

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives - IPHC  
Centre européen d'étude du Diabète**

**THÈSE** présentée par :  
**Remmelt VAN DER WERF**

Soutenue le : **18 décembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie/Chimie analytique

**Evaluation du pouvoir anti-oxydant des  
aliments. Recherche de leurs effets  
modulateurs sur le stress oxydant dans  
le cas du diabète.**

**THÈSE dirigée par :**

**M. Eric Marchioni**

**Mme. Séverine Sigrist**

Professeur, université de Strasbourg

HDR, Centre Européen d'Etude du Diabète

**RAPPORTEURS :**

**M. Bruno Le Bizec**

**M. Jean-Max Rouanet**

Professeur, Oniris-Nantes

MCF, Université de Montpellier II

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme. Catherine Renard**

**M. Emmanuel Andès**

HDR, INRA-Avignon

Professeur, Université de Strasbourg





# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Eric Marchioni et le Dr. Séverine Sigrist pour avoir dirigé mon travail de thèse, et pour s'être toujours rendus disponibles pour me guider et me conseiller afin de mener à bien ce projet de recherche tout au long de ces 3 années. Merci de m'avoir poussé quand je n'y croyais plus et de m'avoir fait confiance.

Merci à Christelle Roy et Michel Pinget pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, respectivement au sein de l'IPHC et du CEED.

Je remercie l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail : le Pr. Bruno Le Bizec, le Dr. Jean-Max Rouanet, le Dr. Catherine Renard et le Pr. Emmanuel Andrès.

Le projet EVA rassemble différents acteurs, avec en première ligne l'Interprofession des Fruits et Légumes d'Alsace (IFLA), porteur du projet, que je tiens à remercier vivement, en particulier Fabien Digel et Sarah Eberhardt, qui nous ont permis de relier le monde agricole à celui de la recherche.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel d'AERIAL, et plus particulièrement le Dr. Dalal Werner-Aoude et le Dr. Julie Legrandois, membres actifs du projet EVA, maîtres de la lyophilisation et de l'extraction, qui ont toujours su orienter mes recherches de manière pertinente.

Merci également à Saïd qui, au travers des diverses réunions a toujours apporté un regard critique pertinent et constructif à mon travail.

Je tiens enfin à remercier la Région Alsace, première à croire au projet EVA, qui nous a soutenu et qui a permis de le réaliser.

Je n'oublie pas non plus le Dr. Daniele Dondi et le Pr. Armando Buttafava de l'université de Pavie qui nous ont accueillis et assisté pour les expériences en spectrométrie RPE.

Je remercie vivement Minjie, Françoise, Martine, Christophe, Diane et Sonia qui ont toujours été présents pour m'aider à avancer au travers de discussions toujours pertinentes. Merci à tous les « anciens » doctorants de l'équipe de chimie analytique des molécules bio-actives, Omar, Erwan, Eli, Céline, Michel et Li qui m'ont accueilli avec enthousiasme et qui m'ont permis d'être rapidement à l'aise au sein de la bande. Je remercie particulièrement Etienne, qui m'a tout appris de l'art de la chimie analytique au tournevis. Merci à Mathieu et Flavio pour m'avoir soutenu ces derniers mois, et bon courage à vous. Et bien sûr, merci à Myriam, qui a toujours su donner une touche d'humour et de bonne humeur au quotidien.



Un grand merci à l'ensemble du personnel du CEED. Elisa, Allan, merci pour votre soutien. Stéphanie, merci pour tout. Ton aide et ton soutien sans faille m'ont été plus qu'indispensables pour réaliser ce travail. William, Elodie S. et Harzo, merci pour votre aide et implication dans les manip, sans oublier votre soutien. Carole du 6-7 (oui, il faut que ce nom perdure !) merci pour tout, et surtout pour la vaisselle ;- ). Claude, merci pour ton éternel enthousiasme et ta bonne humeur. Nathalie, merci pour tes encouragements et petits conseils bureautiques.

Je remercie également Kevin, mon premier « chef des doctorants » maître des bioblagues. Pauline, merci d'avoir partagé ces durs mois de rédaction avec moi et de m'avoir divertit quotidiennement avec tes craquages tout au long de cet été 2013. Doudou (prochain chef des doctorants), Aïda, Anaïs, Elodie C. (oui je te range déjà avec les doctorants) merci à vous pour votre soutien et surtout bon courage à vous trois pour ces prochaines années qui seront tout sauf une longue ligne droite comme beaucoup le prétendent. Merci aussi aux stagiaires EVA aussi bien sur : Iona, Catherine et Aurélien.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Defymed : Richard, Charles-Thibault et Jordan.

Je remercie également l'ensemble de l'Asdia (Carine, Thierry Mignot, Claude Seyller et tous les autres).

Enfin, je remercie évidemment aussi ma famille que je n'ai pas beaucoup vue ces dernières années. Je n'ai cependant jamais douté de leur soutien, ce qui m'a permis de toujours aller de l'avant. Merci encore à tous mes amis, et ceux que j'aurais malheureusement oublié.

Et je terminerais bien sûr par remercier Anne-Laure qui m'a accompagné tout au long de cette aventure et de ma vie.

# SOMMAIRE

---

SOMMAIRE .....	1
LISTE DES FIGURES .....	6
LISTES DES TABLEAUX.....	13
1 Introduction .....	16
1.1 Introduction générale.....	18
1.2 L'oxydation biologique .....	19
1.3 Les espèces oxydantes hautement réactives .....	19
1.4 Sources des espèces réactives et radicaux libres .....	20
1.5 Les défenses anti-oxydantes .....	22
1.5.1 Défenses endogènes .....	23
1.5.2 Les défenses anti-oxydantes exogènes .....	25
1.5.2.1 Les anti-oxydants naturels .....	26
1.5.2.1.1 Vitamines et Caroténoïdes.....	26
1.5.2.1.1.1 Les vitamines .....	26
1.5.2.1.2 Les polyphénols .....	30
1.5.2.1.2.1 Les flavonoïdes.....	34
1.5.2.1.2.2 Les lignanes .....	38
1.5.2.1.2.3 Les acides phénoliques .....	39
1.5.2.1.2.4 Les stilbènes .....	40
1.5.2.1.2.5 Tannins .....	41
1.5.2.1.2.6 Autres polyphénols .....	42
1.5.2.2 Phospholipides .....	42
1.5.2.3 Acides aminés et peptides .....	42
1.5.2.4 Les oligo-éléments .....	43
1.5.2.5 Autres anti-oxydants ou modes d'action.....	43
1.5.2.6 Anti-oxydants de synthèse .....	43
1.5.3 Sources en anti-oxydants naturels dans l'alimentation .....	44
1.5.4 Alimentation et biodisponibilité des anti-oxydants naturels .....	46
1.5.5 Processus de transformation et potentiel anti-oxydant des aliments.....	48
1.6 Méthodes d'étude du potentiel anti-radicalaire des composés naturels .....	49
1.7 Homéostasie redox physiologique .....	52

1.8	Stress oxydant .....	53
1.9	Régulation de la glycémie et diabète.....	54
1.9.1	La régulation physiologique de la glycémie .....	54
1.9.2	Le diabète : définition et épidémiologie.....	55
1.9.3	Physiopathologie et développement du diabète de type 2.....	58
1.9.4	Stress oxydant et diabète de type 2 .....	59
1.9.4.1	Production de ROS par la chaîne respiratoire induite par l'hyperglycémie	60
1.9.4.2	La voie des polyols .....	61
1.9.4.3	La voie des hexosamines .....	62
1.9.4.4	La voie des protéines kinase C.....	63
1.9.5	Cibles biologiques des réactions oxydatives .....	64
1.9.5.1	La formation des produits avancés de glycation (AGEs) .....	64
1.9.5.2	Hyperinsulinisme et stress oxydant .....	67
1.9.6	Prévention du diabète de type 2 et de ses complications .....	67
1.9.6.1	Mesures hygiéno-diététiques (MHD) .....	68
1.9.6.2	Anti-diabétiques oraux (ADO) .....	68
1.9.7	Prévention du stress oxydant par les anti-oxydants d'origine naturelle.....	69
1.9.7.1	Effet d'une supplémentation de vitamine E sur l'incidence et les conséquences du diabète de type 2.....	69
1.9.7.2	Les fruits et légumes et le diabète de type 2 .....	70
1.9.7.3	Etudes in vivo du potentiel préventif des fruits et légumes vis-à-vis du diabète et du stress oxydant sur un modèle animal .....	71
1.10	Objectifs des travaux de thèse .....	74
2	Démarche expérimentale .....	76
3	Matériels et méthodes .....	80
3.1	Etude du potentiel anti-radicalaire des aliments .....	81
3.1.1	Matières premières – préparation des échantillons .....	81
3.1.1.1	Le café.....	81
3.1.1.2	Les fruits et légumes d'Alsace .....	81
3.1.2	Etude de l'activité anti-radicalaire au sein d'un échantillon naturel.....	84
3.1.2.1	ORAC .....	84
3.1.2.2	TEAC .....	85
3.1.2.2.1	Méthode TEAC en microplaques .....	86
3.1.2.2.2	Détection et mesure de l'activité anti-radicalaire au niveau moléculaire (HPLC-AOx).....	87
3.1.2.2.2.1	Essais de couplage HPLC-RPE .....	88
3.1.2.2.2.2	Analyse des composés anti-oxydants des extraits de café.....	89

