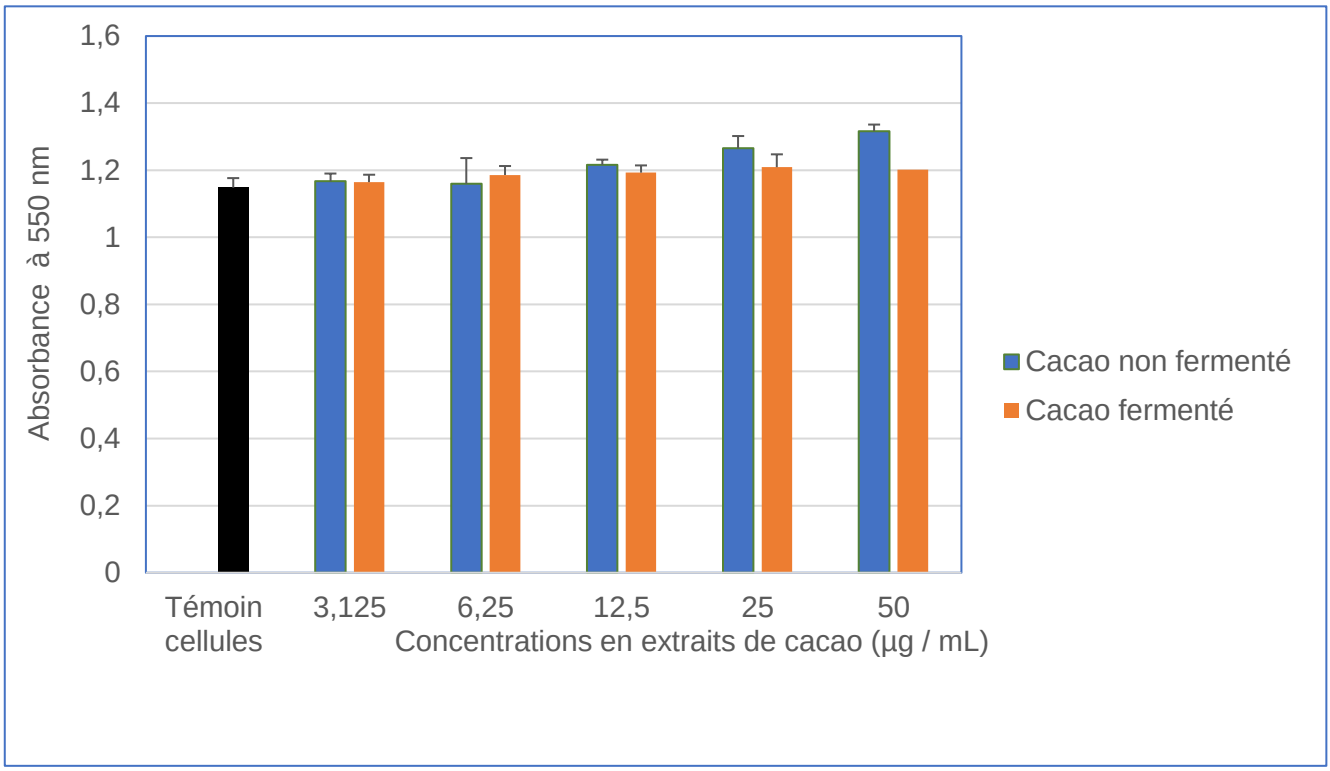

Figure 13. Effet du cacao sur les cellules J774A.1

La viabilité cellulaire a montré que les extraits de cacao ne contiennent pas de composés toxiques pouvant influer sur les résultats du TNF-α et NO. Nos échantillons de cacao utilisés ne sont donc pas cytotoxiques.

3.4.2. Impact de la fermentation du cacao sur la production du TNF-α

Les extraits polyphénoliques de cacao ont stimulé la production du TNF-α. Les extraits de cacao non fermentés stimulent plus la production de TNF-α de façon dose dépendante par rapport aux extraits de cacao fermentés.

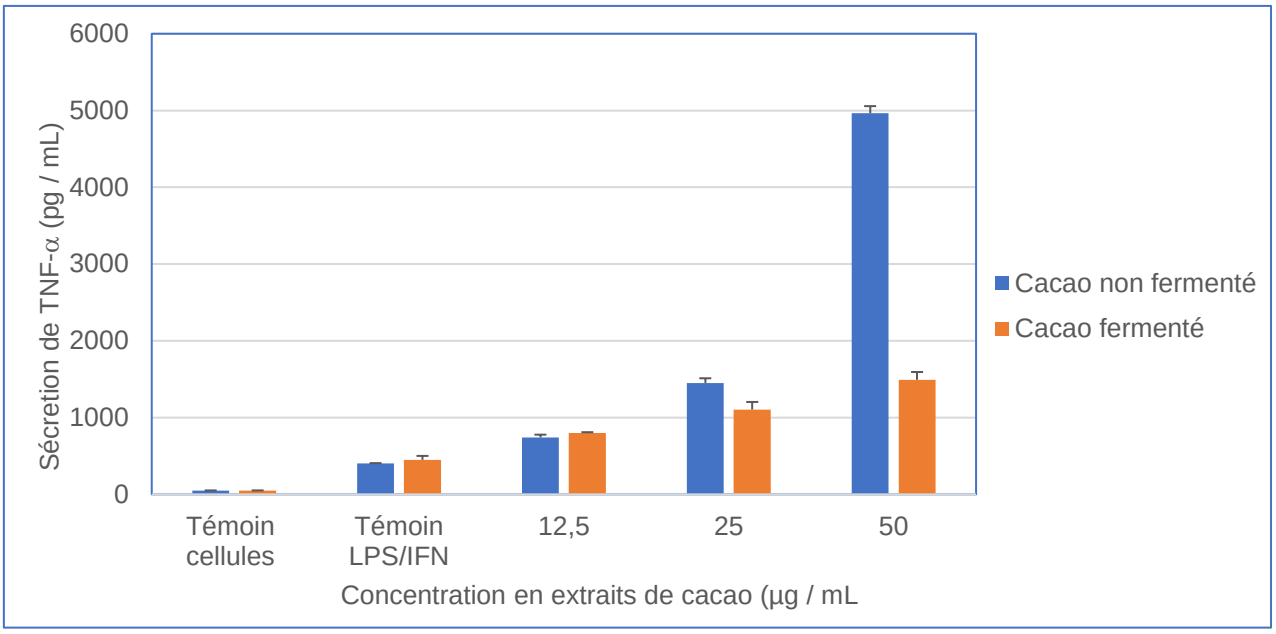

Figure 14. Impact de la fermentation du cacao sur la production de TNF-α

Le cacao module la production des cytokines de l'inflammation (Mao et al., 1999 ; 2000a). Des études rapportent que des pentamères de polyphénols de cacao stimulent la production de TNF-α (Mao et al., 2000b). Dans d'autres études, ces mêmes chercheurs ont rapporté que les polyphénols de cacao de taille intermédiaire augmentent de façon significative la production de TNF-α in vitro (Mao et al., 2002). Par ailleurs, les monomères et dimères des procyanidines inhibent la production de cette cytokine tandis que les trimères stimulent la production du TNF-α (Park et al., 2000 ; Mao et al., 2002). Les polyphénols du cacao sont constitués de plusieurs

flavonoïdes qui existent avec des différences structurelles très importantes. Ces différences structurelles sont des paramètres importants dans leurs effets biologiques (Mao et al., 2002). En outre, certains composés tels que les eicosanoïdes synthétisés au niveau de la membrane plasmique par les cellules à partir de l'acide arachidonique jouent un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes du TNF-α (Jongeneel, 1994 ; Mao et al., 2002). Les prostaglandines et leucotriènes sont connus pour leurs effets inhibiteurs dans la régulation de la production du TNF-α (Jongeneel, 1994 ; Mao et al., 2002). Les prostaglandines étant les principales responsables de cette inhibition (Jongeneel, 1994 ; Mao et al., 2002). Toutefois, les polyphénols (procyanidines) réduisent la synthèse des prostaglandines en inhibant l'expression de la gêne de la COX-2 et diminuant directement l'activité de la COX-2 (Noreen et al., 1998 ; Mao et al., 2002). Lorsque la cycloxygénase et la lipoxygénase sont inhibées, les teneurs de TNF-α sont également modifiées voire augmentent (Jongeneel, 1994 ; Mao et al., 2002). Il est important de souligner que ces deux enzymes (cycloxygénase et la lipoxygénase) sont importantes dans la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes. Par conséquent, nous pouvons déduire que la production de TNF-α observée dans nos extraits de cacao est en partie due aux polyphénols présents dans le cacao. L'extrait non fermenté produisant plus de TNF-α que l'extrait fermenté. Par ailleurs, les différences au niveau de nos résultats résident aussi dans la quantité et la structure des polyphénols présents dans nos extraits et aussi dans le degré de polymérisation de ces composés bioactifs (polyphénols). Les procyanidines sont en quantités réduite dans l'extrait fermenté par rapport à l'extrait non fermenté. Raison pour laquelle l'extrait fermenté produit moins de TNF-α car son activité sur la COX -2 est faible par rapport à celle de l'extrait non fermenté (Lee et al., 2006). Par ailleurs, certains polyphénols du cacao sont uniques car ils sont constitués d'unités monomères

répétées et peuvent exister sous divers degrés de polymérisation. Le degré de polymérisation joue un rôle dans la détermination des activités biologiques des procyanidines (Selmi et al., 2006 ; Bitzer et al., 2015). Des études montrent que le niveau d'absorption des polyphénols dépend aussi de leur degré de polymérisation qui limite également leur biodisponibilité (Bravo, 1998). En général, les fèves fraîches de cacao non fermentées contiennent des flavanols avec un degré de polymérisation varié à partir de monomères jusqu'à des décamères (Kelm et al., 2006). La conformation des procyanidines est modulée par trois caractéristiques que sont la nature des unités constitutives, le type de liaison et le degré de polymérisation. Une procyanidine riche en (+) -catéchine aura tendance à former une hélice tournant vers la droite, à l'inverse d'une procyanidine riche en (-) -épicatéchine (Fletcher et al., 1977). Nous pouvons déduire que la diminution du degré de polymérisation est corrélée à la maturité du fruit et à la diminution de l'astringence. Cette diminution d'astringence est due à la fermentation qui dégrade les polyphénols présents dans les fèves de cacao. Ainsi l'extrait fermenté avec un degré de polymérisation des polyphénols et une astringence faible stimulent moins la production de TNF-α par rapport à l'extrait non fermenté. Nos résultats sont en phase avec ceux rencontrés dans la littérature (Mao et al., 2002 ; Carlo et al., 2006). Cependant Les différents mécanismes par lesquels les polyphénols du cacao stimulent la production de TNF-α méritent d'être élucidés.

3.4.3. Impact de la fermentation du cacao sur la production du NO

L'effet inflammatoire des extraits du cacao a été aussi évalué en étudiant l'effet des extraits de cacao sur la production de l'oxide nitrique (NO). Différentes concentrations du cacao non fermentés et fermentés ont été testées. Les résultats ont montré que les extraits de cacao fermentés et non fermentés in-vitro n'ont pas d'effets significatifs sur la production du NO. La fermentation n'a donc pas eu d'impact sur la production de NO.

Cependant, des études montrent que le cacao a des effets inhibiteurs sur la production de NO. Les composés responsables de cette inhibition sont les flavonoïdes en particulier l'épicatéchine (Ono et al., 2003 ; Ramiro-Puig et al., 2005 ; Amorim et al., 2016 ; Ranneh et al., 2016). Des études contradictoires affirment que le cacao stimule la production de NO (Sung et al., 2013 ; Amorim et al., 2016). D'autres composés en particulier les procyanidines et les pectines présents dans le cacao sont responsables de la production du NO. Les extraits de cacao n'ont aucun effet sur la production de NO s'explique par le fait que l'action inhibitrice de certains polyphénols présents dans ces extraits peut être contrebalancée par d'autres composés présents dans nos extraits de cacao. Les mécanismes d'action des effets paradoxaux des polyphénols du cacao sur la production du NO in-vitro méritent d'être clairement élucidés.

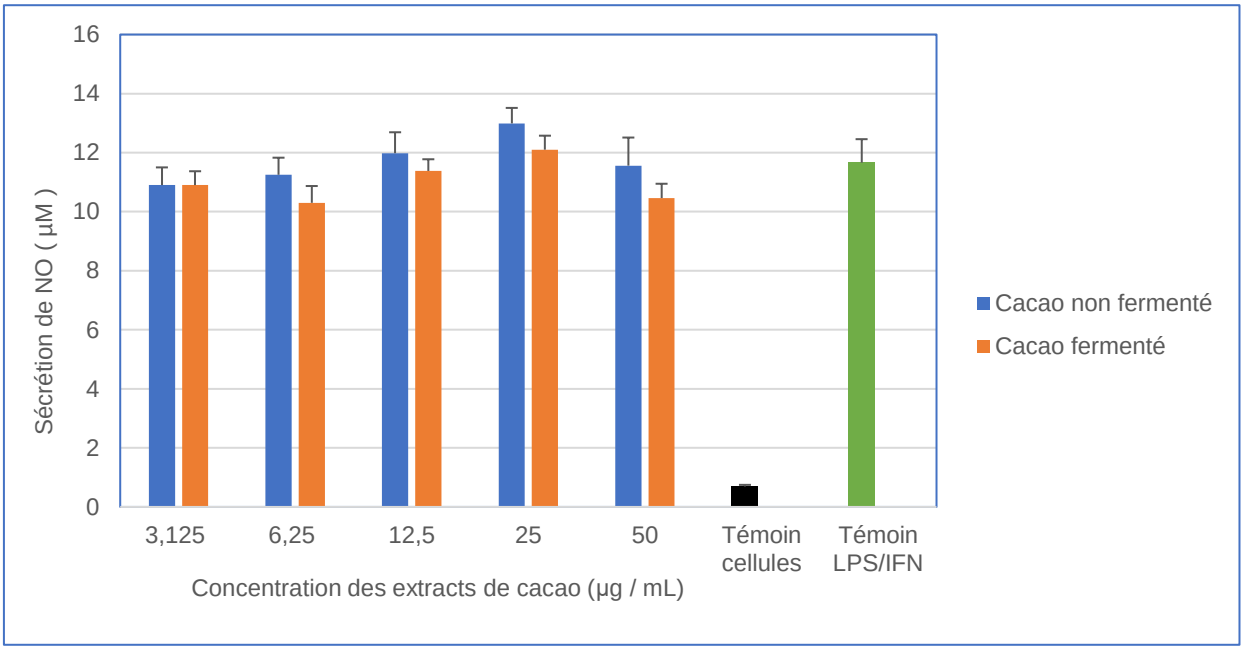

Figure 15. Impact de la fermentation du cacao la production du NO

Conclusion générale et perspectives

Le cacaoyer a une riche histoire qui englobe de nombreuses cultures et porte d'importantes implications économiques et sociales pour des millions de personnes dans le monde. Les Mayas d'Amérique centrale furent les premiers à consommer du cacao (De Araujo et al., 2016).