3.1.2.2.2.3	Analyse des composés anti-oxydants des fruits et légumes .....	90
3.1.2.2.2.3.1	Etude des extraits polaires dé-sucrés (EPDS) .....	91
3.1.2.2.2.3.2	Etude des extraits gras (EG).....	91
3.1.3	Purification et identification des composés anti-oxydants .....	92
3.1.3.1	Identification des molécules anti-oxydantes du café .....	92
3.1.3.2	Identification des molécules d'intérêt des EPDS des fruits et légumes.....	93
3.2	Etude de la bio-activité des extraits de fruits et légumes d'alsace - Etude <i>in vitro</i> ..	94
3.2.1	Culture cellulaire des RINm5F .....	94
3.2.2	Etude de l'effet des extraits polaires dé-sucrés sur la viabilité cellulaire – Cell Titer.....	94
3.2.3	Etude de l'effet protecteur des extraits polaires dé-sucrés vis-à-vis d'un stress oxydant induit.....	95
3.2.3.1	Activité anti-oxydante cellulaire (CAA).....	95
3.2.3.2	Observations microscopiques .....	96
3.2.3.2.1	Les ROS au niveau cellulaire – DHE .....	96
3.2.3.2.2	Observation du potentiel protecteur des EPDS vis-à-vis d'un stress oxydant induit par un hyperinsulinisme <i>in vitro</i> (DCFH-DA).....	97
3.2.3.3	Effets des extraits sur l'expression des enzymes endogènes anti- et pro-oxydantes .....	97
3.2.4	Etude de la bio-activité des fruits et légumes d'alsace – Etude <i>in vivo</i> .....	98
3.2.4.1	Modèle de diabète de type 2 induit par une approche alimentaire – High Fat High Fructose (HFHF) .....	99
3.2.4.2	Etude des effets modulateurs d'une supplémentation de l'alimentation en fruits ou légumes sur le stress oxydant et ses complications (ex de la cerise et du chou rouge) .....	99
3.2.4.2.1	Protocole EVA.....	99
3.2.4.2.1.1	Approche nutraceutique.....	99
3.2.4.2.1.2	Approche hygiéno-diététique .....	100
3.2.4.3	Suivi des paramètres métaboliques et physiques .....	101
3.2.4.3.1	Glycémie (lecteur et RTU) .....	101
3.2.4.3.2	Tolérance au glucose et insulino-sécrétion.....	102
3.2.4.3.3	Evaluation de la leptinémie .....	102
3.2.4.3.4	Etude des paramètres oxydatifs plasmatiques .....	102
3.2.4.4	Etude histologique .....	103
3.2.4.4.1	Sacrifice – Prélèvement et congélation des organes.....	103
3.2.4.4.2	Coupes d'organes au Cryostat .....	104
3.2.4.4.3	Visualisation du glycogène hépatique .....	104
3.2.4.4.4	Coloration à l'Hématoxyline/Eosine (HE) .....	104
3.2.4.4.5	Coloration au Red Oil O et au Trichrome de Masson .....	104

3.2.4.4.6	<i>Etude du stress oxydant tissulaire</i> .....	104
4	Résultats et discussions .....	106
4.1	Mise au point des paramètres de réaction post-colonne du système HPLC-AOx .	107
4.2	Essais de couplage HPLC-AOx(UV-RPE) .....	108
4.3	Etude de l'impact du processus de torréfaction sur les anti-oxydants du café.....	113
4.4	Résultats du projet EVA.....	126
4.4.1	Etude de la chimie anti-oxydante des aliments .....	126
4.4.1.1	Rendements de lyophilisation/extractions .....	126
4.4.1.2	Potentiel anti-oxydant global des extraits de fruits et légumes.....	127
4.4.1.2.1	Les extraits gras .....	127
4.4.1.2.2	Les extraits apolaires dégraissés (EADG).....	129
4.4.1.2.3	Les extraits polaires désucrés .....	131
4.4.1.2.4	Discussion.....	133
4.4.1.3	Evaluation du pouvoir anti-radicalaire des fruits et légumes au niveau moléculaire .....	136
4.4.1.3.1	EPDS .....	136
4.4.1.3.1.1	Mise au point de la méthode séparative.....	136
4.4.1.3.1.2	Analyse de composés anti-oxydants des EPDS des fruits et légumes .....	140
4.4.1.3.2	Extraits gras (EG) .....	156
4.4.1.3.2.1	Adaptation de la méthode HPLC-AOx aux EG.....	156
4.4.1.3.2.2	Analyse des composés anti-oxydants des extraits gras des fruits et légumes .....	157
4.4.1.4	Discussion .....	163
4.4.2	Potentiel anti-oxydant au niveau biologique ( <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ).....	167
4.4.2.1	Etude <i>in vitro</i> .....	167
4.4.2.1.1	Modèle de stress hyperinsulinique .....	167
4.4.2.1.2	Activité anti-oxydante cellulaire – CAA .....	168
4.4.2.1.3	Observations microscopiques (DHE ; DCFH-DA) .....	171
4.4.2.1.4	Expression des enzymes pro- et anti-oxydantes (WB : CAT ; SOD ; p22) .....	174
4.4.2.1.5	Discussion.....	179
4.4.2.2	Etude <i>in vivo</i> .....	183
4.4.2.2.1	Modèle High Fat High Fructose .....	183
4.4.2.2.1.1	Impact du régime HFHF sur le poids et la leptinémie.....	183
4.4.2.2.1.2	Impact du régime HFHF sur la régulation glycémique, la tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline.....	184
4.4.2.2.1.3	Impact du régime HFHF sur le stress oxydant .....	187

4.4.2.2.1.4	Discussion.....	190
4.4.2.2.2	Protocole EVA.....	191
4.4.2.2.2.1	Approche Nutraceutique.....	191
4.4.2.2.2.1.1	Impact sur le poids et la leptinémie .....	191
4.4.2.2.2.1.2	Impact sur la régulation glycémique ; tolérance au glucose et sécrétion d'insuline .....	193
4.4.2.2.2.1.3	Impact sur le stress oxydant.....	196
4.4.2.2.2.1.4	Observation histologiques.....	201
4.4.2.2.2.1.5	Discussion .....	201
4.4.2.2.2.2	Approche Hygiéno-diététique.....	204
4.4.2.2.2.2.1	Impact sur le poids et la leptinémie .....	205
4.4.2.2.2.2.2	Impact sur la régulation glycémique, la tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline .....	207
4.4.2.2.2.2.3	Impact sur le stress oxydant.....	210
4.4.2.2.2.2.4	Observations histologiques .....	215
4.4.2.2.2.2.5	Discussion .....	216
5	Conclusions et perspectives.....	220
6	Références bibliographiques.....	226

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1-1 : Fuite d'électrons source de ROS au sein de la chaîne de transport d'électrons ...	21
Figure 1-2 : La réaction de Fenton .....	21
Figure 1-3 : La réaction de Haber-Weiss .....	22
Figure 1-4 : Les différents niveaux de mécanismes anti-oxydants .....	23
Figure 1-5 : Les enzymes anti-oxydants .....	23
Figure 1-6 : Mécanisme enzymatique de la SOD .....	24
Figure 1-7 : Mécanisme enzymatique de la CAT .....	24
Figure 1-8 : Mécanisme enzymatique de la GPx .....	25
Figure 1-9 : Vitamines anti-oxydantes .....	27
Figure 1-10 : Cycle de la vitamine E et de la vitamine C .....	28
Figure 1-11 : Unité isoprène.....	29
Figure 1-12 : Exemples des principaux caroténoïdes.....	30
Figure 1-13 : Quenching physique de l'oxygène singulet par les caroténoïdes.....	30
Figure 1-14 : Voie de biosynthèse des principaux polyphénols.....	32
Figure 1-15 : Principe des réactions anti-radicalaires .....	33
Figure 1-16 : Mécanisme proposé de l'oxydation des polyphénols par le mécanisme HAT...	34
Figure 1-17 : Squelette des flavonoïdes .....	35
Figure 1-18 : Les flavanols.....	35
Figure 1-19 : Exemples de flavanols.....	35
Figure 1-20 : Les isoflavones et néoflavonoïdes.....	36
Figure 1-21 : Structure générale des flavonols, flavononols, flavanones et flavones.....	36
Figure 1-22 : Les anthocyanes .....	37
Figure 1-23 : Exemple de procyanidine (B2).....	38
Figure 1-24 : Les chalcones et dihydrochalcones .....	38
Figure 1-25 : Squelette des lignanes .....	39
Figure 1-26 : Exemples de lignanes .....	39
Figure 1-27 : Les acides phénoliques .....	40
Figure 1-28 : Exemples d'acides phénoliques.....	40
Figure 1-29 : Monomère 1,2-diphényl-éthylène (sous-unité de constitution des stilbènes) ....	40

Figure 1-30 : Le resvératrol.....	41
Figure 1-31 : L'acide tannique .....	41
Figure 1-32 : Exemple : phosphatidylcholine .....	42
Figure 1-33 : Exemples d'antioxydants de synthèse.....	44
Figure 1-34 : La curcumine .....	50
Figure 1-35 : Oxydation compétitive entre une sonde (PH) et un anti-oxydant par des radicaux peroxyles .....	51
Figure 1-36 : Principe des méthodes ET .....	51
Figure 1-37 : Trolox .....	51
Figure 1-38 : Le stress oxydant .....	53
Figure 1-39 : La place centrale du stress oxydant au sein des pathologies .....	54
Figure 1-40 : La régulation glycémique .....	55
Figure 1-41 : La prévalence du diabète dans le monde (%).....	57
Figure 1-42 : Obésité, insulino-résistance et hyperglycémie .....	58
Figure 1-43 : Les principales voies génératrices de complications diabétiques .....	60
Figure 1-44 : Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire .....	61
Figure 1-45 : Voie des polyols .....	62
Figure 1-46 : Voie des hexosamines .....	63
Figure 1-47 : Stimulation des voies cataboliques annexes de la glycolyse par l'hyperglycémie .....	64
Figure 1-48 : Production des AGEs et conséquences cellulaires .....	65
Figure 1-49 : Peroxydation lipidique .....	66
Figure 1-50 : Cibles des ROS.....	67
Figure 2-1 : Objectifs du projet EVA.....	78
Figure 3-1 : Méthode de préparation des échantillons .....	83
Figure 3-2 : Principe de mesure de l'activité anti-oxydante par ORAC .....	84
Figure 3-3 : Génération du radical cation de l'ABTS .....	85
Figure 3-4 : Spectre UV-Visible de l'ABTS <sup>•+</sup> .....	86
Figure 3-5 : Montage du couplage HPLC-AOx .....	88
Figure 3-6 : Principe de la méthode de mesure de la capacité anti-oxydante cellulaire .....	95
Figure 3-7 : Etude des effets d'une démarche nutraceutique vis-à-vis de la progression du syndrome métabolique et du stress oxydant.....	100
Figure 3-8 : Etude des effets d'une démarche hygiéno-diététique vis-à-vis du syndrome métabolique et du stress oxydant. ....	101



Figure 3-9 : Principe du dosage du glucose plasmatique par méthode RTU .....	102
Figure 3-10 : Principe du dosage du MDA .....	103
Figure 4-1 : Mesure de l'amplitude du signal RPE .....	109
Figure 4-2 : Profil chromatographique HPLC-UV-AOx(UV+ESR) d'un mélange équimolaire (0,2 mmol/L) de 14 molécules standards .....	110
Figure 4-3 : Gammes étalon de l'activité anti-radicalaire de l'acide gallique et de l'acide caftarique mesuré par HPLC-AOx (RPE) .....	111
Figure 4-4 : Profil chromatographique HPLC-UV-AOX(ESR) de l'EPDS de chou rouge...	112
Figure 4-5 : Montage du couplage HPLC-AOx(RPE) – réaction de Fenton .....	113
Figure 4-6 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait de café vert (Extrait dilué 5x).....	114
Figure 4-7 : Structure chimique des molécules anti-oxydantes du café vert .....	115
Figure 4-8 : Evolution de la capacité anti-oxydante du café due aux 6 polyphénols natifs pendant le processus de torréfaction .....	117
Figure 4-9 : Chromatogramme HPLC-AOx d'un extrait de café torréfié à 225 °C pendant 25 minutes (extrait concentré 4x).....	118
Figure 4-10 : Structure chimique de plusieurs composés néoformés pendant la torréfaction	120
Figure 4-11 : Evolution du profil anti-oxydant dû aux molécules néoformées pendant la torréfaction .....	121
Figure 4-12 : Evolution du pouvoir anti-oxydant total au cours du processus de torréfaction – comparaison de deux méthodes.....	122
Figure 4-13 : Hypothèse des mécanismes réactionnels provoqués par le processus de torréfaction .....	123
Figure 4-14 : Capacité anti-oxydante des extraits gras de fruits et légumes.....	128
Figure 4-15 : Capacité anti-oxydante due à l'extrait gras d'une portion de 100 g de fruits ou de légumes.....	129
Figure 4-16 : Capacité anti-oxydante des extraits apolaires dégraissés des fruits et légumes	130
Figure 4-17 : Capacité anti-oxydante due à l'extrait apolaire dégraissé d'une portion de 100 g de fruits ou de légumes.....	131
Figure 4-18 : Activité anti-oxydante des extraits polaires désués des fruits et légumes.....	132
Figure 4-19 : Capacité anti-oxydante due à l'extrait polaire désués d'une portion de 100 g de fruits ou de légumes .....	133
Figure 4-20 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18 (0,1 % acide formique) - (EPDS cerise).....	136

Figure 4-21 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase XDB-phenyl (0,1 % acide formique) - (EPDS cerise).....	137
Figure 4-22 Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18-PFP (0,1 % acide formique) – (EPDS cerise).....	137
Figure 4-23 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18-PFP (1 % acide formique) - (EPDS cerise).....	138
Figure 4-24 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18-PFP – (2% acide formique) - (EPDS cerise).....	138
Figure 4-25 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18-PFP (0,1 % acide trifluoroacétique) - (EPDS cerise).....	139
Figure 4-26 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de chou rouge .....	141
Figure 4-27 : Exemple de schéma de fragmentation des anti-oxydants polyphénoliques du chou rouge.....	142
Figure 4-28 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de cerise (var. Regina) .....	144
Figure 4-29 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre d'oignon .....	146
Figure 4-30 : Hypothèses structurales de deux polyphénols de l'oignon – et capacité anti-radicalaire .....	147
Figure 4-31 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de coing .....	148
Figure 4-32 : Spectre de masse du pic élué à 24,1 min (ESI mode (-) ; EPDS de coing).....	149
Figure 4-33 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de tomate .....	150
Figure 4-34 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de fraise (var. Florence).....	151
Figure 4-35 : Chromatogrammes HPLC-AOx des extraits polaires désucre du radis noir, de la courgette, du céleri-rave, de l'épinard et de l'asperge .....	153
Figure 4-36 : Activité anti-oxydante totale des extraits polaires désucre des fruits et légumes calculée par addition des activités individuelles des molécules évaluée par HPLC-AOx .....	155
Figure 4-37 : Activité anti-oxydante totale due aux extraits polaires désucre pour une portion de 100 g de fruit ou de légume calculée par addition des activités individuelles des molécules évaluée par HPLC-AOx .....	155
Figure 4-38 : Méthode séparative de deux tocophérols .....	156
Figure 4-39 : Profil chromatographique de l'EG de tomate (phase C18) .....	157
Figure 4-40 : Chromatogrammes HPLC-AOx des extraits gras de cerise (var Regina et Folfer), de fraise (var. Florence et Salsa), d'asperge et de tomate.....	159

Figure 4-41 : Chromatogrammes HPLC-AOx des extraits gras de coing, de courgette, de chou rouge, de carotte, de céleri-rave et d'épinard .....	160
Figure 4-42 : Chromatogrammes HPLC-AOx des extraits gras d'oignon et de radis noir ....	161
Figure 4-43 : Activité anti-oxydante totale des extraits gras des fruits et légumes (somme des pics chromatographiques) .....	161
Figure 4-44 : Activité anti-oxydante due aux extraits gras dans une portion de 100 g de fruits ou légumes (somme des pics chromatographiques).....	161
Figure 4-45 : Modèle d'hyperinsulinisme exogène provoquant un stress oxydant.....	168
Figure 4-46 : Activité anti-oxydante cellulaire des EPDS de cerise et de chou rouge sur le modèle RINm5f soumis à un stress hyper-insulinique.....	169
Figure 4-47 : Capacité anti-oxydante cellulaire des fruits et légumes liée à leur extrait polaire désucre.....	171
Figure 4-48 : Observation par microscopie à fluorescence du potentiel anti-oxydant cellulaire des EPDS de fruits et légumes sur le modèle cellulaire des RINm5f soumis à un stress hyper-insulinique (marquage à la DCFH-DA) .....	172
Figure 4-49 : Activité anti-oxydante cellulaire des EPDS de courgette, de carotte, de cerise ou de chou rouge à 50 µg/mL, sur les cellules RINm5f.....	173
Figure 4-50 : Activité anti-oxydante cellulaire des EPDS de carotte, de cerise ou de chou rouge à 300 µg/mL, sur les cellules RINm5f (observations au microscope à fluorescence) .	173
Figure 4-51 : Observation au microscope à fluorescence du potentiel protecteur des EPDS de cerise (var. Regina) vis-à-vis des réactions oxydatives provoqués par le peroxyde d'hydrogène sur le modèle cellulaire des RINm5f.....	174
Figure 4-52 : Capacité anti-oxydante cellulaire de l'EPDS de cerise (var. Regina) vis-à-vis des réactions oxydatives provoqués par le peroxyde d'hydrogène sur le modèle RINm5f .....	174
Figure 4-53 : Modification de l'expression de la SOD, CAT et p22phox par l'EPDS de chou rouge sur le modèle cellulaire RINm5f (soumis au stress hyperinsulinique ou non) .....	176
Figure 4-54 : Modification de l'expression de la SOD, CAT et p22phox par l'EPDS de cerise sur le modèle cellulaire RINm5f (soumis au stress hyperinsulinique ou non).....	178
Figure 4-55 Modification de l'expression de la SOD et de la CAT par l'EPDS de carotte sur le modèle cellulaire RINm5f (soumis au stress hyperinsulinique ou non) .....	179
Figure 4-56 : Evolution du poids des rats en fonction de leur régime alimentaire .....	183
Figure 4-57 : Evolution de la leptinémie des rats en fonction du régime alimentaire .....	184
Figure 4-58 : Evolution de la glycémie à jeun des rats en fonction de leur régime alimentaire .....	185