Christophe Colomb a été le premier Européen à rencontrer le cacao vers 1502 après JC. Mais ce n'est qu'un quart de siècle plus tard que le grand conquérant espagnol Hernán Cortéz a introduit le cacao en Europe (De Araujo et al., 2016).

Les principales variétés du cacao sont : Forastero, Criollo et Trinitario. La dernière variété est un croisement des deux premières.

Comparé aux géants de quarante ou cinquante mètres qui l'entourent, le cacaoyer parait bien petit, avec seulement dix à quinze mètres de hauteur. Petit, oui, mais déjà distinct des autres. Ses fruits ne poussent pas dans la ramure de l'arbre mais le long du tronc et sur les grosses branches. Ils sont jaunes, lisses et arrondis ou bien rouges, verruqueux et pointus. Les graines quant à elles sont violettes et plutôt plates ou bien blanches et dodues. Les fruits du cacaoyer sont appelés cabosses. Une fois murs, ils ne tombent pas d'eux-mêmes. Ils sèchent sur l'arbre, sans libérer leurs graines. Le cacaoyer ne se serait sans doute jamais reproduit, ni multiplié sans une intervention extérieure. Mais la nature est vigilante, les graines que contiennent les fruits sont entourées d'une pulpe abondante, acidulée, riche en sucres, en un mot, plutôt agréable au goût (Barrel, 2016).

Le cacao contient plus de 300 constituants différents (Fung, 2011 ; De Araujo et al., 2016), même dans les fèves torréfiées (Keeney, 1972 ; De Araujo et al., 2016).

Ses principaux composants sont : le beurre de cacao (acides gras oléiques, stéariques et palmitiques), les minéraux (magnésium, potassium, fer et zinc), les méthylxanithines (théobromine et caféine), les polyphénols ainsi que d'autres.

Les fèves de cacao et les graines de Theobroma cacao L. constituent la matière première de base utilisée pour la préparation de produits très prisés des consommateurs du monde entier, tels que le cacao en poudre, le chocolat et d'autres produits dérivés du cacao (Moser et al., 2010 ; Oracz et al., 2015). Ce produit fabriqué à l'échelle industrielle est le résultat d'un processus complexe qui commence par la fermentation des fèves de cacao et se poursuit à travers différentes étapes de traitement. Lors de chacune de ces opérations, la manipulation dans toutes les opérations impliquées, les ingrédients ajoutés et la sélection des matières premières appropriées ont une influence sur les caractéristiques et par conséquent, sur la qualité et la sécurité du produit fini.

Au milieu des années 1600, le cacao était utilisé en Europe comme médicament favorisant la santé et comme remède contre tous les types d'aliments (Pucciarelli et Grivetti, 2008 ; De Araujo et al., 2016). Le cacao était particulièrement apprécié pour sa capacité à traiter les affections des voies respiratoires supérieures telles que le rhume et la toux améliorant le bien-être mental et protégeant contre les carences nutritionnelles (Selmi et al., 2008 ; De Araujo et al., 2016).

Notre étude a porté sur les effets santé de la variété Forastero. Des fèves de cacao post-récolte ont été fermentées d'autres non puis conditionnées. La poudre de cacao obtenue après broyage a été délipidée. Les polyphénols totaux ont été extraits. Les analyses physico-chimiques ont été réalisées en commençant par le dosage des polyphénols totaux réalisé avec la méthode de Folin-ciocalteu. L'identification des composés présents dans la poudre a été faite par UPLLC-MS-UV. Les composés

phénoliques majoritaires ont été déterminés par LC/MSMS. Les études antioxydantes ont été faites avec les tests DPPH et ORAC. Concernant les activités biologiques, nous avons fait la viabilité cellulaire puis déterminer les concentrations en TNF-α et NO.

Les résultats montrent que la fermentation a favorisé la diminution de la masse des polyphénols contenus dans la poudre de cacao après délipidation puis extraction. L'extrait non fermenté disposant d'une masse d'extraits phénolique environ 2 fois plus grande que celle de l'extrait fermenté. Les analyses physico-chimiques des extraits fermentés et non fermentés ont montré une différence significative au niveau des teneurs. La quantification des polyphénols totaux a révélé que l'extrait non fermenté est environ 3 fois plus concentré que l'extrait fermenté. Les teneurs en épicatéchine, catéchine et procyanidines B sont largement supérieures dans l'extrait non fermenté par rapport à l'extrait fermenté. La fermentation a donc influé négativement sur le taux de rendement de la masse d'extraits obtenus après délipidation puis extraction. Elle a également contribué à la dégradation des composés chimiques phénoliques présents dans les extraits. La fermentation a favorisé l'apparition de certains composés tels que les sucres dans l'extrait fermenté. Par ailleurs, l'extrait non fermenté avec une masse d'extrait phénolique supérieure et une teneur en polyphénols élevée dispose d'une activité anti-oxydante très élevée par rapport à l'extrait fermenté.

Les tests DPPH et ORAC ont montré que le cacao a une activité antioxydante. L'extrait non fermenté avec son importante quantité en polyphénol est plus antioxydant que l'extrait fermenté. Nous pouvons déduire qu'il existe une corrélation entre la teneur en composés phénoliques du cacao et son activité anti-oxydante. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature.

Concernant les effets sur les cellules eucaryotes et les activités inflammatoires et immuno-modulatrices, les extraits de cacao issus de la fermentation n'ont pas produit de toxicité cellulaire. Ainsi les effets étudiés peuvent être analysés sans risque de biais lié à un impact négatif des composants du cacao sur la survie des cellules utilisées ; les macrophages. Les extraits de cacao fermentés ou non fermentés ont eu une activité pro-inflammatoire sans exercer d'influence sur la production de NO. Plusieurs paramètres non maitrisés auraient influé sur les activités inflammatoires du cacao. En effet, d'après nos résultats, les effets du cacao sur le processus inflammatoire et l'immuno-modulation serait fonction non seulement de la nature mais également de la teneur en composés bioactifs présents dans les extraits de cacao au regard des marqueurs biologiques étudiés.

Les résultats sur les effets inhibiteurs du cacao sur le NO in-vitro des polyphénols du cacao disponibles dans la littérature méritent d'être pris avec des réserves. Au vu de nos résultats des activités biologiques du cacao in-vitro, nous ne pouvons établir une véritable corrélation directe entre la teneur en métabolites secondaires et les propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Ces différences d'effets biologiques entre les résultats de diverses investigations, incluant les nôtres, au sein de la littérature suggèrent que le choix des souches de cacao ainsi que les conditions opératoires de préparation des extraits est susceptible d'avoir une influence notable que l'étude des effets santé du cacao.

Sur cette base, nos résultats expérimentaux ouvrent plusieurs perspectives d'investigations visant à mieux comprendre les effets santé du cacao et de ses bioactifs en fonction des types de plants de cacao et des procédés de transformation appliqués sur la matrice initiale.

L'identification détaillée, par fractionnement / séparation des composés, en particulier polyphénoliques, responsables des effets biologiques du cacao Forastero et notamment de la production de TNF-α permettrait d'obtenir une meilleure classification pharmacologique des composés d'intérêt du cacao pour cette activité.

Ces informations détaillées contribueraient à engager une étude approfondie des mécanismes d'action pharmacologiques par lesquels cet effet est induit. Les actifs du cacao seraient alors susceptibles d'être utilisés comme des réactifs d'exploration de la transduction du signal qu'ils induisent au niveau cellulaire. L'élucidation de ces mécanismes moléculaires contribuerait à la compréhension non seulement des effets des bioactifs mais également des différences de résultats enregistrées au sein de la littérature scientifique. Enfin, il serait d'un grand intérêt d'agréger ces données avec des investigations complémentaires visant à modifier les paramètres des opérations unitaires des procédés de transformation du cacao afin de mieux apprécier et de corréler l'impact des procédés (fermentation, extraction, …) sur la composition et les effets santé du cacao.

Productions scientifiques :

Publication 1 : Review dans le journal "Fruits"
Titre: Theobroma cacao taxonomy, physiology, chemistry and nutrition-health properties: a comprehensive review

Publication 2 : Article de recherche dans le journal "Journal of Ethnopharmacology"
Titre : Theobroma cacao fermentation impacts on immunomodulatory properties

Références bibliographiques

Ackar, D., Lendi, K.V., Valek, M., Drago Šubari, D., MiliIevi, B., Babi, J., Nedi, I., 2013. Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food. J. Chem. 2013: 1-7.

Actis-Goretta, L., Leveques, A., Giuffrida, F., Romanov-Michailidis, F., Viton, F., Barron, D., Duenas-Paton, M., Gonzalez-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Williamson, G., 2012. Elucidation of (−) -epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. Free Radic. Biol. Med. 53: 787-795.

Actis-Goretta, L., Leveques, A., Rein, M., Teml, A., Schafer, C., Hofmann, U., Li, H., Schwab, M., Eichelbaum, M., Williamson, G., 2013. Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (−) -epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. Am. J. Clin. Nutr. 98, 924-933.

Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I., Fraga, C.G., 2006. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. J. Agric. Food Chem. 54, 229-234.

ADA Reports., 2004. Position of the American Dietetic Association: functional foods. J. Am. Diet. Assoc. 104, 814-826.

Addai, F. K., 2010. Natural cocoa as diet-mediated antimalarial prophylaxis. Med. Hypotheses. 74, 825-830.

Adeyeye, E.I., Akinyeye, R.O., Ogunlade, I., Olaofe, O., Boluwade, J.O., 2010. Effect of farm and industrial processing on the amino acid pro fi le of cocoa beans. Food Chem. 118, 357-363.

Afoakwa, E.O., Quao, J., Takrama, F.S., Budu, A.S., Saalia, F.K., 2012. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (Theobroma cacao) beans. IFRJ. 19, 1071-1077.

Agbor, G.A., Vinson, J.A., Donnelly, P.E., 2014. Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay. IJFS. 2326-3350.

Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., Fruchart J.C., James W.P., Loria C.M., Smith S.C., Jr., 2009.

Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention ; National Heart, Lung, and Blood Institute ; American Heart Association ; World Heart Federation ; International Atherosclerosis Society ; and International Association for the Study of Obesity. Circulation. 120, 1640-1645.

Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., Shaw, J., 2006. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. Diabetic Medicine. 23, 469-480.

Alberti, K.G., Zimmet, P.Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1 : diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med. 15, 539-553.

Albertini, B., Schoubben, A., Guarnaccia. D., Pinelli, P., Vecchia M.D., Ricci, M., Di Renzo, G.C., Blasi, P., 2015. Effect of Fermentation and Drying on Cocoa Polyphenols. J. Agric. Food chem. 63, 9948-9953.

Al-Dujaili, E., Tsang, C., Almoosawi, S., 2013. Polyphenol-Rich Dark Chocolate in Treatment of Diabetes Mellitus Risk Factors. Chocolate in Health and Nutrition. 7, 341-353.

Amin, I., Jinap, S., Jamilah, B., 1997. Vicilin-class globulins and their degradation during cocoa fermentation. Food Chem. 59, 1-5.

Amiot, M. J., 2016. "Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans : a systematic review." Obes. Rev. 17, 573-586.

Amorim, J.C, Vriesmann, L.C., Petkowicz, C.L.O., Martinez, G.R.M., Noleto, G.R., 2016. Modified pectin from Theobroma cacao induces potentpro-inflammatory activity in murine peritoneal macrophage. : Int. J. Biol Macromol. 92, 1040-1048.

Anderson, P. C., 1971. Foods as the cause of acne. Am.Fam. Physician 3, 102-103.

Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Jáuregui, O., Casals, I., Izquierdo-Pulido, M., Permanyer, J., 2000. An LC method for the analysis of cocoa phenolics. LC GC Eur. 12, 902-904.

Andres-Lacueva, C., Monagas, M., Khan, M., Izquierdo-Pulido, M., Urpi-Sarda, M., Permanyer, J. and Lamuela-Raventos, R.M., 2008. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products : Influence of the manufacturing process. J. Agric. Food Chem. 56 : 3111-3117.

Andújar, I., Recio, M. C., Giner, R. M., Ríos, J. L., 2012. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. Oxid. Med. Cell. Longev. 2012, 1-23.
Argout, X., Salse, J., Aury, J.M., Guiltinan, J.M., 2011. The genome of Theobroma cacao. Nature Genetics. 43, 101-108.

Ariefdjohan, M.W., Savaiano, D. A., 2005. Chocolate and cardiovascular health : Is it too good to be true ? Nutr. Rev. 63, 427-430.

Arlorio Marco, Monica Locatelli, Fabiano Travaglia, Jean-Daniel Coïsson, Erika Del Grosso, Alberto Minassi, Giovanni Appendino, Aldo Martelli., 2008. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (Theobroma cacao L.). Food Chem. 106, 967-975.

Arlorio, M., Coïsson, J.D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., Martelli, A., 2005. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from Theobroma cacao hulls extracted with supercritical CO_2. Food Res. Int. 38, 1009-1014.

Aron, P.M, Kennedy, J.A., 2008. Flavan-3-ols : Nature, occurrence and biological activity. Mol. Nutr. Food Res. 52, 79-104.

Arranz, S., Valderas-Martinez, P., Chiva-Blanch, G., Casas, R., Urpi-Sarda, M., Lamuela-Raventos, R.M., Estruch, R., 2013. Cardioprotective effects of cocoa : Clinical evidence from randomized clinical intervention trials in humans. Mol. Nutr. Food Res. 57, 936-947.

Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC., 1996. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men : a cohort follow-up study in the United States. BMJ. 313: 84-90.

Ascherio, A., Hennekens, C., Willett, W.C., Sacks, M., Rosner, B., Manson J, Witteman J, Stampfer MJ., 1996. Prospective study of nutritional factors, blood pressure and hypertension among US women. Hypertension 27, 1065-1072.

Ashihara, H. ; Kato, M. ; Crozier, A., 2011. Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. Handb. Exp. Pharmacol. 200, 11-31.

Aubert, H., Frere, C., Aillaud, M.F., Morange, P.E., Juhan-Vague, I., Alessi, M.C., 2003. Weak and non-independent association between plasma TAFI antigen levels and the insulin resistance syndrome. J. Thromb. Haemost. 1, 791-797.

Aydin S., 2007. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics., 2007. **J.** Biochem. Mol. Biol. 40, 29-35.

Baba S, Natsume M, Yasuda A., 2007. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and in hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. J. Nutr. 137,1436-1441.

Baba, S., Osakabe, N., Kato, Y., Natsume, M., Yasuda, A., Kido, T., Fukuda, K., Muto, Y., Kondo, K., 2007. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. Am. J. Clin. Nutr. 85, 709-717.

Baba, S., Osakabe, N., Kato, Y., Natsume, M., Yasuda, A., Kido, T., Fukuda, K., Muto, Y., Bartley, B. G. D., 2001. Refractario—An explanation of the meaning of the term and its relationship to the introductions from Ecuador in 1937. INGENIC Newsletter. **6** :10–15.

Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Terao, J., 2000. Bioavailability of (−) -epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. Free Radic. Biol. Med. 33 : 635-641.

Badrie, N., Bekele, F., Elzbieta Sikora, E., Sikora, M., 2015. Cocoa Agronomy, Quality, Nutritional, and Health Aspects. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 55, 620-659.
Bainbridge J. C., Scott S. H., 1912. The essential oil of cocoa Journal of the Chemical Society. Transactions. 101, 2209-2221.

Bajaj, M., Banerji, M.A., 2004. Type 2 diabetes in South Asians : a pathophysiologic focus on the Asian-Indian epidemic. Curr. Diab. Rep. 4, 213-218.

Balkau B., Charles M.A., 1999. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). Diabet Med. 16, 442-443.

Barker, D.J., Bull, A.R., Osmond, C., Simmonds, S.J., 1990. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. BMJ. 301, 259-62.

Barker, D.J., Gluckman, P.D., Godfrey, K.M., Harding, J.E., Owens, J.A., Robinson, J.S., 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. Lancet. 341, 938-941.

Barrett, A., Ndou, T., Hughey, C.A., Straut, C., Howell, A., Dai, Z., 2013. Inhibition of alphaamylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes. J. Agric. Food Chem. 61, 1477-1486.

Basu, A., Betts, N.M., Leyva, M.J., Fu, D., Aston, C.E., Lyons, T.J., 2015. Acute cocoa supplementation increases postprandial HDL cholesterol and insulin in obese adults with type 2 diabetes after consumption of a high-fat breakfast. J. Nutr. 145, 2325-2332.

Bauer, S. R., Ding, E. L., Smit, L.A., 2011. Cocoa consumption, cocoa flavonoids, and effects on cardiovascular risk factors : An evidence-based review. Curr. Cardiovasc. Risk Rep. 5, 120-127.

Becker, K., Geisler, S., Ueberall, F., Fuchs, D., Gostner, M.J., 2013. Immunomodulatory properties of cacao extracts-potential consequences for medical applications. Front. Pharmacol. 4, 1-9.

Belitz, H. D., & Grosch, W., 1992. Kakao und Schokolade. In H. D. Belitz, & W. Grosch, Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 869 - 879.

Belscak, A., Komes, D., Horzic, D., Kovacevic Ganic, K. and Karlovic, D., 2009. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. Food Res. Int. 42, 707716.

Belz, G. G., Mohr-Kahaly, S., 2011. " Cacoa and dark chocolate in cardiovascular prevention ? Dtsch. Med. Wochenschr. 136, 2657-2663.

Bernaert, H., Blondeel, L., Allegaert, L., Lohmueller, T., 2012. Industrial Treatment of Cocoa in Chocolate Production: Health Implications. R. Paoletti et al. (eds.), In Chocolate and Health. 17-31.

Bertazzo, A., Comai, S., Brunato, I., Zancato, M. and Costa, C. V. L., 2011. The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in Theobroma cacao beans. Food Chem. 124, 93-96.
Bertazzo, A., Comai, S., Mangiarini, F., Chen, S., 2013. Composition of Cacao Beans. R.R. Watson et al. (Eds.), Chocolate in Health and Nutrition, Nutrition and Health. 7, 105-117.

Bisson, J. F., Nejdi, A., Rozan, P., Hidalgo, S., Lalonde, R., Messaoudi, M., 2008. Effects of long-term administration of a cocoa polyphenolic extract (Acticoa powder) on cognitive performances in aged rats. Brit. J. Nutr. 100, 94-101.

Bittner, S., 2006. When quinones meet amino acids : Chemical, physical and biological consequences. Amino Acids. 30, 205-224.

Bitzer, Z.T., Glisan, S.L., Dorenkott, M.R., Goodrich, K.M., Ye, L., O'Keefe, S.F., Lambert, J.D., Neilson, A.P., 2015. Cocoa procyanidins with different degrees of polymerization possess distinct activities in models of colonic inflammation. J. Nutr. Biochem. 26, 827-831.

Bol, V.V., Delattre, A.I., Reusens, B., Raes, M., Remacle, C., 2009. Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 297, R291-9.

Bolca, S., van de Wiele, T., Possemiers, S., 2013. Gut metabotypes govern health effects of dietary polyphenols. Curr. Opin. Biotechnol. 24, 220-225.

Bonanome, A., Grundy SM., 1998. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. N. Engl. J. Med. 318, 1244-1248.

Bonvehí, J. S., Coll, F. V., 1997. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. Food Chemi. 365-370.

Bonvehí, J. S., Coll, F. V., 2000. Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. Eur. Food Res Technolo. 210, 189-195.

Boujendar, S., Reusens, B., Merezak, S., Ahn, M.T., Arany, E., Hill, D., Remacle, C., 2002. Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. Diabetologia. 45, 856-866.

Bracco U., 1994. Effect of triglyceride structure on fat absorption. Am. J. Clin. Nutr. 60, 1002-1009.

Bravo L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr. Rev. 56, 317-333.

Briggs, A.M., Lee, Y., Fleming, J., Sponsky, C., Kris-Etherton, P.M., 2015. Nutritional and Physiological Aspects of Chocolate. In Chocolate and Health : Chemistry, Nutrition and Therapy. 82-102.

Brinton, E.A., Eisenberg, S., Breslow, J.L., 1991. Increased apo A-I and apo AII fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. J. Clin. Invest. 87, 536-544.

Brito, B. D N. D C., Chisté, R.C., Pena, R.D.S., 2017. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by Fermentation. Food Chem. 228, 484-490.

Brolin, R.E., 2002. Bariatric surgery and long-term control of morbid obesity. JAMA. 288, 2793-2796.

Bruce, K.D., Hanson, M.A., 2010. The Developmental Origins, Mechanisms, and Implications of Metabolic Syndrome. Annu. Rev. Nutr. 26, 271-91.

Bruinsma K., Taren D. L.,1999. Chocolate: Food or drug ? J. Am. Diet. Assoc. 99, 1249-1256.

Brunetto, M. R., Gutierrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gomez, A., Ramos, G., Romero, C., 2007. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switchingcolumn system. Food Chem. 100, 459-467.

Bruning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. Mol. Cell. 2, 559-569.

Buijsse, B., Feskens, E.J., Kok, F.J., Kromhout, D., 2006. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: The Zutphen Elderly Study. Arch. Intern. Med, 166, 411-417.

Caligiani, A., Acquotti, D., Cirlini, M., Palla, G., 2010. HNMR study of fermented cocoa (Theobroma cacao L.) beans. J. Agric. Food Chem. 58, 12105-12111.

Caligiani, A., Cirlini, M., Palla, G., Ravaglia, R. andArlorio, M., 2007. GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. Chirality. 19 :329-334.

Cameron, A.J., Shaw, J.E., Zimmet, P.Z., 2004. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 33: 351-75.

Campion, J., Milagro, F.I., Martinez, J.A., 2009. Individuality and epigenetics in obesity. Obes. Rev. 10, 383-392.

Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., De Vuyst, L., 2008. Fermentation of cocoa beans: Influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. J. Sci. Food Agric. 88, 2288-2297.

Caporaso, N., Whitworth, M.B., Fowler, M.S., Fisk, I.D., 2018. Hyperspectral imaging for non-destructive prediction of fermentation index, polyphenol content and antioxidant activity in single cocoa beans. Food Chem. 258, 343-351.

Carr, D.B., Utzschneider, K.M., Hull, R.L., 2004. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. Diabetes. 53, 2087-2094.

Carrillo, C.L., Londoño-Londoño, J., Gil, A., 2014. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. Food Res. Int. 60, 273-280.

Castell, M., Pérez-Cano, F.J., Bisson, J-F., 2013. Clinical Benefits of Cocoa: An Overview. R.R. Watson et al. (eds.), Chocolate in Health and Nutrition, Nutrition and Health. 7, 265.

Chang, J., Luo, J., He, G., 2009. Regulation of polyphenols accumulation by combined overexpression / silencing key enzymes of phyenylpropanoid pathway. Acta Bioch Bioph Sin. 41, 123-130.

Cheynier, V., 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. Am. J. Clin. Nutr. 81, 223-229.

Cienfuegos-Jovellanos, E., Quinones, M. D., Mu Steinberg erza, B., Moulay, L., Miguel, M. and Aleixandre, A., 2009. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. J. Agric. Food Chem. 57, 6156-6162.

Clapperton, J., Hammerstone, J. F., Romanczyk, L. J., Yow, S., Lim, D., Lockwood, R., 1992. Polyphenols and cocoa flavour. In : Proceedings, 16th International Conference of Group Polyphenols. 2, 112-115.

Clapperton, J., Yow, S., Chan, J., Lim, D., Lockwood, R., Romanczyk, L., Hammerstone, J., 1994. The contribution of genotype to cocoa (Theobroma cacao L) flavour. Trop. Agric. 71, 303-308.

Cleeman, J. I., 2001. “Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III),” JAMA. 285, 2486-2497.

Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults (CGIETOOA)—The Evidence Report. National Institutes of Health.
Colombo, M.L., Pinorini-Godly, M.T., Conti, A., 2012. Botany and pharmacognosy of the cacao tree. Department of Drug Science and Technology, University of Turin, Turin, Italy.

Comité scientifique de Kino-Québec (CSKQ)., 2011. L’activité physique, le sport et les jeunes – Savoir et agir. Québec : Secrétariat au loisir et au sport, ministère de l’Éducation, du Loisir et du Sport. Gouvernement du Québec.

Cook, S., Weitzman, M., Auinger, P., Nguyen, M., Dietz, W.H., 2003. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 157, 821-27.

Cooper, K. A., Campos G.E., Jiminez A.D., Nagy, K., Donovan, J.L., Williamson, G., 2007. Rapid reversed phase-ultra performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and interrelationships of their concentrations in chocolate. J. Agric. Food Chem. 55, 2841-2847.

Cooper, K. A., Campos-Gimenéz, E., Jimenez Alvarez, D., Rytz, A., Nagy, K. and Williamson, G., 2008. Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. J. Agric. Food Chem. 56, 260-265.

Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. I., Williamson, G., 2008. Cocoa and health: a decade of research. Brit. J. Nutr. 99, 1-11.

Corcoran, M.P., McKay, D.L., Blumberg, J.B., 2012. Flavonoid basics: Chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. J Nutr Gerontol Geriatr. 31, 176-189.

Cordero-Herrera, I., 2015. Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. J. Nutr. Biochem. 26, 704-712.

Cordero-Herrera, I., 2015. "Cocoa flavonoids protect hepatic cells against high-glucose-induced oxidative stress: relevance of MAPKs." Mol. Nutr. Food Res. 59, 597-609.

Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Goya, L., 2015. Cocoa intake ameliorates hepatic oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. Food Research International 69 ; 194-201.

Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2014. "Cocoa flavonoids attenuate high glucose induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells." Food Chem. Toxicol. 64, 10-19.

Cordero-Herrera, I., Martína, M. Á., Escrivá, F., Álvarez, C., Goyaa, L., Ramosa, S., 2015. Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. J. Nutr. Biochem. 26, 704-712.

Cornier, M-A., Dabelea, D., Hernandez, L.T., Lindstrom, R.C., Steig, A.J., Stob, N.R., Pelt, R.E.V., Wang, H., Eckel, R.H., 2008. The Metabolic Syndrome. Endocrine Reviews. 29, 777-822.

Correa-Matos, N.J., Christie, C., 2013. Chocolate Flavonoids in the Prevention of Arterial Disease. R.R. Watson et al. (eds.), Chocolate in Health and Nutrition, Nutrition and Health. 7, 289.

Corti, R.; Flammer, A.J.; Hollenberg, N.K.; Luscher, T.F., 2009. Cocoa and cardiovascular health. Circulation. 119, 1433-1441.

Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., Collin, S., 2004. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. J. Agric. Food Chem. 52, 6243-6249.

Craen, A.J., Ford, I., Forouh, I.N.G., Freeman, D.J., Jukema, J.W., Lennon, L., Macfarlane, P.W., Murphy, M.B., Packard, C.J., Stott, D.J., Westendorp, R.G., Whincup, P.H., Shepherd, J., Wannamethe, S.G., 2008. Can metabolic syndrome usefully predict cardiovascular disease and diabetes? Outcome data from two prospective studies. Lancet. 371, 1927-1935.

Cremonini, E., Bettaieb, A., Haj, G. F., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2016. (-) -Epicatechin improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. Arch. Biochem. Biophys. 599, 13-21.

Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. Nat. Prod. Rep. 26, 1001-1043.

Crozier, S.J., Preston, A.G., Hurst, J.W., Payne, M.J., Mann, J., Hainly, L., Miller, D.L., 2011. Cacao seeds are a “Super Fruit »: A comparative analysis of various fruit powders and products. Chem. Cent. J. 5, 1-6.