Figure 4-59 : Evolution de la tolérance au glucose .....	186
Figure 4-60 : Evolution de l'insulino-sécrétion des rats en fonction de leur régime alimentaire .....	186
Figure 4-61 : Evolution de la peroxydation lipidique chez les rats en fonction de leur régime alimentaire .....	187
Figure 4-62 : Observations du stress oxydant tissulaire – coupes histologiques de foie et de pancréas de rats après marquage à la DHE .....	188
Figure 4-63 : Evaluation du stress oxydant tissulaire chez le rat en fonction de leur régime alimentaire .....	188
Figure 4-64 : Observations par microscopie des foies de rats ayant suivi un régime ND ou HFHF – évolution dans le temps .....	189
Figure 4-65 : Evolution de la masse corporelle - effet de l'approche nutraceutique .....	192
Figure 4-66 : Evolution de la leptinémie à jeun - effet de l'approche nutraceutique .....	193
Figure 4-67 : Evolution de la glycémie à jeun - effet de l'approche nutraceutique .....	194
Figure 4-68 : Evolution de la tolérance au glucose - effet de l'approche nutraceutique .....	195
Figure 4-69 : Evolution de la c-peptidémie - effet de l'approche nutraceutique .....	196
Figure 4-70 : Evolution de la peroxydation lipidique - effet de l'approche nutraceutique ....	197
Figure 4-71 : Evolution du stress oxydant hépatique - effet de l'approche nutraceutique .....	198
Figure 4-72 : Evolution du stress oxydant dans le pancréas - effet de l'approche nutraceutique .....	198
Figure 4-73 : Evolution du stress oxydant hépatique - effet de l'approche nutraceutique .....	199
Figure 4-74 : Evolution du stress oxydant dans le pancréas - effet de l'approche nutraceutique .....	200
Figure 4-75 : Histologie hépatique - effet de l'approche nutraceutique .....	201
Figure 4-76 : Evolution de la masse corporelle - effet de l'approche hygiéno-diététique .....	206
Figure 4-77 : Evolution de la leptinémie - effet de l'approche hygiéno-diététique .....	207
Figure 4-78 : Evolution de la glycémie à jeun - effet de l'approche hygiéno-diététique .....	208
Figure 4-79 : Evolution de la tolérance au glucose - effet de l'approche hygiéno-diététique	209
Figure 4-80 : Evolution de la c-peptidémie - effet de l'approche hygiéno-diététique .....	210
Figure 4-81 : Evolution de la peroxydation lipidique - effet de l'approche hygiéno-diététique .....	211
Figure 4-82 : Evolution du stress oxydant hépatique - effet de l'approche hygiéno-diététique .....	212

Figure 4-83 : Evolution du stress oxydant dans le pancréas - effet de l'approche hygiéno-dietétique .....	213
Figure 4-84 : Evolution du stress oxydant hépatique - effet de l'approche hygiéno-dietétique .....	214
Figure 4-85 : Evolution du stress oxydant dans le pancréas - effet de l'approche hygiéno-dietétique .....	215
Figure 4-86 : Histologie hépatique - effet de l'approche hygiéno-dietétique .....	216

# LISTES DES TABLEAUX

---

Tableau 1-1 : Teneurs en composés à potentiel anti-oxydant d'une sélection de fruits et légumes.....	45
Tableau 1-2 : Etudes in vivo des effets bénéfiques des fruits et légumes vis-à-vis du diabète et du stress oxydant. ....	72
Tableau 3-1 : Fruits et légumes étudiés dans le cadre du projet EVA .....	82
Tableau 3-2 : Gradient de phase mobile.....	89
Tableau 3-3 : Gradient de phase mobile pour l'analyse des extraits de café .....	90
Tableau 3-4 : Gradient de phase mobile (EPDS) .....	91
Tableau 3-5 : Gradient de phase mobile (EG).....	91
Tableau 4-1 : Conditions de réaction post-colonne pour l'étude des anti-oxydants du café .	107
Tableau 4-2 : Conditions de réaction post-colonne choisies pour l'étude des anti-oxydants des fruits et légumes .....	108
Tableau 4-3 : Rendements de lyophilisation et d'extraction.....	127
Tableau 4-4 : Composés anti-oxydants du chou rouge .....	142
Tableau 4-5 : Composés anti-oxydants de la cerise (var. Regina).....	144
Tableau 4-6 : Composés anti-oxydants de l'EPDS d'oignon.....	146
Tableau 4-7 : Composés anti-oxydants de l'EPDS de coing .....	148
Tableau 4-8 : Composés anti-oxydants de l'EPDS de tomate .....	150
Tableau 4-9 : Composés anti-oxydants de l'EPDS de fraise (var. Florence).....	152
Tableau 4-10 : Composés anti-oxydants de l'EPDS de carotte .....	152
Tableau 4-11 : Capacité anti-radicalaire des molécules présentes au sein des extraits polaires désués du radis noir, de la courgette, du céleri-rave, de l'épinard et de l'asperge.....	154
Tableau 4-12 : Récapitulatif de la capacité anti-radicalaire mesurée des molécules présentes dans les extraits gras de fruits et légumes .....	162
Tableau 4-13 : Potentiel protecteur des EPDS vis-à-vis d'un stress oxydant induit par un stress hyperinsulinique exogène sur le modèle cellulaire des RINm5f.....	170

# LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>8-OHdG</b> : 8-hydroxydéoxyguanosine	<b>EPDS</b> : extrait polaire désucré
<b>AAPH (ou ABAP)</b> : 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride	<b>ET</b> : electron transfer
<b>ABAM</b> : anti-biotique anti-mycotique	<b>ETFE</b> : éthylène tétrafluoroéthylène
<b>ABTS<sup>•+</sup></b> : 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide)	<b>EVA</b> : Evaluation du pouvoir anti-oxydant des fruits et légumes
<b>AGEs</b> : produits avancés de glycation	<b>F&amp;L</b> : fruits et légumes
<b>AGL</b> : acides gras libres	<b>Fer</b> : Férulique
<b>AMPK</b> : AMP-activated protein kinase	<b>FQA</b> : acide féruloylquinique
<b>AOx</b> : anti-oxydant	<b>FRAP</b> : ferric ion reducing antioxidant power
<b>ARE</b> : antioxidant response element	<b>G-3-P</b> : glycéraldéhyde-3-phosphate
<b>ATCC</b> : American Type Culture Collection	<b>GFAT</b> : glutamine:fructose-6 phosphate aminotransférase
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>Glu</b> : glucoside
<b>BDE</b> : bond dissociation enthalpy	<b>GLUT</b> : transporteur de glucose
<b>BHT</b> : 3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène	<b>GPx</b> : glutathion peroxydase
<b>CAA</b> : cellular anti-oxidant activity	<b>GSH</b> : glutathion réduit
<b>CAT</b> : catalase	<b>GSSG</b> : glutathion oxydé
<b>Cou</b> : coumaroyl	<b>GST</b> : glutathion S-transférase
<b>CQA</b> : acide caféoylquinique	<b>HAT</b> : hydrogen atom transfer
<b>CQL</b> : caféoylquinolactone	<b>HBSS</b> : Hank's Balanced Salt Solution
<b>Cyan</b> : cyanidine	<b>HE</b> : hématoxyline/éosine
<b>DAG</b> : diacylglycérol	<b>HFD</b> : high fat diet
<b>DCdiSuccQA</b> : acide dicaféoyl-disuccinoylquinique	<b>ASE</b> : accelerated solvent extractor)
<b>DCFH-DA</b> : 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate	<b>HFD</b> : high fat diet)
<b>DCQA</b> : acide dicaféoylquinique	<b>HFHF</b> : high fat high fructose
<b>DHA</b> : acide déhydroxyascorbique	<b>HHDP</b> : acide hexahydroxydiphénique
<b>DHE</b> : dihydroéthidine	<b>HPLC</b> : chromatographie liquide de haute performance
<b>DMPO</b> : N-oxyde 5,5-diméthyle-1-pyrroline	<b>HPLC-AOx</b> : HPLC couplé à la détection de capacity anti-radicalaire
<b>DMSO</b> : diméthylsulfoxyde	<b>HTLC</b> : chromatographie liquide de haute température
<b>DPPH</b> : di(phényl)-2,4,6-trinitrophényl)iminoazanium	<b>IP</b> : ionization potential
<b>EADG</b> : extrait apolaire dégraissé	<b>IpGTT</b> : Intraperitoneal glucose tolerance test
<b>EDTA</b> : acide éthylène diamine tétraacétique	<b>Keap</b> : Kelch-like ECH-associated protein
<b>EG</b> : extrait gras	<b>LDL</b> : low density lipoprotein
<b>eNOS</b> : endothelial nitric oxide synthase	<b>LOD</b> : limite de détection
<b>EP</b> : extrait polaire	