Cruz, J.F.M., Leite, P.B., Soares, E.S., Bispo, E.DS., 2015. Bioactive compounds in different cocoa (Theobroma cacao, L) cultivars during fermentation. Food Sci. Technol. 35, 279-284.

D’Archivio, M., Filesi, C., Varì, Scazzocchio, B., R. Masella, R., 2010. “Bioavailability of the polyphenols: status and controversies,” Int. J. Mol. Sci. 11, 1321-1342.

Danby, F. W., 2005. Acne and milk, the diet myth, and beyond. J. Am. Acad. Dermatol. 52, 360-362.

Daniel, H.M., Vrancken, G., Takrama, J.F., Camu, N., De Vos, P., De Vuyst, L., 2009. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. FEMS Yeast Res. 9,774-783.

Davisdson, L., Walczyk, T., Morris, A., Hurrell, R., 1998. Influence of ascorbic acid on iron absorption from an iron-fortified, chocolate-flavored milk drink in Jamaican children. Am. J. Clin. Nutr. 67, 873-877.

Davison, K., Howe P.R.C., 2015. Potential Implications of Dose and Diet for the Effects of Cocoa Flavanols on Cardiometabolic Function. J. Agric. Food Chem. 63, 9942-9947.
De Araujo, Q.R., Gattward, J.N., Almoosawi, S., Silva, M.D-G.C.P.C., Dantas, P.A.D-S., & De Araujo, Q.R.J., 2016. Cocoa and Human Health: From Head to Foot-A Review, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 56, 1-12.

De Brito, B.DN.DC., Chisté, R.C., Pena, R.DS., Gloria, M.B.A., Lopes, A.S., 2017. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by Fermentation. Food Chem. 228, 484-490.

De Brito, E. S., García, N. H. P., Amãncio, A. C., 2002. Effect of polyphenol oxidase (PPO) and air treatments on total phenol and tannin content of cocoanibs. Food Sci. Technol. 22, 45-48.

De Brito, E. S., Garcia, N. H. P., Gallao, M., Cortelazzo, A. L., Fevereiro, P. S., Braga, M. R., 2001. Structural and chemical changes in cocoa (Theobroma cacao L) during fermentation, drying and roasting. J. Sci. Food Agric. 81, 281-288.

De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J., 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. J. Agric. Food Chem. 48, 5331-5337.

DeFronzo RA, Ferrannini E., 1991. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care.14, 173-94.

DeFronzo, R.A., Cooke, C.R., Andres, R., Faloona, G.R., Davis, P.J., 1991. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. J. Clin. Invest.55, 845-55.

Depeint, F., Gee, J.M., Williamson, G., Johnson, I.T., 2002. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. Proc. Nutr. Soc. 61, 97-103.

Deprez, S., Mila, I., Huneau, J.F., Tome, D., Scalbert, A., 2001. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. Antioxid. Redox Signal. 3, 957-967.

Dja, J., Kendall, C.W.C., Vuksan, V., Vidgen, E., Wong, E., Augustin, L.S.A., Fulgoni, V., 2000. Effect of cocoa bran on low-density lipoprotein oxidation and fecal bulking. Arch. Intern. Med.160, 2374-2379.

Donovan, J.L., Crespy, V., Oliveira, M., Cooper, K.A., Gibson, B.B., Williamson, G., 2006. (+) -Catechin is more bioavailable than (−) -catechin: Relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. Free Radic. Res. 40, 1029-1034.

Donovan, J.L., Manach, C., Faulks, R.M., Kroon, P.A., 2006. Absorption and Metabolism of Plant Secondary Metabolites. In Plant Secondary Metabolites: Occurrence. Structure and Role in the Human Diet. 303-351.

Dorenkott, M.R., Griffin, L.E., Goodrich, K.M., Thompson-Witrick, K.A., Fundaro, G., Ye, L., 2014. Oligomeric cocoa procyanidins possess enhanced bioactivity compared to monomeric and polymeric cocoa procyanidins for preventing the development of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance during high-fat feeding. J. Agric. Food Chem. 62, 2216-2227.

Dragan, S., Andrica, F., Serban, M.C., Timar, R., 2015. Polyphenols-rich natural products for treatment of diabetes. Curr. Med. Chem. 22, 14-22.
Dreosti, I. E., 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, andwine. Nutrition 16 : 692-694.

Eckardt, K., Taube, A., Eckel, J., 2011. Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: role of lipid accumulation and physical inactivity. Rev. Endocr. Metab. Disord. 12, 163-172.

Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., 2005. The metabolic syndrome. Lancet. 365, 1415-28.

Einhorn, D., Reaven, G.M., Cobin, R. H., 2003. “American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome,” Endocrine Practice. 9, 237-252.

Elwers, S., 2008. Zusammensetzung und histologische Verteilung der phenolischen Substanzen in Samen von Massen- und Edelkakao-Varietäten (Theobroma cacao L.) 259.

Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., Lieberei, R., 2009. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (Theobroma cacao L.). Eur. Food Res. 229, 937-948.

Engels, J.M.M., 1983. A systematic description of cacao clones 111. Relationships between clones, between characteristics and some consequences for the cacao breeding. Euphytica. 32, 719-733.

Engels, J.M.M., 1986. The systematic description of cacao clones and its significance for taxonomy and plant breeding. Ph.D. thesis,125, Agricultural University : Wageningen, The Netherlands.

Erlich-Hadad, T., Hadad, R., Feldman, A., Greif, H., Lictenstein, M., Lorberboum-Galsk, H., 2017.TAT-MTS-MCM fusion proteins reduce MMA levels and improve mitochondrial activity and liver function in MCM-deficient cells. J. Cell. Mol. Med. 22, 1601-1613.

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)., 2001. JAMA 285, 2486-2498.
FAOSTAT., 2016. Food and Agricultural Organization of the United Nation Statistics Data Retrieved.

Fapohunda, S.O., Afolayan, A., 2012. Fermentation of cocoa beans and antimicrobial potentials of the pod husk phytochemicals. J. Phys. Pharm. Adv. 3, 158-164.

Farhat, G., 2014. "Dark chocolate : an obesity paradox or a culprit for weight gain ? " Phytother. Res. 28, 791-797.

Faridi, Z., Njike, V.Y., Dutta, S., Ali, A., Katz, D.L., 2008. Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function : A randomized controlled crossover trial. Am. J. Clin. Nutr.88, 58-63.

Ferdowsian, H. R. and Levin, S., 2010. Does diet really affect acne ? Skin Therapy. Lett. 15, 1-2.
Fernandez, M.L., 2001. Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma liipids and cardiovascular risk. Current opinion in lipidology. 12, 35-40.

Fernandez-Millan, E., Cordero-Herrera, I., Ramos, S., Escriva, F., Alvarez, C., Goya L., 2015. Cocoa-rich diet attenuates beta cell mass loss and function in young zucker diabetic fatty rats by preventing oxidative stress and beta cell apoptosis. Mol. Nutr. Food Res. 59, 820-824.

Fernández-Millán, E., Cordero-Herrera, I., Ramos, S., Escrivá, F., Alvarez, C., Goya, L., Martín, M.A., 2015. Cocoa-rich diet attenuates beta cell mass loss and function in young Zucker diabetic fatty rats by preventing oxidative stress and beta cell apoptosis. Mol. Nutr. Food Res. 59, 820-824.

Fernandez-Murga, L., Tarin, J. J., Garcia-Perez, M. A., Cano, A., 2011. The impact of chocolate on cardiovascular health. Maturitas. 69, 312-321.

Ferrannini, E., 2007. Metabolic syndrome : a solution in search of a problem. J Clin Endocrinol. Metab. 92, 396-398.

Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., De Natale, A. and Pollio, A., 2009. Review Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). Fitoterapia. 80, 255-262.

Ferruzzi, M.G., Bordenave, N., Hamaker, B.R., 2012. Does flavor impact function ? Potential consequences of polyphenol-protein interactions in delivery and bioactivity of flavan-3-ols from foods. Physiol Behav. 107 : 591-597.

Field, D. T., Williams, C. M., Butler, L. T., 2011. Consumption of cocoa flavanols results in an acute improvement in visual and cognitive functions. Physiol. Behav. 103, 255-260.

Fisher, N.D., Hollenberg, N.K., 2006. Aging and vascular responses to flavanol-rich cocoa. J. Hypertens. 24, 1575-1580.

Fisher, N.D., Hughes, M., Gerhard-Herman, M., Hollenberg N.K., 2003. Flavonol rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. Am. J. Hypertens. 21, 2281-2286.

Fletcher, A. C., Porter, L. J., Haslam, E., Gupta, R. K.,1977. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. J. Chem. Soc. 14, 1628-1637.

Flint, A., Raben, A., Ersboll, A.K., Holst, J.J., Astrup, A., 2001. The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 25 :781-92.

Fogliano, V., Corollaro, M.L., Vitaglione, P., Napolitano, A., Ferracane, R., Gibson, G. 2011. In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. Mol. Nutr. Food Res. 55, 44-55.

Folin, O., Denis, W., 1915. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. J. Biol. Chem. 22, 305-308.

Food and Nutrition Board (FNB)., 2001. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc.

Fraga, C. G., Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. L., Carrasquedo, F., Lotito, S. B., Lazarus, S., Schmitz, H. H. and Keen, C. L., 2005. Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. J. Immunol. Res. 12, 11-17.

Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Mol. Aspects Med. 31, 435-445.

Fraga, C.G., 2005. Cocoa, diabetes, and hypertension : Should we eat more chocolate ? A. J. Clin. Nutr. 81, 541-542.

Francis, S. T., Head, K., Morris, P. G., Macdonald, I. A., 2006. The Effect of Flavanol-rich Cocoa on the fMRI Response to a Cognitive Task in Healthy Young People. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 47, 215-220.

Franco, R., Oñatibia-Astibia, A., Martínez-Pinilla, E., 2013. Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. Nutrients. 5, 4159-4173.

Franklin, B.A., Kahn, J.K., Gordon, N.F., Bonow, R.O., 2004. A cardioprotective“polypill” ? Independent and additive benefits of lifestyle modification. Am. J. Cardiol. 94,162-166.

Franzen, M., Borgerhoff Mulder, M., 2007. Ecological, economic and social perspectives on cocoa production worldwide. Biodivers. Conserv. 16, 3835-3849.

Frauendorfer, F. and Schieberle, P., 2008. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. J. Agric. Food Chem. 56, 10244-10251.

Fries, J. H., 1978. Chocolate: A review of published reports of allergic and other deleterious effects real or presumed. Ann. Allergy Asthma. Immunol. 41, 195-207.

Fu Z, Yuskavage J, Liu D., 2013. Dietary flavonol epicatechin prevents the onset of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. J. Agric. Food Chem.61, 4303-4309.

Fulton, J. E. Jr., Plewig, G., Kligman, A. M., 1969. Effect of chocolate on acne vulgaris. JAMA. 210, 2071-2074.
Fung, T., 2011. Healthy Eating: A Guide to the New Nutrition. Harvard School of Public Health, Nutrition Department. Boston, MA. 48 pp.

Galli C., 2013. Cocoa, Chocolate and Blood Lipids. In Chocolate and Health. Springer. 127-135.

Galli, C., 2012. Cocoa, Chocolate and Blood Lipids. In : Conti A., Paoletti R., Poli A., Visioli F. (eds) Chocolate and Health. Springer. 127-135.

Global Advocacy Council of Physical Activity, International Society of Physical Activity and Health (GACPAISPAH)., 2010. La Charte de Toronto pour l'activité physique : un appel mondial à l'action.

Gómez-Juaristi, M. L., Bravo G.L.T., Vaquero, M. P., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., 2011. Beneficial effects of chocolate on cardiovascular health. Nutr. Hosp. 26, 289-292.

Goodrich, K.M., Fundaro, G., Griffin, L.E., Grant, A., Hulver, M.W., Ponder, M.A., 2012. Chronic administration of dietary grape seed extract increases colonic expression of gut tight junction protein occludin and reduces fecal calprotectin in a secondary analysis of healthy Wistar Furth rats. Nutr. Res. 32 : 787-794.

Grande, F., Anderson, J.T., Keys A., 1970. Comparison of effects of palmitic and stearic acids in the diet on serum cholesterol in man. Am. J. Clin. Nutr. 23, 1184-1193.
Grant, J. D., Anderson, P. C., 1965. Chocolate as a cause of acne : A dissenting view. Mo. Med. 62, 459-460.

Grassi D., Desideri, G., Ferri, C., 2010. Blood pressure and cardiovascular risk : what about cocoa and chocolate ? Arch. Biochem. Biophys. 501, 112-115.

Grassi, D., 2013. "Protective effects of dark chocolate on endothelial function and diabetes." Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 16, 662-668.

Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., Blumberg, J. B., Ferri, C., 2008. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. J. Nutr. 138, 1671-1676.

Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G., Ferri, C., 2005. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. Am. J. Clin. Nutr. 81, 611-614.

Grassi, D., Necozione, S., Lippi, C., Croce, G., Valeri, L., 2005. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. Hypertension. 46, 398-405.

Grassi, D., Desideri, G., Mai, F., Martella, L., De Feo, M., Soddu, D., Fellini, E., Veneri M., Stamerra C.A., Ferri, C., 2015. Cocoa, glucose tolerance, and insulin signaling: cardiometabolic protection. J. Agric. Food Chem. 63, 9919-9926.

Grivetti, L. E. and H. Y. Shapiro., 2011. Chocolate: History, Culture, and Heritage. 1-1850.

Grundy SM., 1994. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. Am. J. Clin. Nutr. 60, 986-989.

Grundy, S.M., Hansen, B., Smith, S.C Jr., Cleeman, JI., Kahn, R.A., 2004. American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Diabetes Association. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. Circulation. 109, 551-556.

Gu, L., House, S.E., Wu, X., Ou, B., Prior, R. L., 2006. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. J. Agric. Food Chem. 54, 4057- 4061.

Gu, Y., 2014. "Dietary cocoa reduces metabolic endotoxemia and adipose tissue inflammation in high-fat fed mice." J. Nutr. Biochem. 25, 439-445.
Gu, Y., Hurst, W.J., Stuart, D.A., Lambert, J.D., 2011. Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins. J. Agric. Food Chem. 59, 5305 - 5311.