**LOQ** : limite de quantification  
**MDA** : malondialdéhyde  
**MeOH** : méthanol  
**MF** : matière fraîche  
**MHD** : mesures hygiéno-diététiques  
**MTT** : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5  
diphényl tétrazolium  
**NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide  
phosphate  
**NAFL** : Non-Alcoholic Fatty Liver  
**NASH** : steatohepatite non alcoolique  
**ND** : normal diet  
**NGF** : nerve growth factor  
**NPH** : Neutral Protamine Hagedorn  
**Nrf** : nuclear respiratory factor 1  
**OCT** : optimal cutting temperature compound  
**OMS** : organisation mondiale de la santé  
**ORAC** : oxygen radical absorbance capacity  
**p22phox** : sous-unité de la NADPH oxydase  
**PAL** : phénylalanine ammonia lyase  
**PAS** : acide periodique de Schiff  
**PBS** : phosphate buffer saline  
**PEEK** : polyéther éther cétone  
**PFM** : pentafluorophényle  
**PG** : gallate de propyle  
**PKC** : protéine kinase C  
**PPAR** : peroxisome proliferator-activated receptor  
**PPO** : polyphénol oxydase  
**PTFE** : polytétrafluoroéthylène  
**RIN** : rat insulinoma  
**RL** : radicaux libres  
**RMN** : résonance magnétique nucléaire  
**RNS** : reactive nitrogen species  
**ROS** : reactive oxygen species  
**RPE** : résonance paramagnétique électronique  
**RPMI** : Roswell Park memorial institute  
**SDH** : sorbitol déshydrogénase  
**Sem.** : semaine  
**Sin** : Sinapoyl  
**SOD** : superoxyde dismutase  
**Soph** : sophoroside  
**SPE** : solid phase extraction  
**STZ** : streptozotocine  
**SU.VI.MAX** : supplémentation en vitamines et  
minéraux anti-oxydants  
**Suc** : Succinoyl  
**SVF** : sérum de veau fœtal  
**TBARS** : thiobarbituric acid reactive substances  
**TEAC** : trolox equivalent antioxidant capacity  
**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor  $\alpha$   
**TRAP** : total reactive antioxidant potential



# 1 Introduction



## 1.1 Introduction générale

L'obésité, le syndrome métabolique, et plus grave encore, le diabète de type 2, marquent depuis plusieurs décennies leur empreinte sur les sociétés modernes. En effet, notre mode de vie s'accompagne bien souvent d'une alimentation déséquilibrée et déstructurée. Nos apports énergétiques sont fréquemment largement au-dessus des besoins réels, mais les apports en micronutriments, pourtant essentiels au maintien d'une bonne santé, sont généralement très inférieurs aux recommandations. A cela s'ajoute la sédentarisation de la population qui favorise encore davantage un développement de l'obésité chronique induisant une résistance accrue à l'insuline pouvant évoluer en diabète. D'ailleurs, les épidémies de diabète et d'obésité semblent suivre la même progression ; ces deux maladies sont intimement liées, à tel point que l'on parle souvent d'une épidémie de "diabésité". Diverses études ont déjà établi un lien entre une forte consommation de fruits et légumes et un risque réduit de développement de nombreuses pathologies comme le cancer, certaines maladies neurodégénératives ou encore le diabète. Nous connaissons en France les slogans comme « manger 5 fruits et légumes par jour » ou encore « manger, bouger », cependant les informations justifiant ces recommandations ne sont pas toujours complètes. En effet, une question principale reste : est-ce que tous les fruits et légumes sont équivalents en termes de bénéfices sur la santé? Il est facile de répondre par la négative, mais nous souhaitons apporter quelques éléments de réponse supplémentaires à ce sujet. Notre objectif dans cette étude était de s'intéresser particulièrement aux propriétés anti-oxydantes des fruits et légumes, qui pourraient représenter un élément de prévention simplement par une alimentation mieux réfléchie.

Le stress oxydant se définit par le déséquilibre entre le système de défense anti-oxydant d'un organisme et les entités pro-oxydantes, en faveur de ces dernières. Ce stress oxydant chronique est impliqué dans la plupart des processus de vieillissement et dans de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies neurodégénératives. Dans le cas d'une obésité ou d'un syndrome métabolique, un déséquilibre oxydatif se met en place et peut participer à la progression de cet état vers un diabète de type 2. Une fois le diabète installé, un stress oxydant chronique persiste et va être à l'origine de nombreuses complications dont principalement des macro- et micro-angiopathies.

C'est dans ce contexte que le projet EVA, soutenu par la Région Alsace, rassemble : l'Interprofession des Fruits et Légumes d'Alsace ; l'Equipe de Chimie Analytique des

Molécules Bio-Actives, le Centre Européen d'Etude du Diabète et AERIAL. L'objet de ce projet est de répondre aux questions suivantes : quels sont les fruits et légumes les plus prometteurs en tant qu'anti-oxydants dans notre alimentation, et quels composés sont responsables des réactions anti-oxydantes? Est-ce qu'un renforcement des défenses anti-oxydantes de l'organisme semble possible par une alimentation orientée sur les fruits et légumes à fort potentiel protecteur ?

## 1.2 L'oxydation biologique

Les réactions d'oxydation ou d'oxydoréduction font référence à un système d'échange d'électrons. En effet, une molécule oxydée aura perdu un électron, au profit de la molécule dite réduite qui aura gagné ce dernier. Dans la nature, ces réactions sont omniprésentes, et bon nombre d'entre elles sont indispensables au bon fonctionnement physiologique des organismes vivants. Par exemple, au sein de la chaîne de transfert d'électrons des cellules eucaryotes, système permettant la production d'énergie sous forme d'ATP impliquant des réactions oxydatives, l'oxygène est le dernier accepteur d'électrons (Pietta, 2000).

Cependant, au sein d'un organisme vivant, ce phénomène d'oxydation doit être contrôlé de manière fine afin de ne pas perturber la fonction naturelle des molécules biologiques. L'oxydation de molécules biologiques au niveau cellulaire peut les rendre inactives, comme certaines protéines par exemple, peut perturber des voies de signalisation inter- et intra-cellulaires, ou peut introduire des erreurs dans le code génétique etc.

Les espèces radicalaires, tout en étant indispensables au bon fonctionnement cellulaire, sont les principaux perturbateurs de cet équilibre, étant donné leur grande réactivité.

## 1.3 Les espèces oxydantes hautement réactives

Les radicaux libres (RL) sont, pour la plupart, de petites molécules dotées d'une très importante réactivité et instabilité liée à la présence d'au moins un électron non apparié sur l'orbitale externe (Halliwell et Gutteridge, 1999). Cet électron non-apparié va chercher à se réappairer au travers d'autres molécules, que l'on qualifiera de cibles oxydables. Les espèces radicalaires provoquant la majorité des dommages au niveau cellulaire sont principalement représentées par les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS), comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) ou encore le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ce sont les entités oxydantes les plus fréquemment produites chez les organismes aérobies, et qui, à de faibles concentrations, servent d'initiateurs ou de

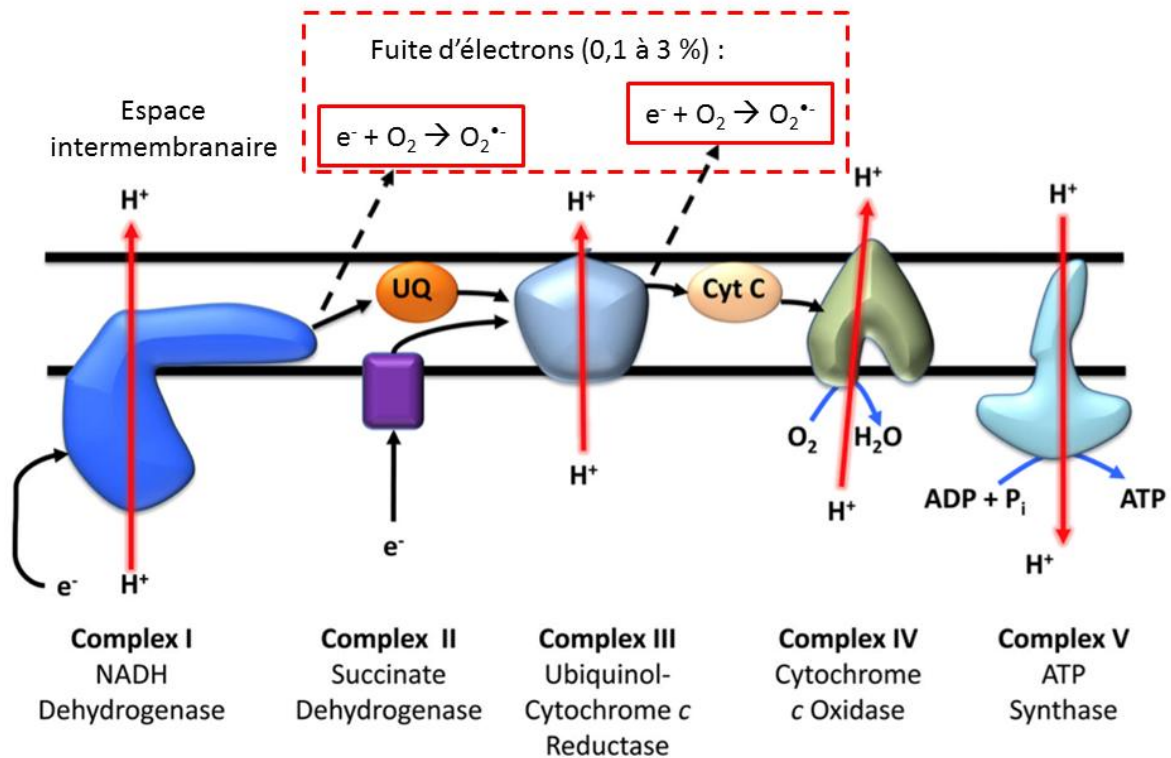
seconds messagers dans diverses voies de signalisation. En effet, ces ROS sont d'importants produits secondaires du métabolisme, et peuvent déclencher d'importants phénomènes de réaction oxydatives en chaîne. D'autres espèces radicalaires sont encore à considérer, à savoir les espèces réactives de l'azote (RNS). Les RNS comme le cation nitrosomium ( $\text{NO}^+$ ), l'anion nitroxyl ( $\text{NO}^-$ ) ou encore le peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) proviennent principalement de l'oxydation enzymatique de l'arginine par l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Palmer et al., 1988).

Du fait de leur haute réactivité, ces radicaux libres ont une demi-vie extrêmement courte pour la plupart, ce qui rend leur détection directe difficile. Ce sont ainsi plutôt des produits secondaires résultant de la réaction de ces RL avec divers substrats qui permettent l'évaluation des dommages oxydatifs liés à la présence d'entités oxydantes hautement réactives.

#### **1.4 Sources des espèces réactives et radicaux libres**

Les ROS peuvent être générées par le métabolisme cellulaire lui-même. En effet, diverses réactions enzymatiques s'accompagnent d'une production de radicaux ou d'espèces réactives, notamment de l'oxygène. L'inflammation par exemple, à travers le « burst oxydatif » (augmentation brutale de la consommation d'oxygène) induisant l'activation de la NAD(P)H oxydase, s'accompagne de la production d'anions super-oxyde. D'autres activités enzymatiques sont également productrices de ROS comme le cytochrome p450, les peroxysomes ou la xanthine oxydase (Rahman, 2007). Par ailleurs, des réactions non-enzymatiques comme celles catalysées par la présence de métaux de transition réduits (le fer par exemple), ou encore la réaction avec la semi-ubiquinone représentent d'importantes sources d'espèces hautement réactives.

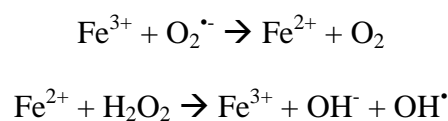
Un élément clé au sein des espèces réactives de l'oxygène est l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , conséquence de la réduction de l'oxygène moléculaire. C'est notamment au sein de la chaîne de transport d'électrons au niveau mitochondrial qu'une partie de l' $\text{O}_2$ , et une partie des électrons, sont détournés de leur chemin habituel, à savoir la réduction d' $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  (Figure 1-1). On dit qu'il y a une fuite d'électrons, qui vont trouver le dioxygène comme accepteur final (Valko et al., 2007). Selon les sources, cette fuite d'électrons représente entre 0,1 et 3% du flux total de la chaîne respiratoire (Beckman et Ames, 1998). Cette production de ROS par la chaîne respiratoire peut encore être amplifiée dans certaines conditions physiologiques comme l'hyperglycémie.



**Figure 1-1 : Fuite d'électrons source de ROS au sein de la chaîne de transport d'électrons**

(D'après Ghoulé et al., 2011)  
 (UQ : Ubiquinone ; Cyt C : Cytochrome C)

L'anion superoxyde va par ailleurs pouvoir être dismuté, réaction qui peut être catalysée par la superoxyde dismutase, ayant pour conséquence la génération de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier n'est pas une espèce radicalaire en tant que telle. Cependant, il provoque de nombreux dégâts oxydatifs. En effet, comme décrit précédemment, le peroxyde d'hydrogène peut alors réagir avec des métaux de transition résultant en sa dissociation en radical hydroxyle  $OH^\cdot$ , extrêmement réactif et jugé responsable de l'initiation de nombreux dommages au niveau des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines ou encore des lipides membranaires (Droge, 2002). La réaction de Fenton est le plus illustre exemple de la dissociation du  $H_2O_2$  catalysé par le fer ferreux (Figure 1-2). De plus, le peroxyde d'hydrogène peut, grâce à la réaction avec l'anion superoxyde, dite réaction de Haber-Weiss, générer une production de radical hydroxyle (Figure 1-3).



**Figure 1-2 : La réaction de Fenton**



**Figure 1-3 : La réaction de Haber-Weiss**

Les autres sources de ROS peuvent être d'origine environnementale, comme les rayonnements UV,  $\alpha$  ou  $\gamma$ , les polluants atmosphériques, l'intoxication aux métaux lourds, ou encore l'oxydation des composés de la fumée de cigarette ou de l'alcool. Les différents organes et tissus de l'organisme ne sont pas égaux en termes de production d'espèces radicalaires. Il est compréhensible que les organes métaboliquement les plus actifs (muscles) ou ceux exposés aux UV (yeux) par exemple seront davantage susceptibles de générer des ROS et autres RL, comme des espèces réactives de l'azote.

### **1.5 Les défenses anti-oxydantes**

Les anti-oxydants se définissent par leur capacité, même à faible concentration, à retarder de façon significative, ou à empêcher l'oxydation d'un substrat oxydable (Halliwell et Gutteridge, 1999).

Les réactions d'oxydation impliquent des radicaux à la fois initiateurs et propagateurs. Les mécanismes anti-oxydants sont aussi multiples (Figure 1-4). Certains agissent préférentiellement en supprimant ou diminuant la formation des radicaux libres, notamment par des actions enzymatiques. En effet, de nombreuses molécules ou enzymes sont capables de piéger les radicaux libres (Pietta, 2000). Il s'agit dans ce cas de réactions chimiques d'oxydoréductions. D'autres anti-oxydants vont agir davantage sur les radicaux formés après réaction des molécules biologiques avec les RL. Ces anti-oxydants réduisent ou empêchent ainsi la propagation des réactions en chaîne. Ceux-ci peuvent agir à différents niveaux des réactions d'oxydation.

A cette définition citée plus haut pourraient s'ajouter les mécanismes permettant de réparer les dommages causés par les réactions d'oxydation. Il ne s'agit donc pas dans ce cas d'empêcher le phénomène d'oxydation en tant que tel, mais d'agir à posteriori en réparant les dégâts grâce à l'action de certaines lipases, protéases, transférases ou enzymes de réparation de l'ADN (Pietta, 2000).

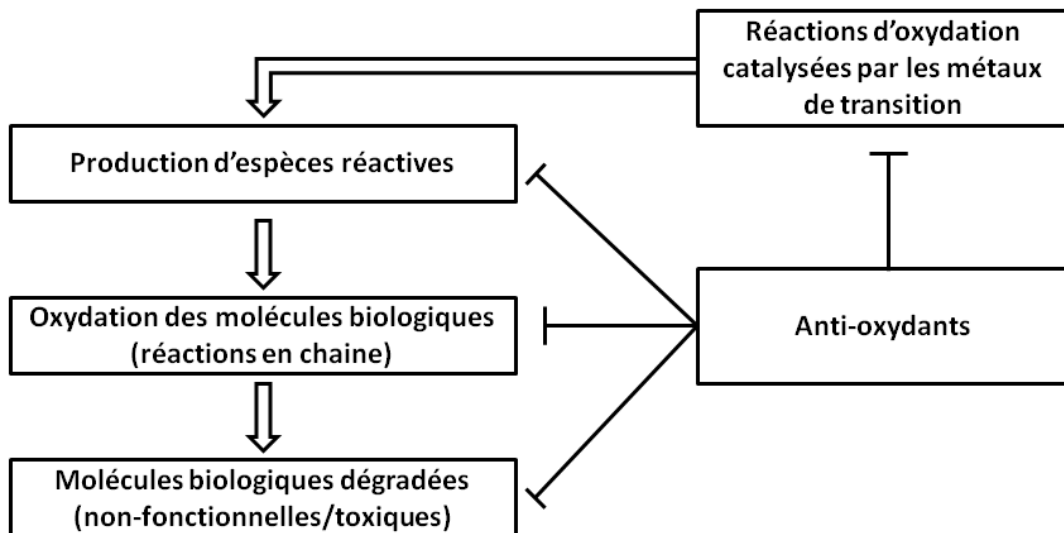


Figure 1-4 : Les différents niveaux de mécanismes anti-oxydants

### 1.5.1 Défenses endogènes

Une barrière endogène composée de plusieurs enzymes clés lutte contre ces radicaux libres et autres espèces oxydantes, afin de prévenir les dommages oxydatifs (Figure 1-5). Parmi ceux-ci, la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT) opèrent de concert.