Gu, Y., Lambert, J. D., 2013. "Modulation of metabolic syndrome-related inflammation by cocoa." Mol. Nutr. Food Res. 57, 948-961.

Gu, Y., Yu, S., Lambert, J.D., 2014. Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. Eur. J. Nutr. 53, 149-158.

Guan H., Lin, Y., Bai, L., An, Y., Shang, J., Wang, Z., Zhao, S., Fan, J., Liu, E., 2016. "Dietary Cocoa Powder Improves Hyperlipidemia and Reduces Atherosclerosis in Apo E Deficient Mice through the Inhibition of Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress." Mediators Inflamm. 2016, 1-12.

Guerrero, L., Margalef, M., Ponsa, Z., Quiñones, M., Arola, L., Arola-Arnala, A., Muguerza, B., 2013. Serum metabolites of proanthocyanidin-administered rats decrease lipid synthesis in HepG2 cells. J. Nutr. Biochem. 24, 2092-2099.

Guiltinan, M. J., Maximova, S. N., 2015. Applications of Genomics to the Improvement of Cacao. RSC. 67-81.

Guo, Z., Hensrud, D.D., Johnson, C.M., Jensen, M.D., 1999. Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes. Diabetes. 48,1586-1592.

Gutiérrez, J. T., Pérez, E., 2015. Significant Quality Factors in the chocolate processing: Cocoa Post Harvest, And In Its Manufacture. In Chocolate. Elevina Pérez Sira. Carcas. 1-47.

Gutiérrez-Salmeán, G., Meaney, E., Ceballos-Reyes, G., Villarreal, F., 2015. Chocolate and Cardiovascular Health. In Chocolate and Health : Chemistry, Nutrition and Therapy. 132-145.

Hakkinen S., 2000. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products [Ph.D. dissertation], Faculty of Medicine, Kuopio, Finland.

Halbwirth, H., 2010. The Creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. Int. J. Mol. Sci. 11, 595-621.

Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Schmitz, H. H., 2000. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. J. Nutr. 130, 2086S-2092S.

Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Rucker, R., Schmitz, H.H., 1999. Identification of procyanidins in cocoa (Theobroma cacao) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 47, 490-496.

HAN, X., SHEN, T., LOU, H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. Int. J. Mol. Sci. 8, 950-988.

Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., 2010. "Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism." Int. J. Mol. Sci. 11, 1365-1402.

Hannum, S.M., Erdman, J.W., 2000. Emerging health benefits from cocoa and chocolate. J. Med. Food 3, 73-75.

Hansen, E.C, Del Olmo, M., Burri, C., 1998. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. J. Sci. Food Agric. 77, 273-281.

Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55, 481-504.

Harwood, M.L., Ziegler. R.G., Hayes, J.E., 2013. Tolerance for high flavanol cocoa powder in semisweet chocolate. Nutrients. 5, 2258-2267.

Hashim, P., Selamat, J., Syed Muhammad, S.K., Ali, A., 1998. Changes in free amino-acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. J. Sci. Food Agric. 78, 535-542.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem.13, 572-584.

Heinrich, U., Neukam, K., Tronnier, H., 2006. Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. J. Nutr. 136, 1565-1569.

Heiss, C., Finis, D., Kleinbongard, P., 2007. Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. J. Cardiovasc. Pharmacol. 49, 74-80.

Heiss, C., Kleinbongard, P., Dejam, A., 2005. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. J. Am. Coll. Cardiol. 46, 1276-1283.

Helm, L., Macdonald, I. A., 2015. "Impact of beverage intake on metabolic and cardiovascular health." Nutr. Rev. 73, 120-129.

Higashida, K., Higuchi, M., S. Terada., 2009. Dissociation between PGC-1α and GLUT-4 expression in skeletal muscle of rats fed a high-fat diet . J. Nutr. Sci. Vitaminol. 55, 486-491.

Hii, C.L., Law, C.L., Misnawi, S.S., Cloke, M., 2009. Polyphenols in cocoa (Theobroma cacao L.). Asian J. Food Agro-Ind. 2, 702-722.

Hollman, P.C.H., De Vries, J.H.M., Katan, M.B., 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. FEBS. 418, 152-156.

Holt, R.R., Lazarus, S.A., Sullards, M.C., Zhu, Q.Y., Schramm, D.D., Hammerstone, J.F., Fraga, C.G., Schmitz, H.H., Keen, C.L., 2002. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4β-8) -epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. Am. J. Clin. Nutr. 76: 798-804.

Holt, R.R., Schramm, D.D., Keen, C.L., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., 2002. Chocolate consumption and platelet function. JAMA. 287, 2212-2213.

Hong, Y., Jin, X., Mo, J., Lin, H.M., Duan, Y., Pu, M., Wolbrette, D.L., Liao, D., 2007. Metabolic syndrome, its preeminent clusters, incident coronary heart disease and all-cause mortality—results of prospective analysis for the Atherosclerosis Risk in Communities study. J. Intern. Med. 262, 113-122.

Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Cornu, K.A., 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. Am. J. Clin. Nutr. 88, 38-50.

Hossain SJ, Kato H, Aoshima H, Yokoyama T, Yamada M, Hara Y., 2002. Polyphenol induced inhibition of the response of na (+) /glucose cotransporter expressed in xenopus oocytes. J. Agric. Food Chem. 50, 5215-5219.

Hugenholtz, J., 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. 12, 165-78.

Hurst Jeffrey. W., 2015. Chocolate and Health: Chemistry, Nutrition and Therapy: Cacao Chemistry. Edited by Philip K. Wilson and W. Jeffrey Hurst. Rsc : 1-260.

Hurst, J.W., Krake, S.H., Bergmeier, S.C., Payne, M.J., Miller, K.B., Stuart, A. D., 2011. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. Chem. Cent. J. 53, 1-10.

Hurst, W.J., Glinski, J.A., Miller, K.B., Apgar, J., Davey, M.H., Stuart, D.A., 2008. Survey of the trans-resveratrol and trans-piceid content of cocoa-containing and chocolate products. J. Agric. Food Chem. 56, 8374-8378.
ICCO., 2016. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. XLII, Cocoa year 2015 / 2016.

International Diabetes Federation, 2005: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.

Isomaa B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsblom, C., Forsén B., Lahti, K., 2001. Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated with the Metabolic Syndrome. Diabetes Care. 24, 683-689.

Iwaro, A. D., Bekele, F. L., Butler, D.R., 2003. Evaluation and utilisation of cacao (Theobroma cacao L.) germplasm at the International Cocoa Genebank, Trinidad. In : Euphytica. 130, 207-221.

Jaganath, I. B., Crozier, A., 2010. Dietary flavonoids and phenolic Compounds. In Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry Nutrition and Pharmacology. 1- 49.

Jagoret, P., Michel-Dounias, I., Malézieux. E., 2011. Long-term dynamics of cocoa agroforests : A case study in central Cameroon. Agroforest. System. 81, 267-278.

Jalil, A.M.M., Abbe, A.I., 2008. Polyphenols in cocoa and cocoa products : Is there a tink between antioxidant properties and health ? Molecules 13, 2190-2219.

Jalil, A.M.M., Amin I., Pei , C.P., Hamid, M., Kamaruddin, S.H.S., 2008b. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. J. Agric. Food Chem. 56, 7877-7884.

Järvinen, R. M. K., Loukaskorpi, M., Uusitupa, M. I. J., 2003. Tolerance of symptomatic lactose malabsorbers to lactose in milk chocolate. Eur. J. Clin. Nutr. 57, 701-705.
Jensen, M.D., Caruso, M., Heiling, V., Miles, J.M., 1989. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. Diabetes. 38, 1595-601.

Jespersen, L., Nielsen, D.S., Honholt, S., Jakobsen, M., 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. FEMS Yeast Res. 5,441-553.

Jia, L., Liu, X., Bai, Y. Y., Li, S. H., Sun, K., He, C., 2010. Short-term effect of cocoa product consumption on lipid profile : A meta-analysis of randomized controlled trials. Am. J. Clin. Nutr. 92, 218-225.

Jolić, S.M., Redovniković, R. I., Marković, K., Šipušić, D.D.I., Delonga, K., 2011. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. Int. J. Food Sci. Tech. 46, 1793 - 1800.

Jones, A.E., Stolinski, M., Smith, R.D., Murphy, J.L., Wootten, S.A., 1999. Effects of fatty acid chain length and saturation on the gastrointestinal handling and metabolic disposal of dietary fatty acids in women. Br J. Nutr. 81, 37-43.

Jonfia-Essien, W. A., West, G., Alderson, P. G., Tucker, G., 2008. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. Food Chem.108, 1155-1159.
Jongeneel, C.V., 1994. “Regulation of the TNF alpha gene”. Prog. Clin. Biol. Res. 388, 367-381.

Jorge, A. T. S., Arroteia, K. F., Lago, J. C., 2011. A new potent natural antioxidant mixture provides global protection against oxidative skin cell damage. Int. J. Cosmet. Sci. 33, 113-119.

Kamio, N., Suzuki, T., Watanabe, Y., Suhara, Y., Osakabe, N., 2016. A single oral dose of flavan-3-ols enhances energy expenditure by sympathetic nerve stimulation in mice. Free Radical Bio. Med. 91, 256-263.

Kaplan, N.M., 1989. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. Arch. Intern. Med. 149, 1514-20.

Karr, S.C., Lampe, J.W., Hutchins, A.M., Slavin, J.L., 1997. Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. Am. J. Clin Nutr. 66 :46-51.

Katz, D. L., Doughty, K., A. Ali, A., 2011. Cocoa and chocolate in human health and disease. Antioxid. Redox Signal. 15, 2779-2811.

Kaur, J., 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. Cardiol. Res. Pract. 2014, 21.

Kealey, K. S., Snyder, R. M., Romanczyk, L. J., Geyer, H. M., Myers, M. E., Withcare, E. J., Hammerstone, J. F. and Schmitz, H. H., 1998. Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of the making same and medical uses. In : Patent Cooperation Treaty (PCT). 1-45.

Keen, C. L., Holt, R. R., Polagruto, J. A., Wang, J. F., Schmitz, H. H., 2002. Cocoa flavanols and cardiovascular health. Phytochem. Rev. 1, 231-240.

Keeney, P., 1972. Various interactions in chocolate flavor. J. Am. Oil Chem. Soc. 49(10):567-572.

Keeney, P.,1972. Various interactions in chocolate flavor. J. Am. Oil Chem. Soc. 49 (10) :567-572.

Kelm, M.A., Johnson, J.C., Robbins, R.J., Hammerstone, J.F., Schmitz, H.H., 2006. High performance liquid chromatography separation and purification of cacao (Theobroma cacao L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. J. Agric. Food Chem. 54, 1571-1576.

Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout D, Nedeljkovic S, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H., 1986. The diet and 15-year death rate in seven countries study. Am. J. Epidemiol.124, 903-915.

Khan, N., Khymenets, O., Urpí-Sardà, M., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Monagas, M., Mora-Cubillos, X., Llorach, R., Andres-Lacueva, C., 2014. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. Nutrients. 6, 844-880.

Khan, N., Monagas, M., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpi-Sarda, M., Lamuela-Raventos, R.M., Estruch, R., 2012. Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 22, 1046-1053.

Khawaja, O., Gaziano, J. M., Djoussé, L., 2011. Chocolate and coronary heart disease : a systematic review. Curr. Atheroscler. Rep. 13, 447-452.

Kim, H., Keeney, P. G., 1984. (-) Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. : J. Food Sci. 49, 1090-1092.

Kim, J. ; Kim, J. ; Shim, J. ; Lee, C.Y. ; Lee, K.W. ; Lee, H.J., 2014. Cocoa phytochemicals : Recent advances in molecular mechanisms on health. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 54, 1458-1472.

Kim, Y., Keogh, B. J., Clifton, M.P., 2016. "Polyphenols and Glycemic Control." Nutrients. 8,1-17.

Kim, Y.B., Shulman, G.I., Kahn, B.B., 2002. Fatty acid infusion selectively impairs insulin action on Akt1 and protein kinase C lambda/zeta but not on glycogen synthase kinase-3. J. Biol. Chem. 277, 32915-32922.

Klevay, L., 1993. Copper in nuts may lower heart disease. Arch. Intern. Med. 153, 401-402.

Knapp A. W., 1920. Cocoa and Chocolate : Their History from Plantation toN Consumer. Chapman and Hall, Limited.

Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. N. Engl. J. Med. 346, 393-403.

Kobori k., Maruta, Y., Mineo, S., Shigematsu, T., Hirayama, M., 2013. Polyphenol-retaining decaffeinated cocoa powder obtained by supercritical carbon dioxide extraction and its antioxidant activity. Foods. 2, 462-477.

Kochhar, S., Gartenmann, K., Juillerat, M.A., 2000. Primary structure of the abundant seed albumin of Theobroma cacao by mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 48, 5593-5599.

Kofink, M., Papagiannopoulos, M., Galensa, R., 2007. (−) -Catechin in cocoa and chocolate : Occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. Molecules 12, 1274-1288.

Kothe, L., Zimmermann, B.F., Galensa, R., 2013. Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. Food Chem. 141, 3656-3663.

Kris-Etherton, P.M., Keen, C.L., 2002., “Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health”. Curr. Opin. Lipidol. 13, 41-49.

Kritchevsky, D., 1994. Stearic acid metabolism and atherogenesis : history. Am. J. Clin. Nutr. 60 :997-1001.

Kulkarni, R.N., Bruning, J.C., Winnay, J.N., Postic, C., Magnuson, M.A., Kahn, C.R., 1999. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. Cell. 96, 329-339.

Kwon, Y.I, Apostolidis, E., Shetty, K., 2008. In vitro studies of eggplant (Solanum melongena) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. Bioresour. Technol. 99, 2981-2988.

Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Kim, Y.C, Shetty, K., 2007. Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin : In vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. J. Med. Food 10, 266-275.

Kyi, T.M., Wan Ramli, W.D., Abu Bakar, M., Mohd. Wahid, S., Amir, A.H.K., Meor Zainal, M.T., 2005. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of malaysian cocoa beans. Int. J. Food Sci. Tech. 40, 323-331.

Kylin E., 1923. Hypertonie-Hyperglykamie- Hyperurikamiesyndrome. Zentralblatt fur innere Medizin.44.