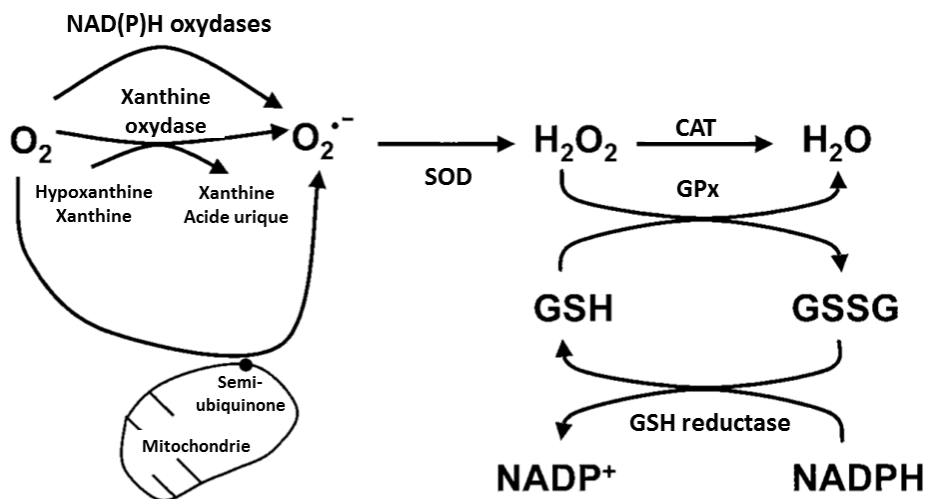
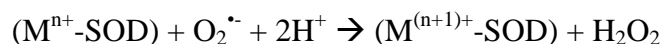
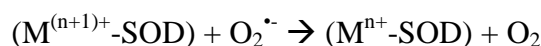


Figure 1-5 : Les enzymes anti-oxydants

(D'après Dröge, 2002)

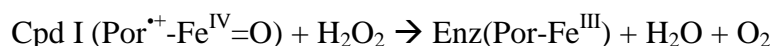
Les SOD sont des metalloprotéines en première ligne de défense, dismutant l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en eau (Figure 1-6). Il existe différentes formes de SOD se distinguant par le métal de leur site actif (Cu ; Zn ; Mn ; Fe ; Ni).





### Figure 1-6 : Mécanisme enzymatique de la SOD

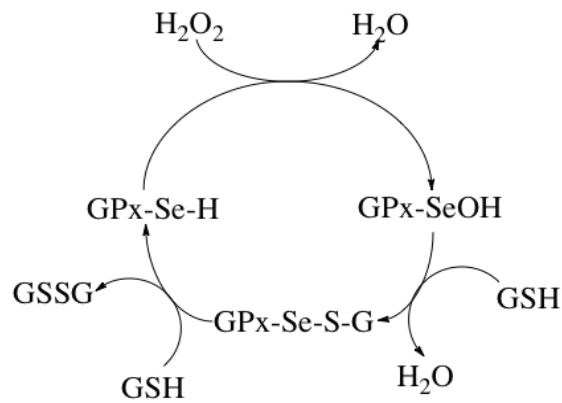
Puis le peroxyde d'hydrogène peut ensuite être pris en charge par la catalase, portant dans ses sites actifs de l'oxyde de fer (Por-Fe<sup>III</sup>) permettant une coupure hétérolytique générant de l'eau et la forme catalase compound I de l'enzyme (Cat Cpd I = une forme cationique oxoferryl porphyrine de la catalase : Por<sup>•+</sup>-Fe<sup>IV</sup>=O) (Figure 1-7). Celle-ci va alors rapidement réagir avec une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène générant de l'eau et de l'O<sub>2</sub> et régénérant la catalase sous sa forme initiale : Por-Fe<sup>III</sup> (Alfonso-Prieto et al., 2009).



### Figure 1-7 : Mécanisme enzymatique de la CAT

(Source : Alfonso-Prieto et al., 2009)

La glutathion peroxydase, grâce à son coenzyme le glutathion réduit (GSH), va également pouvoir réduire le peroxyde d'hydrogène en eau en oxydant le GSH en GSSG (Figure 1-8). Un élément clé dans le maintien de ce mécanisme de défense est la régénération du glutathion réduit par la glutathion réductase, nécessitant du NADPH. Le glutathion est encore un anti-radicalaire direct neutralisant l'anion superoxyde et le radical hydroxyle. Enfin, le GSH permet encore la régénération de certaines molécules anti-radicalaires à partir de leur forme oxydée (ex vitamine C ou E) (Valko et al., 2007).



**Figure 1-8 : Mécanisme enzymatique de la GPx**

(D'après Prabhakar et al., 2005)

(GSH : Glutathion ; GSSG : glutathion oxydé GPx-SeOH : enzyme sous forme d'acide sélénique ; GPx-Se-S-G : Enzyme sous forme d'adduit séléno-sulfide ; GPx-Se-H : enzyme sous forme active)

La régulation des concentrations intracellulaires des radicaux libres est possible notamment grâce aux variations de l'activité des enzymes constituant cette première ligne de défense. Il existe notamment une voie de régulation des mécanismes anti-oxydants cellulaires induits par des composés oxydés ou directement par les espèces radicalaires. Un des principaux sites de régulation est la voie de signalisation de l'élément de réponse anti-oxydante (Antioxidant Response Element : ARE). Les domaines ARE sont des éléments présents au sein des promoteurs de nombreux gènes codant pour les enzymes de détoxification. Cette régulation fait appel aux facteurs Nrf1 et surtout Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), eux-mêmes régulés par Keap1 (Kelch-like ECH-associated cofactors) protéine séquestrant Nrf1 et 2. Le stress oxydant, c'est-à-dire les espèces réactives ainsi que différents métabolites générés par ce stress oxydant semblent être impliqués dans la dissociation de Keap1-Nrf2. Nrf2 libéré va pouvoir interagir avec les domaines ARE et donc moduler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la défense contre les environnements oxydatifs (Masella et al., 2005). Parmi les gènes sous ce contrôle, il y a notamment des enzymes anti-oxydantes et des enzymes de détoxification de phase 2.

### 1.5.2 Les défenses anti-oxydantes exogènes

D'autres mécanismes de lutte contre les radicaux libres entrent également en jeu. Il s'agit de nombreuses molécules exogènes, notamment apportées par l'alimentation, capables

d'éliminer ces composés oxydatifs, ou de stopper les réactions d'oxydations en chaîne, mais avec une spécificité moindre.

Ces composés sont appelés des piègeurs de radicaux libres. Ce sont donc des molécules capables de céder des protons ou des électrons, avec pour conséquence le réappariement de l'électron célibataire de l'espèce radicalaire. Il s'agit donc de molécules qui entrent en compétition avec les cibles cellulaires comme l'ADN, les protéines et les lipides, permettant ainsi d'arrêter les réactions d'oxydations en chaîne. Ceci est possible car ces anti-oxydants exogènes sont des réducteurs forts, et une fois oxydés, sont beaucoup plus stables que les espèces réactives hautement oxydantes. Malgré leur forme radicalaire, ces composés sont moins réactifs, du fait de leurs possibilités de réarrangements moléculaires. On peut citer parmi les plus connus la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et la vitamine C. D'autres composés ont le vent en poupe depuis plusieurs décennies, à savoir les polyphénols, une très large classe de métabolites secondaires principalement du règne végétal.

#### ***1.5.2.1 Les anti-oxydants naturels***

Les anti-oxydants naturels sont très présents dans le règne végétal, pour lequel ils représentent un des principaux mécanismes de défense contre le dioxygène, les radicaux libres et les ROS produits au cours de la photosynthèse. Ces molécules sont apportés chez l'homme à travers la consommation de fruits et légumes ou d'autres boissons à base de plantes (ex : le thé) et peuvent s'avérer utiles pour la santé humaine.

##### **1.5.2.1.1 Vitamines et Caroténoïdes**

###### ***1.5.2.1.1.1 Les vitamines***

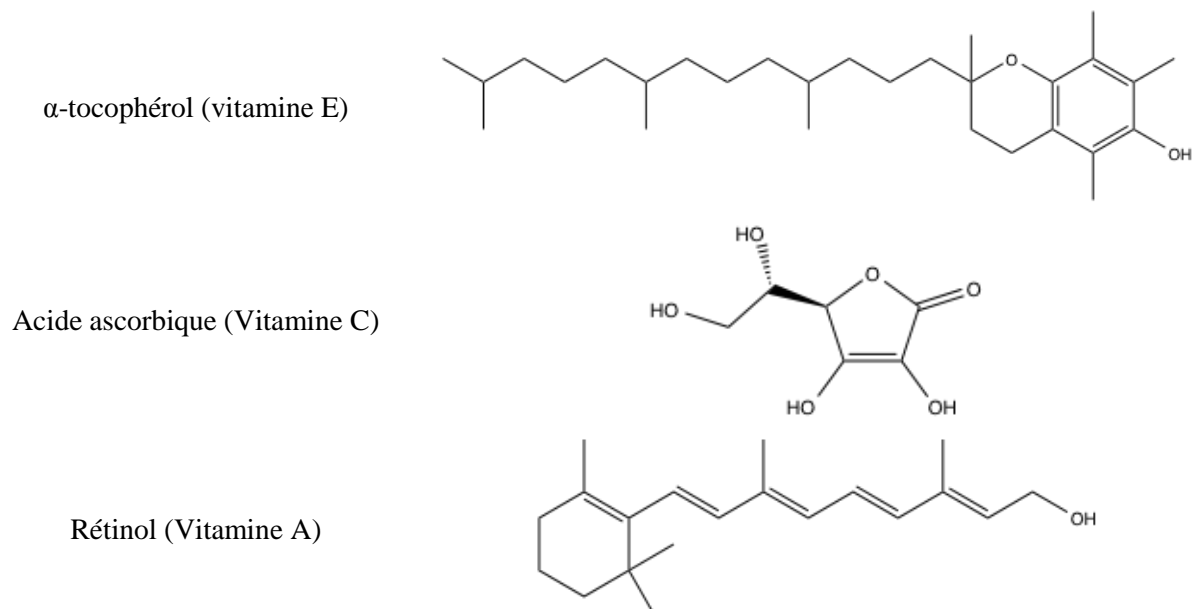
Les vitamines se définissent généralement par un ensemble de molécules organiques présentes au sein des aliments. Elles jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement normal du corps humain (Shahidi, 1997). En effet, certaines pathologies sont directement liées à des carences en ces composés : une carence en vitamine C provoque le scorbut ; une insuffisance de l'apport en vitamine A peut aboutir des formes de cécité ; une carence en vitamine B<sub>1</sub> peut engendrer des lésions nerveuses (béribéri) ; une carence en niacine (B<sub>3</sub>) a été associée à la pellagre ; et enfin le rachitisme est lié au manque de vitamine D.