Lachenaud, P., Motamayor, J. C., 2004. Red Pods in Progenies from the Euleupousing River in French Guiana. Ingenic Newsletter. 9, 12-15.

Lairon. D., 1997. Dietary fatty acids and arteriosclerosis. Biomed. Pharmacother. 51, 333-336.

Lakka, H.M., Laaksonen, D.E., Lakka, T.A., 2002. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. JAMA. 288, 2709-2716.

Lakka, T.A., Laaksonen, D.E., Lakka, H.M., 2002. Sedentary lifestyle, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. Med. Sci. Sports Exerc. 35, 1279-86.

Lam, D.W., LeRoith, D., 2000. Metabolic Syndrome. [Updated 2015 May 19]. In : De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA) : MDText.com.

Lamuela-Raventós, R.M. ; Andres-Lacueva, C. ; Permanyer, J. ; Izquierdo-Pulido, M., 2005. More antioxidants in cocoa. J. Nutr. 131, 834-835.

Lamuela-Raventós, R.M., Romero-Pérez, A. I., Andrés-Lacueva, C. and Tornero, A., 2005. Review : Health effects of cocoa flavonoids. Food Sci. Technol. Int. 11, 159 - 176.

Lange H., Fincke A., 1970. Kakao und Schokolade. Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz, Part of the Handbuch der Lebensmittelchemie book series 6, 210-309.

Langer, S., Marshall, L. J., Day, A. J., Morgan, M. R. A., 2011. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate : A study of the correlation with nonfat cocoa solids. J. Agric. Food Chem. 59, 8435-8441.

Lares, M., Pérez, E., 2015. Types of chocolate and their nutritional value - chocolate as a functional food. In : Chocolate. 118-142.

Larsson, S.C., Virtamo, J., Wolk, A., 2012. Chocolate consumption and risk of stroke A prospective cohort of men and meta-analysis. Neurology. 79,12.

Latham, L. S., Latham, L.S., Hensen, Z.K., Minor, D.S., 2014. "Chocolate--guilty pleasure or healthy supplement ?" J. Clin. Hypertens. 16, 101-106.

Latif. R., 2013. Chocolate /cocoa and human health : a review. Departement of physiology, college of medecine, University of Drammam, kingdom of Saudi Arabia. J. Med. 71, 63-68.

Lee, H. S., Widmer, B. W., 1996. Phenolic compounds. In L. M. L. Nollet, Handbook of food analysis. 821-894.

Lee, I-M., Shiroma, E. J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S. N., Katzmarzyk, P. T., 2012. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide : an analysis of burden of disease and life expectancy. Lancet. 380, 219-229.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., Lee, C. Y., 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. J. Agric. Food Chem. 51, 7292-7295.

Lee, K.W., Kundu, J.K., Kim, S.O., Chun, K.S., Lee, H.J., Surh, Y.J., 2006. Cocoa polyphenols inhibit phorbol ester-induced superoxide anion formation in cultured HL-60 cells and expression of cyclooxygenase-2 and activation of NF-kappa B and MAPKs in mouse skin in vivo. J. Nutr. 136, 1150-1155.

Lee, K.W., Kundu, J.K., Kim, S.O., Chun, Y.KS., Lee, H.J., Surhy, YJ., 2006. Cocoa Polyphenols Inhibit Phorbol Ester-Induced Superoxide Anion Formation in Cultured HL-60 Cells and Expression of Cyclooxygenase-2 and Activation of NF-kB and MAPKs in Mouse Skin In Vivo. J. Nutr. 136, 1150-1155.

Lee, S., Janssen, I., Ross, R., 2004. Interindividual variation in abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue : influence of measurement site. J. Appl. Physiol. 97, 948-54.

Lee, W. J., 2006. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARα and PGC-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 340, 291-295.

Lee, W.J., Huang, M.T., Wang, W., Lin, C.M., Chen, T.C., Lai, I.R., 2004. Effects of obesity surgery on the metabolic syndrome. Arch. Surg. 139, 1088-1092.

Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D., Unger, R.H., 1994. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obeses rats : impairment in adipocyte-bêta-cell relationships. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 10878-10882.

Lerceteau, E., Robert, T., Pétiard, V., Crouzillat, D., 1997. Evaluation of the extent of genetic variability among Theobroma cacao accessions using RAPD and RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 95, 10-19.

Lewis, G.F., Uffelman, K.D., Szeto, L.W., Weller, B., Steiner, G., 1995. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. J. Clin. Invest. 95, 158-166.

Li, J., Vause, C. V. and Durham, P. L., 2008. Calcitonin gene-related peptide stimulation of nitric oxide synthesis and release from trigeminal ganglion glial cells. Brain Res. Rev. 1196, 22-32.

Li, Y., Wen, S., Kota, B.P., Peng, G., Li, G.Q., Yamahara, J., 2005. Punica granatum flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in zucker diabetic fatty rats. J. Ethnopharmacol. 99, 239-244.

Liendo, C., 2015. Escuela de Chocolatería de la ALBA (The Alba School of Chocolate) ; In Chocolate. 191-201.

Lippi, G., Franchini, M., Montagnana, M., Favaloro, E.J., Guidi, G.C., Targher, G., 2009. Dark chocolate : consumption for pleasure or therapy ? J. Thromb. Thrombolys. 28, 482-488.

Litterio, C.M., Marcela A. Prieto V., Adamo A. M., Elesgaray, R., Oteiza P.I., Galleano, M., Fraga.C.G., 2015. (−) -Epicatechin reduces blood pressure increase in high-fructose-fed rats : effects on the determinants of nitric oxide bioavailability. J. Nutr. Biochem. 26, 745-751.

Loffredo, L., 2016. "Antioxidant and antiplatelet activity by polyphenol-rich nutrients : focus on extra-virgin olive oil and cocoa." Br. J. Clin. Pharmacol. 83, 96-102.

Luna, F., Crouzillat, D., Cirou, L., Bucheli, P., 2002. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. J. Agric. Food Chem. 50, 3527-3532.

Madhavadas, S., 2016. "The Neuroprotective Effect of Dark Chocolate in Monosodium Glutamate-Induced Nontransgenic Alzheimer Disease Model Rats : Biochemical, Behavioral, and Histological Studies." J. Diet. Suppl. 13, 449-460.

Makkar, H. P. S., 1989. Protein precipitation methods for quantitation of tannins : a review. J. Agric. Food Chem. 37, 1197-1202.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols : Food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79, 727-747.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailabilities studies. Am. J. Clin. Nutr. 81, 230-242.

Mao T. k., Van de Water J., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Gershwin, M.E., 2002. Modulation of TNF-a Secretion in Peripheral Blood Mononuclear Cells by Cocoa Flavanols and Procyanidins. Clin. Dev. Immunol. 9, 135-141.

Mao TK, Powell J, Van de Water J., 2000. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 beta in peripheral blood mononuclear cells. Life Sci. 66, 1377-1386.

Mao, T., Van de Water, J., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Gershwin, M.E., 2000. “Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion”. J. Nutr. 130, 2093-2099.

Mao, T.K., Powell, J.J., Van de Water, J., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Gershwin, M.E.,1999. “The influence of cocoa procyanidins on the transcription of interleukin-2 in peripheral blood mononuclear cells”. Int. J. Immunother. 15, 23-29.

Mao, T.K., Powell, J.J., Van de Water, J., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Gershwin, M.E., 2000. “Effect of cocoa procyanidins on secretion of interleukin-4 in peripheral blood mononuclear cells”. J. Med. Food. 3, 107-114.

Markham, K. R., Bloor, S. J., 1998. Analysis and identification of flavonoids in practice. Agris.fao.org In C. A. Rice-Evans, & L. Packer, Flavonoïdes in health and disease, 1-33.

Martin, F.P., Rezzi, S., Pere-Trepat, E., Kamlage, B., Collino, S., Leibold, E., Kastler, J., Rein, D., Fay, L.B., Kochhar, S., 2009. Metabolic effects of dark chocolate consumption on energy, gut microbiota, and stress-related metabolism in free-living subjects. J. Proteome Res. 8, 5568-5579.

Martin, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Granado Serrano, A. B., Izquierdo- Pulido, M., Bravo, L. and Goya, L., 2008. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. J. Agric. Food Chem. 56, 7765-7772.

Martin, M.A., Fernandez-Millan, E., Ramos, S., Bravo, L., Goya, L., 2014. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. Mol. Nutr. Food Res. 58, 447- 456.

Martins, A.R., Nachbar, R.T., Gorjao, R., Vinolo, M.A., Festuccia, W.T., Lambertucci, R.H., 2012. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids : importance of the mitochondrial function. Lipids Health Dis. 11, 1-11.

Massot-Cladera, M., Perez-Berezo, T., Franch, A., Castell, M., Perez-Cano, F.J., 2012. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. Arch. Biochem. Biophys. 527, 105-112.

Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S.M., Jialal, I., 2002. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. J. Nutr. 132, 3663-3667.

Matsui, N., Ito, R., Nishimura, E., Yoshikawa, M., 2005. Ingested cocoa can prevent high-fat diet–induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. Nutrition.21, 594-601.

Mazid, M., Khan, T. A., Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biol. Med. 3, 232-249.

McMurrough, I., Byrne, J. R., 1992. HPLC analysis of bittering substances, phenolic compounds, and various compounds of alcoholic beverages. In L. M. L. Nollet, food analysis by HPLC. 579-641.

Mellor, D. D., 2013. "High-polyphenol chocolate reduces endothelial dysfunction and oxidative stress during acute transient hyperglycaemia in Type 2 diabetes : a pilot randomized controlled trial." Diabet Med. 30, 478-483.

Mellor, D.D., Sathyapalan, T., Kilpatrick, E.S., 2010. High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in type 2 diabetes. Diabet Med. 227, 1318-1321.

Melnik, B., 2009. Milk consumption : Aggravating factor of acne and promoter of chronic diseases of Western societies. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 7, 364-370.

Mensor L.L., Menezes, F.S., Leitáo, G.G., Reis, A.S., Dos Santos, T.C, Coube, C.S., Leitáo, S.G., 2001. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. Phytother. Res.15, 127-130.

Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C.Y., Mchale, N. L., Flanagan, J. A., Ou, B., Hurst, W. J., 2006. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoacontaining and chocolate products in the united states. J. Agric. Food Chem. 54, 4062-4068.

Min, S.Y., Yang, H., Seo, S.G., Shin, S.H., Chung, M-Y., Kim, J., 2013. "Cocoa polyphenols suppress adipogenesis in vitro and obesity in vivo by targeting insulin receptor." Int. J. Obes. 37, 584-592.

Misnawi S. J., B. Jamilah., Nazamid, S., 2004. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. Food Qual. Prefer. 15, 403-409.

Misnawi S. J., Jamilah, B., Nazamid, S., 2004. Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. Food Chem. 85, 73-80.

Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., Llorach, R., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., Andres-Lacueva, C., Bartolome, B., 2010. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. Food Funct.1, 233-253.

Morel, S., Arnould, S., Vitou, M., Boudard, F., Guzman, C, Poucheret, P., Fons, F., Rapior, S., 2011. Antiproliferative and antioxidant activities of wild boletales mushrooms from france. Int. J. Med. Mushrooms. 13-29.

Moser, G., Leuschner, Ch., Hertel, D., Hölscher, D., Köhler, M., Leitner, D., Michalzik, B., Prihastanti, E., Tjitrosemito, S. and Schwendenmann, L., 2010. The response of cocoa trees (Theobroma cacao) to a 13-month desiccation period in Sulawesi, Indonesia. Agroforest. Syst. 79 :171-187.

Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA., 2002. Cacao domestication I : The origin of the cacao cultivated by the mayas. Heredity. 89, 380-386.

Motamayor, J. C., Boza, E. J., Irish, B. M., Meerow, A. W., Tondo, C. L., Rodriguez, O. A., Ventura-Lopez, M., Gomez, J. A., Moore, J. M., Zhang, D. P. Schnell, R. J., 2013. Genet. Resour. Crop. 60, 605-619.

Mullen, W., Borges, G., Donavan, J. J., Edwards, C. A., Serafini, M., Lean, M. E. J., Crozier, A., 2009. Milk decreases urinary excretion but not plasma pharmacokinetics of cocoa flavan-3-ol metabolites in humans. Am. J. Clin. Nutr. 89, 1784-1791.
Muniyappa, R., Sowers J.R., 2013. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. Rev. Endocr. Metab. Disord. 14, 5-12.

Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Rissanen, T.H., Virtanen, J.K., Kaikkonen, J., Nyyssonen, K., Salonen, J.T., 2004. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. Free Radic. Biol. Med. 37, 1351-1359.

N'Goran, J. A. K., Laurent, V., Risterucci, A. M., Lanaud, C., 2000. The genetic structure of cocoa populations (Theobraoma cacao L.) revealed by RFLP analysis. Euphytica. 115, 83-90.

N'Goran, J.A.K., Laurent, V., Risterucci A-M., Lanaud, C., 1994. Comparative genetic diversity studies of Theobroma cacao L. using RFLP and RAPD markers. Heredity. 73, 589-597.

Nakagami, T., DECODA Study Group, 2004. Hyperglycaemia and mortality from all causes and from cardiovascular disease in five populations of Asian origin. Diabetologia. 47, 385-394.

Natsume, M. ; Osakabe, N. ; Yamagishi, M. ; Takizawa, T. ; Nakamura, T. ; Miyatake, H. ; Hatano, T. ; Yoshida, T., 2000. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 2581-2587.

Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., Said, M., 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (Theobroma Cacao) during fermentation. Ind. Crops Prod. 24, 87-94.

Neilson, A. P., Sapper, T. N., Janle, E. M., Rudolph, R., Matusheski, N. V., Ferruzzi, M. G., 2010. “Chocolate matrix factors modulate the pharmacokinetic behavior of cocoa flavan-3-ol phase II metabolites following oral consumption by Sprague- Dawley Rats,” J. Agric. Food Chem. 58, 6685-6691.

Neilson, A.P., Ferruzzi, M.G., 2011. Influence of formulation and processing on absorption and metabolism of flavan-3-ols from tea and cocoa. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2, 125-151.

Neilson, A.P., George, J.C., Janle, E.M., Mattes, R.D., Rudolph, R., Matusheski, N.V., Ferruzzi, M.G., 2009. Influence of chocolate matrix composition on cocoa flavan-3-ol bioaccessibility in vitro and bioavailability in humans. J. Agric. Food Chem. 57 : 9418-9426.

Neukam, K., Stahl, W., Tronnier, H., 2007. Consumption of flavanolrich cocoa acutely increases microcirculation in human skin. Eur. J. Nutr. 46, 53-56.

Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Omokolo Ndoumou, D., Lieberei, R., 2006. Comparative study of different cocoa (Theobroma cacao L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. J. Food Compos. Anal. 19, 612-619.

Nogueira, L., Le, P., 2012. "Consumption of high-polyphenol dark chocolate improves endothelial function in individuals with stage 1 hypertension and excess body weight." Int. J. Hypertens. 2012, 1-10.

Noreen, Y., Ringbom, T., Perera, P., Danielson, H., Bohlin, L., 1998. “Development of a radiochemical cyclooxygenase-1 and -2 in vitro assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis”. J. Nat. Prod. 61, 2-7.

Nurk, E., Refsum, H., Drevon, C. A., 2009. Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. J. Nutr. 139, 120-127.

Oddoye, O.K. E., Agyente-Badu Gyedu-Akoto, C.K. E., 2013. Cocoa and Its By-Products: Identification and Utilization. In Chocolate: in Health and Nutrition, Nutrition and Health. Adrianne Bendich. Chapter 3, 23-37.

Oliviero, T., Capuano, E., Cammerer, B., Fogliano, V., 2009. Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model systems. J. Agric. Food Chem. 57, 147-152.

Ono, K., Takahashi, T., Kamei, M., Mato, T., 2003. Effects of an aqueous extract of cocoa on nitric oxide production of macrophages activated by lipopolysaccharide and interferon. Nutrition. 19, 681- 685.

Oracz, J., Zyzelewicz, D., Ewa Nebesny, E., 2015. The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (Theobroma cacao L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 55, 1176-1192.

Ortega, N., Reguant, J., Romero, M.-P., Macia, A., Motilva, M.-J., 2009. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. J. Agric. Food Chem. 57, 5743-5749.

Ortega, N., Romero, M.P., Macia, A., Reguant, J., Angles, N., Morello, J.- R. and Motilva, M.-J., 2010. Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. J. Food Compos. Anal. 23, 298-305.

Ortega, N., Romero, MP., Macià A., Reguant, J., Anglès, N., Morelló, JR., Motilva, MJ., 2008. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. J. Agric. Food Chem. 56, 9621-9627.

Osakabe, N., 2013. "Flavan 3-ols improve metabolic syndrome risk factors : evidence and mechanisms." J. Clin. Biochem. Nutr. 52,186-192.

Osakabe, N., Baba, S., Yasuda, A., Iwamoto, T., Kamiyama, M., Takizawa, T., Itakura, H., Kondo, K., 2001. Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. Free Radic. Res. 34, 93-99.

Osawa K, Matsumoto T, Maruyama T, Naito Y., 1990. Inhibitory effects of aqueous extract of cacao bean husk on collagenase of Bacteroides gingivalis. Bull. Tokyo Dent. Coll. 31, 125-128.

Osman, H., Nasarudin, R., Lee, S. L., 2004. Extracts of cocoa (Theobroma cacao L.) leaves and their antioxidation potential. Food Chem. 86, 41-45.

Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., Adenan, I., 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chem. 100, 1523-1530.

Othman, A., Jalil, A. M. M., Ismail, A., Ghani, N. A., Adenan, I., 2010. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. Afr. J. Biotechnol. 9, 1052-1059.

Ottaviani, J.I., Momma, T.Y., Heiss, C., Kwik-Uribe, C., Schroeter, H., Keen, C.L., 2011. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. Free Radical Bio. Med. 50, 237-244.

Ottaviani, J.I., Momma, T.Y., Kuhnle, G.K., Keen, C.L., Schroeter, H., 2012. Structurally related (−) -epicatechin metabolites in humans : Assessment using de novo chemically synthesized authentic standards. Free Radic. Biol. Med. 52, 1403-1412.

Pajunen, P., Kotronen, A., Korpi-Hyövälti, E., Keinänen Kiukaanniemi, S., Oksa, H., Niskanen, L., 2011. Metabolically healthy and unhealthy obesity phenotypes in the general population : the FIN-D2D Survey. BMC Public Health. 11, 754.

Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G., DeVuyst, L., 2011. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. Food Microbiol. 28, 964-973.

Park, Y.C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G., Packe, L., 2000. “Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages”. FEBS Lett. 465, 93-97.

Pate, A. K., Rogers, J. T. and Huang, X., 2008. Cognitive impairment, and Alzheimer’s dementia. Int. J. Clin. Exp. Med. 1, 181-191.

Payne, M.J., Hurst, W.J., Miller, K.B., 2010. Impact of fermentation, drying, roasting and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. J. Agric. Food Chem. 58, 10518-10527.

Pedan, V., Fischer, N., Bernath, K., Hühn, T., Rohn, S., 2017. Determination of oligomeric proanthocyanidins and their antioxidant capacity from different chocolate manufacturing stages using the NP-HPLC-online-DPPH methodology. Food Chem. 214, 523-532.

Peláez, P.P., Bardón, I., Camasca, P., 2016. Methylxanthine and catechin content of fresh and fermented cocoa beans, dried cocoa beans, and cocoa liquor. Sci. Agric. 7, 355-365.

Percival, R. S., Devine, D. A., Duggal, M. S., Chartron, S., Marsh, P. D., 2006. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis. Eur. J. Oral Sci. 41, 343-348.

Perez-Cano, F.J., Perez-Berezo, T., Ramos-Romero, S., 2009. Is there an anti-in fl ammatory potential beyond the antioxidant power of cocoa ? In : Bishop MR, editor. Chocolate, fast foods and sweeteners : consumption and health. Hauppauge : Nova. 85-104.

Persson, I. A., Persson, K., Hagg, S., Andersson, R.G., 2011. Effects of cocoa extract and dark chocolate on angiotensinconverting enzyme and nitric oxide in human endothelial cells and healthy volunteers–a nutrigenomics perspective. J. Cardiovasc. Pharmacol. 57, 44-50.

Peters, C.M., Green, R. J., Janle, E. M., Ferruzzi, M.G., 2010. “Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability fromgreen tea.” Food Res. Int. 43, 95-102.

Pettipher, G.M.L., 1986. An improved method for the extraction and quantitation of anthocyanins in cocoa beans and its use as an index of the degree of fermentation. J. Sci. Food Agric. 37, 289-296.

Porter, L.J., Ma, Z. ; Chan, B.G., 1991. Cacao procyanidins : Major flavonoids and identification of some minor metabolites. Phytochemistry. 30, 1657-1663.

Pouliot, M-C., Desprk, J-P., Lemieux, S., Moorjani, S., Bouchard, C., Tremblay, A., Nadeau, A., Lupien, P. J., 1994. Waist circumference and abdominal sagittal diameter : Best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. Am. J. Cardiol. 73, 460-468.

Prior, R. L., Gu, L., 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. Phytochemistry. 66, 2264-2280.

Pucciarelli, D. and Grivetti, L., 2008. The medicinal use of chocolate in early North America. Mol. Nutr. Food Res. 52 (10) : 1215-1227.

Qin, Y.Z. ; Holt, R.R. ; Lazarus, S.A. ; Ensunsa, J.L. ; Hammerstone, J.F., Schmitz, H.H. ; Keen, C.L., 2002. Stability of flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. J. Agric. Food Chem. 50, 1700-1705.

Ramino-puig, E., castell, M., 2009. Cocoa: antioxydant and immunomodulator. Brit. J. Nutr. 101, 931-940.

Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G., 2010. (-) -Epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. Hypertension. 55,1398-1405.

Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G., 2011. (-) -Epicatechin induces calcium and translocation independent enos activation in arterial endothelial cells. Am J Physiol Cell. Physiol. 300, 880-887.

Ramiro-Puig, E., Castell, M., 2009. Cocoa : Antioxidant and immunomodulator. Br. J. Nutr. 931-940.

Ramiro-Puig, E., Franch, A., Castellote, C., Perez-Cano, F. J., Permanyer, J., Izquierdo-Pulido, M., Castell, M., 2005. Flavonoids from Theobroma cacao down-regulate inflammatory mediators. J. Agric. Food Chem. 53, 8506-8511.

Ramiro-Puig, E., Urpi-Sarda, M., Perez-Cano, F. J., Franch, A., Castellote, C., Andrés-Lacueva C., Izquierdo-Pulido, M., Castell, M., 2007. Cocoa enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. J. Agric. Food Chem. 55, 6431-6438.

Ramon D., Espin, J. C., 2007. A new process to develop a cocoa powderwith higher flavonoidmonomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. J. Agric. Food Chem. 55, 3926-3935.

Ranneh, Y., Ali, F., Al-Qubaisi, M., Esa, N.M., Amin Ismail, A., 2016. The inhibitory activity of cocoa phenolic extract against pro-inflammatory mediators secretion induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. SpringerPlus. 547, 1-10.

Rapport sur la santé dans le monde, 2002. Réduire les risques, promouvoir une vie saine. Genève, Organisation mondiale de la santé (OMS).
Reaven, G.M., 1988. Banting lecture. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes.37,1595-607.

Recio, M. C., Giner, R. M., Cienfuegos-jovellanos, E., Laghi., 2011. Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. J. Agric. Food Chem. 59, 6474-6483.

Redgwell RJ, Trovato V, Merinat S, Curti D, Hediger S, Manez A., 2003. Dietary fi bre in cocoa shell : characterisation of component polysaccharides. Food Chem. 81, 103-112.

Redgwell, R.J, Trovato, V., Curti, D., 2003. Cocoa bean carbohydrates : roasting-induced changes and polymer interactions. Food Chem. 80, 511-516.

Redovnikovic, R.I., Delonga, K., Mazor, S., Dragovic-Uzelac, V., Caric, M., Vorkapic-Furac, J., 2009. Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. Czech J. Food Sci. 27, 330-337.

Rein R, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG., 2000. Epicatechin in human plasma : in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma antioxidant capacity. J. Nutr. 130, 2109S-2114S.

Rein, D., Paglieroni, T. G., Pearson, D. A., 2000. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. J. Nutr. Sci.130, 2120-2126.

Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., 2000. Cocoa inhibits platelet activation and function. Am. J. Clin. Nutr.72, 30-35.

Reineccius, G.A., Andersen D.A., Kavanagh E.T., Keeney P.G., 1972. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. J. Agric. Food Chem. 20, 199-202.

Rice-Evans, C., 2001. Flavonoid antioxidants. Curr. Med. Chem. 8, 797-807.
Richelle, M., Tavazzi, I., Enslen, M., Offord, E.A., 1999. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. Eur. J. Clin. Nutr. 53, 22-26.

Ried, K., 2013. Dark Chocolate and (Pre-) Hypertension. R.R. Watson et al. (Eds.), Chocolate in Health and Nutrition, Nutrition and Health 7, 313.

Rimbach, G., Melchin M., Moehring, J., Wagner A.E., 2009. Polyphenols from Cocoa and Vascular Health—A Critical Review. Int. J. Mol. Sci. 10, 4290-4309.

Rios, J. L., 2015. "Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus." Planta Med. 81, 975-994.

Rios, L.Y., Bennett, R.N., Lazarus, S.A., Remesy, C., Scalbert, A., Williamson, G., 2002. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. Am. J. Clin. Nutr. 76, 1106-1110.

Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buend´ıa, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo- Cervantes, E., Jaramillo-Flores, M. E., 2011. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (Theobroma cacao L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. Food Res. Int. 44, 250-258.

Roelofsen, P.A., 1958. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. Adv Food Res.8, 225-296.

Romanczyk, L. J., Hammerstone, J. F., Buck, M. M., Post, L. S., Cipolla, G. G., Micceland, C. A., Mundt, J. A., & Schmitz, H. H., 1997. Cocoa extract compounds and methods for making and using the same. USA Patent : 1-279.

Roura, E., Andres-Lacueva, C., Estruch, R., Lourdes Mata, B. M., Izquierdo- Pulido, M. and Lamuela-Raventos, R. M., 2008. The effects of milk as a food matrix for polyphenols on the excretion profile of cocoa (−) -epicatechin metabolites in healthy human subjects. Brit. J. Nutr. 100, 846-85.

Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R., Mata-Bilbao, M. L., Izquierdo- Pulido, M., Waterhouse, A. L. and Lamuela-Ravent´os, R. M., 2007. Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. Ann. Nutr. Metab. 51, 493-498.

Rusconi, M., Conti, A., 2010. Theobroma cacao L., the food of the gods : A scientific approach beyond myths and claims. Pharmacol. Res. 61, 5-13.

Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., 2004. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. J. Biol. Chem.279, 32345-32353.

Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T., 1997. Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. Cell Immunol.177, 129-136.

Sánchez, D., Moulay, L., Muguerza, B., Quinones, M., Miguel, M., Aleixandre, A., 2010. Effect of a soluble cocoa fiber-enriched diet in Zucker fatty rats. J. Med. Food.13, 621-628.

Sansone, R., 2015. "Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women : a randomised, controlled, double-masked trial : the Flaviola Health Study." Br J. Nutr. 114, 1246-1255.

Santos, R.X., D.A Oliveira, G.A. Sodré, G. Gosmann, M. Brendel and C. Pungartnik., 2014. Antimicrobial activity of fermented Theobroma cacao pod husk extract. 7725-7735.

Santos-Buelga C., Scalbert A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds : Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. J. Sci. Food Agri. 80, 1094-1117.

Sarria, B., Martinez-Lopez, S., Sierra-Cinos, J.L., Garcia-Diz, L., Mateos, R., Bravo, L., 2014. Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults. Brit. J. Nutr. 111, 122-134.

Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J. Nutr. 130, 2073-2085.

Scapagnini, G., Davinelli, S., Di Renzo, L., De Lorenzo, A., Olarte, H.H, Micali, G., Cicero, F.A., Gonzalez, S., 2014. Cocoa Bioactive Compounds: Significance and Potential for the Maintenance of Skin Health. Nutrients. 6, 3202-3213.

Schewe, T., Kùhn, H., Sies, H., 2002. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. Amer. Soc. Nut. Sci. 132, 1825-1829.

Schewe, T., Sadik, C., Klotz, L O., Yoshimoto., 2001. Polyphenols of cocoa : inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. Biol. Chem. 382, 1687-1696.

Schinella G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., 2010. “Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed”. Food Res. Int. 43, 1614-1623. Schini-Kerth, V., 2014. "Role of polyphenols in improving endothelial dysfunction in diabetes." Free Radic. Biol. Med. 75, S11-S12.

Schramm, D.D., Karim, M., Schrader, H.R., Holt, R.R., Kirkpatrick, N.J., Polagruto, J.A. ; Ensunsa, J.L., Schmitz, H.H., Keen, C.L., 2003. Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. Life Sci. 73, 857-869.

Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Gonsalves, J.L., Lazarus, S.A. ; Schmitz, H.H., German, J.B., Keen, C.L., 2001. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. Am. J. Clin. Nutr. 73, 36-40.

Schroeter, H. ; Heiss, C. ; Balzer, J. ; Kleinbongard, P. ; Keen, C.L. ; Hollenberg, N.K. ; Sies, H. ; Kwik-Uribe, C. ; Schmitz, H.H. ; Kelm, M., 2006. (−) -Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 1024-1029.

Schwan, R.F., Wheals, A.E., 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 44,205-22.

Selmi, C., Cocchi, C.A., 2008. Chocolate at heart: the inflammatory impact of cocoa flavonols. Molecular. Nutr. Food Res. 52, 1340-1348.

Selmi, C., Mao, T. K., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Gershwin, M. E., 2006. The anti-inflammatory properties of cocoa flavanols. J. Cardiovasc. Pharmacol. 47, 163 - 171.
Sies, H., Schewe, T., Heiss, C., Kelm, M., 2005. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. Am. J. Clin. Nutr. 8, 304-312.

Sittarame, F., Golay, A., 2013. Comportement d'inactivité physique : une réponse adaptative inappropriée au maintien de la santé dans nos sociétés ? Rev. Med. Suisse. 9, 679-683.

Solayman, M., 2016. "Polyphenols : Potential Future Arsenals in the Treatment of Diabetes." Curr. Pharm. Des. 22, 549-565.

Song, P., Zhang, R., Wang, X., He, P., Tan, L., M, X., 2011. Dietary grape-seed procyanidins decreased postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and suppressing oxidative stress in rats. J. Agric. Food Chem. 59, 6227-6232.

Sorond, F., 2008. Cerebral blood flowresponse to flavanol-rich cocoa in healthy elderly humans. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 4, 433-440.

Sorond, F., Hollenberg, N. K., Panych, L. P., Fisher, N. D. L., 2010. Brain blood flow and velocity : Correlations between magnetic resonance imaging and transcranial doppler. J. Ultrasound Med. 29, 1017-1022.

Souza, C. A. S., Dos Santos Dias, L. A. S., Aguilar, M. A. G., Aguilar, S. S., Oliveira, J., Costa, J. L. A., 2009. Cacao yield in different planting densities. Braz. Arch. Biol. Technol. 52,1313-1320.

Spangenberg, J. E., Dionisi, F., 2001. Characterization of cocoa butter and cocoa butter equivalents by bulk and molecular carbon isotope analyses : Implications for vegetable fat quantification in chocolate. J. Agric. Food Chem.49, 4271-4277.

Spencer, J. P., Vafeiadou, K., Williams, R. J., Vauzour, D., 2012. Neuroinflammation : Modulation by flavonoids and mechanisms of action. Mol. Aspects Med. 33, 83-97.

Spencer, J.P., Schroeter, H., Shenoy, B., Srai, S.K., Debnam, E.S., Rice-Evans, C., 2001. Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. Biochem Biophys Res Commun. 285, 588-593.

Spencer, M.E., Hodge, R., 1992. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of Theobroma cacao. Planta. 186, 567-576.

Srikanth, R.K., Shashikiran, N.D., Subba Reddy, V.V., 2008. Chocolate mouth rinse : Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent. 26, 67-70.

Stahl, W., 2011. Flavonoid-rich nutrients for the skin. Nutrition for Healthy Skin 2, 85-90.

Standl, E., 2005. Aetiology and consequences of the metabolic syndrome. European Heart Journal Supplements. D10-D13.

Stark, T., Bareuther, S., Hofmann, T., 2005. Sensory-guided decomposition of roasted cocoa Nibs (Theobroma cacao) and structure determination of taste-active polyphenols. J. Agric. Food Chem. 53, 5407-5418.

Steinberg, F.M., bearden, M.M., keen, I. C., 2003. Cocoa and chocolate flavonoids : implications for cardiovascular health. J. Acad. Nutr. Diet.103, 215-223.

Steinberg, F.M., Holt, R.R., Schmitz, H.H., Keen, C.L., 2002. Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. J. Nutr. Biochem.13, 645-652.

Stern, M.P., Williams, K., González-Villalpando, C., Hunt, K.J., Haffner, S.M., 2004. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease ? Diabetes Care. 27, 2676-2681.

Stoupi, S., Williamson, G., Drynan, J.W., Barron, D., Clifford, M.N., 2010. A comparison of the in vitro biotransformation of (−) -epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. Mol. Nutr. Food Res. 54, 747-759.

Strata, K.M., Rowley IV, T.J., Smithson, A.T., Tessem, J.S., 2016. Mechanisms by which cocoa flavanols improve metabolic syndrome and related disorders. J. Nutr. Biochem. 35, 1-21.

Strata, M.K., Rowley IV, T.M., Smithsonc, A.T., Tessem, J.S., Hulver, M.W., Liua, D., Davya, B. M., Davya, K.P., Neilsonc, P.A., 2016. Mechanisms by which cocoa flavanols improve metabolic syndrome and related disorders. J. Nutr. Biochem. 35, 1-21.

Summa, C., McCourt, J., Cammerer, B., Fiala, A., 2008. Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effects of cocoa bean Maillard reaction products with degree of roasting. Mol. Nutr. Food Res. 52, 342-351.

Summa, C., Raposo, F. C., Mc Court, J., Lo Scalzo, R., Wagner, K. H., Elmadfa, I., Anklam, E., 2006. Effect of roasting on the radical scavenging of cocoa beans. Eur. Food Res. Technol. 222, 368-375.

Sung, N-Y., Yang, M.S., Song, D.S., 2013. The procyanidintrimer C1induces macrophage activation via NF-κB and MAPK pathways, leading to Th1 polarization in murine splenocytes. Eur. J. Pharmacol. 714, 218-228.

Sung, N-Y., Yang, M-S., Song, D-S., Byun, E-B., Kim, J-K., Park, J-H., Song, B-S, Lee, J-W., Park, S-H., Park, H-J., Byun, M-W., Byun, E-H, Kim, J-H., 2013. The procyanidin trimer C1 induces macrophage activation via NF-κB and MAPK pathways, leading to Th1 polarization in murine splenocytes. Int Immunopharmacol. 15, 450-456

Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., 2007. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide : A randomized controlled trial. JAMA. 298, 49-60.

The Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology, and Metabolism Diabetes Trials Unit (OCDEMDTU), 2003. UKPDS Risk Engine. Available at : http: // www.dtu.ox.ac.uk/riskengine.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) 2002. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation., 106, 3143.

Tholstrup, T., Marckmann, P., Jespersen, J., Sandstrom, B., 1994. Fat high in stearic acid favourably affects bloodlipids and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauric acids. Am. J. Clin. Nutr. 59, 371-377.

Toft-Nielsen, M.B., Damholt, M.B., Madsbad, S., Hilsted, L.M., Hughe, T.E., Michelsen, B.K., 2001. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 3717-3723.

Tokede, O. A., 2012. "Chocolate consumption and prevalence of metabolic syndrome in the NHLBI Family Heart Study." ESPEN J. 7, e139-e143.

Tomaru, M., Takano, H., Osakabe, N., 2007. Dietary supplementation with cocoa liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. Nutrition. 23, 351-355.

Tomas-Barberan F. A., 2012. Types, food sources, consumption and bioavailability of dietary polyphenols nutrinsight. In Proceedings of the Symposium 11th Nutrition Conference, Kraft Foods.

Tomas-Barberan, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marin, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerda, B., Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Ibarra, A., Pasamar, M. A.,

Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J.G., 2001. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. N. Engl. J. Med. 344, 1343-50.

Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G.R., Kwik-Uribe, C., Spencer, J.P., 2011. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. Am. J. Clin. Nutr. 93, 62-72.

Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G.G., George, T., Leonczak, J., Gibson, G.R., 2008. Flavanol monomer-induced changes to the humanfaecal microflora. Brit. J. Nutr. 99, 782-92.

Urpi-Sarda, M., Llorach, R., Khan, N., Monagas, M., Rotches-Ribalta, M., Lamuela-Raventos, R., Estruch, R., Tinahones, F. J., Andres-Lacueva, C., 2010. Effect of milk on the urinary excretion of microbial phenolic acids after cocoa powder consumption in humans. J. Agric. Food Chem. 58, 4706-4711.

Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Llorach, R., Lamuela-Raventos, R.M., Jauregui, O., Estruch, R., Izquierdo-Pulido, M., Andres-Lacueva, C., 2009. Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1216, 7258-7267.

Van Dam, R. M., 2013. "Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings." Curr. Opin. Lipidol. 24, 25-33.

Van Duynhoven, J., Vaughan, E.E., Jacobs, D.M., Kemperman, R.A., van Velzen, E.J., Gross, G., Roger, L.C., Possemiers, S., Smilde, A.K., Dore, J., 2011. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 4531-4538.

Vaskonen, T., 2003. Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. J Nutr. Biochem.14, 492-506.

Vazquez-prieto, M. A., Bettaieb, A., Haj, F. G., Fraga, C. G., 2012. (-) -Epicatechin prevents TNFa-induced activation of signaling cascades involved in inflammation and insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. Arch. Biochem. Biophys. 527, 113-118.

Vickers, M.H., Breier, B.H., McCarthy, D., Gluckman, P.D., 2003. Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. Am. J. Physiol. Regul. Integ.r Comp. Physiol. 285, 271-273.

Vinson, J.A., Proch, J., Bose, P., 2006. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. J. Agric. Food Chem., 54, 8071-8076.

Visioli, F., Bernaert, H., Corti, R., Ferri, C., Heptinstall, S., Molinari, E., Poli, A., Serafini, M., Smit, H. J., Vinson, J. A., Violi, F., Paoletti, R., 2009. Chocolate and Health: A Brief Review of the Evidence. In Chocolate anf Health. 63-75.

Vita, J.A., 2005. Endothelial function and clinical outcome. Heart. 91, 1278-1279.
Voigt J, Biehl B, Kamaruddin S., 1993. The major seed proteins of Theobroma cacao L. Food Chem. 47, 145-151.

Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Kamaruddin, S., Marsoner, G.G., Hugi, A., 1994. In-vitro formation of cocoa-speci fi c aroma precursors : aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. Food Chem. 49, 173-180.

Walters, M.R., Williamson, C., Lunn, K., Munteanu, K., 2012. Acute effects of chocolate ingestion on cerebral vasculature. 13-31.

Wan, Y., Vinson, J.A., Etherton, T.D., 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. Am. J. Clin. Nutr. 74, 596-602.

Wang, J.F., Schramm, D.D., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Fraga, C.G., Schmitz, H.H., Keen, C.L., 2000. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. J. Nutr. 130, 2115 - 2119.

Watanabe, N., Inagawa, K., Shibata., 2014. "Flavan-3-ol fraction from cocoa powder promotes mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in mice." Lipids Health Dis. 13, 1-8.

Weisburger J.H., 2001. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. Exp. Biol. Med. 226, 891-897.

Williamson G., 2013. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. Mol. Nutr. Food Res. 57, 48-57.

Wollgast, J., Anklam, E., 2000. Review on polyphenols in theobroma cacao : changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Res. Int. 33, 423-447.

Wood, G.A.R., Lass, R.A., 2001. Cacao. 4th edn. Blackwell, Oxford, 620.
World Health Organization (WHO/OMS), 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO consultation. Geneva : World Health Organization.

Yakala, G. K., 2013. "Effects of chocolate supplementation on metabolic and cardiovascular parameters in ApoE3L mice fed a high-cholesterol atherogenic diet." Mol. Nutr. Food Res. 57, 2039-2048.

Yamashita, Y., Okabe, M., Natsume, M., Ashida, H., 2012. Cacao liquor procyanidin extract improves glucose tolerance by enhancing GLUT4 translocation and glucose uptake in skeletal muscle. J. Nutr. Sci.1, 1- 9.

Yaney, G.C., Corkey, B.E., 2003. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. Diabetologia. 46, 1297-12312.

Yasuda, A., Natsumea, M., Sasakia, K., Babaa, S., Nakamuraa, Y., Kanegaea, M., Nagaoka, S., 2008. Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet. Ios Press. 33, 211-223.

Yasuda, A., Takano, H., Osakabe, N., 2008. Cocoa liquor proanthocyanidins inhibit lung injury induced by diesel exhaust particles. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 21, 279-288.

Yasuda, A., Natsume, M., Osakabe, N., Kawahata, K., Koga, J., 2011. "Cacao polyphenols influence the regulation of apolipoprotein in HepG2 and Caco2 cells." J. Agric. Food Chem. 59, 1470-1476.

Yilmazer-Musa M, Griffith AM, Michels AJ, Schneider E, Frei B., 2012. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of alpha-amylase and alpha glucosidase activity. J. Agric. Food Chem. 60, 8924-8929.

Zak, D.L., Keeney, P.G., 1976. Extraction and fractionation of cocoa proteins as applied to several varieties of cocoa beans. J. Agric. Food Chem. 24, 479-83.

Zanotti, I., Asta M.D., Mena, P., Mele, L., Bruni, R., Ray, S., Del Rio D., 2015. "Atheroprotective effects of polyphenols: a focus on cell cholesterol metabolism." Food Fonct. 6, 13-31.

Zhang, W., Liu, H., Xie, K., Yin, L., 2006. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8) -epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 345, 508-515.

Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature. 414, 782-87.

Zimmet, P., Shaw, J., Alberti, K.G., 2003. Preventing Type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view. Diabet Med. 20, 693-702.

Zomer, E., 2012. "The effectiveness and cost effectiveness of dark chocolate consumption as prevention therapy in people at high risk of cardiovascular disease: best case scenario analysis using a Markov model." BMJ. 344, 1-10.