On distingue les vitamines non-essentiels des essentielles, autrement dit, les vitamines synthétisables par l'organisme ou non. Il y a encore deux exceptions à cela : la vitamine D qui est synthétisé sous l'action des rayonnements UV du soleil, et la niacine dont

la voie de synthèse dépend du précurseur tryptophane, un acide aminé apporté par l'alimentation.

La famille des vitamines n'est pas une famille du point de vue chimique. On retrouve ainsi sous ce même nom des structures chimiques très différentes, d'où des bio-activités très différentes. Il y a deux classes principales de vitamines : les vitamines liposolubles représentées par la vitamine A, D, E et K mais également des caroténoïdes dotés d'activités provitaminiques A; les vitamines hydrosolubles comprenant la vitamine C et le groupe des vitamines B à savoir la thiamine (B<sub>1</sub>), la riboflavine (B<sub>2</sub>), la niacine (B<sub>3</sub>), la vitamine B<sub>6</sub>, l'acide pantothénique (B<sub>5</sub>), l'acide folique (B<sub>9</sub>), et la vitamine B<sub>12</sub> (Ball, 2006).

Parmi ces molécules, en dehors de leurs bio-activités essentielles, certaines sont également de puissants anti-oxydants. Il s'agit des vitamines E, C et A (Figure 1-9).

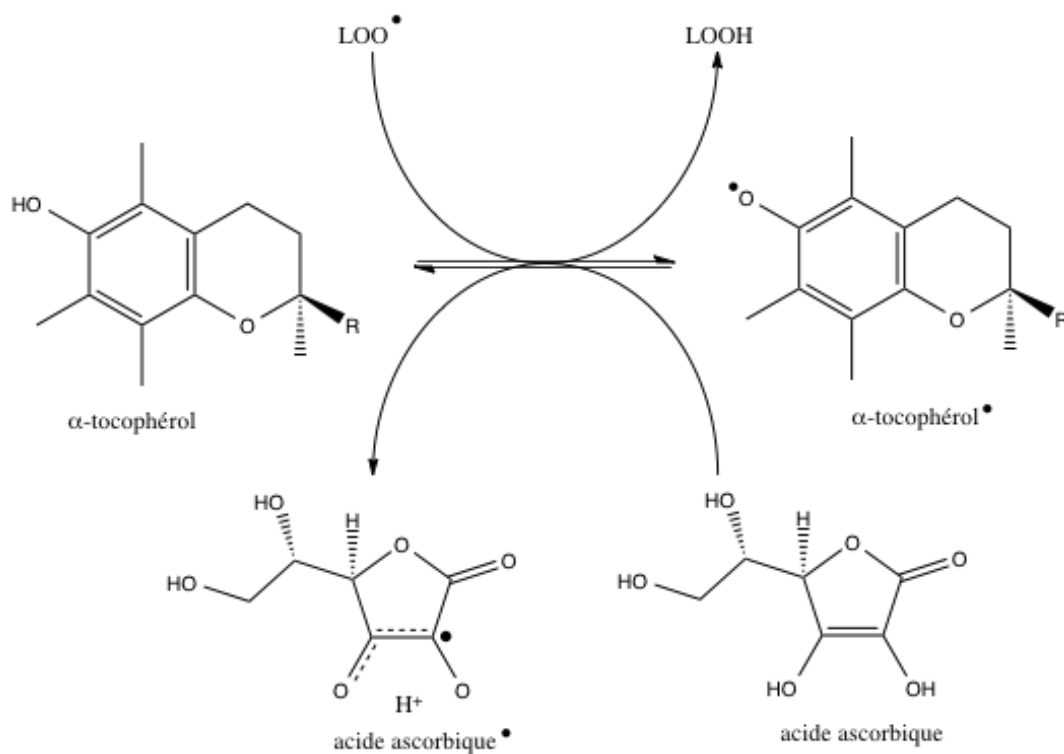


**Figure 1-9 : Vitamines anti-oxydantes**

La vitamine E recouvre un ensemble de huit molécules organiques, 4 tocophérols et 4 tocotriénols. C'est un puissant anti-oxydant, limitant quasi essentiellement la peroxydation lipidique. Ceci est dû à son caractère liposoluble qui favorise son accumulation dans les graisses. En effet, plus de 90 % des tocophérols se retrouvent au sein des gouttelettes lipidiques dans le tissu adipeux (Ball, 2006). A ce niveau, les tocophérols peuvent arrêter les réactions en chaîne de la lipoperoxydation en réduisant les radicaux lipidiques. La forme radicalaire de la vitamine E peut ensuite être reconvertie en vitamine E sous l'action de la vitamine C notamment (Figure 1-10). Ceci est possible grâce à la présence de la tête plus

polaire des tocophérols, qui va ainsi pouvoir interagir avec le milieu plus polaire pour entrer en contact avec la vitamine C. La vitamine C est elle-même capable d'exercer une activité anti-radicalaire directe au sein des milieux aqueux. Les différentes formes de la vitamine E ne seraient pas équivalentes en termes de bioactivité. Une grande attention a été donnée à l' $\alpha$ -tocopherol, alors que la  $\gamma$ -tocophérol serait plus abondante dans l'alimentation américaine et aurait une activité biologique plus large, dont notamment une action anti-inflammatoire (Jiang et al., 2001). Par ailleurs, le caractère liposoluble des vitamines E en fait un bon conservateur pour les huiles en les protégeant vis-à-vis de l'oxydation.

La vitamine C, lorsque oxydée par une espèce radicalaire donne naissance au radical ascorbyl peu réactif, mais capable de piéger un 2<sup>nd</sup> radical. Par ailleurs, le radical ascorbyl peut encore être dismuté générant l'acide déhydroxyascorbique ou régénérant la forme initiale. Enfin, la DHA peut encore régénérer la forme initiale anti-oxydante de la vitamine C au travers de l'action de réductases (Wilson, 2002).

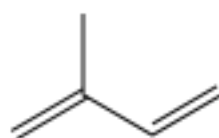


**Figure 1-10 : Cycle de la vitamine E et de la vitamine C**

(D'après Buettner, 1993)

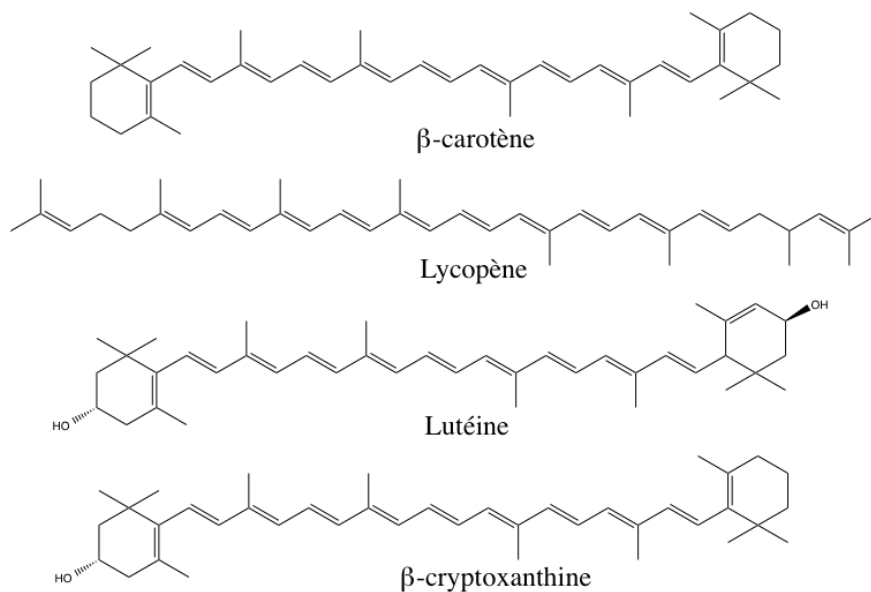
La vitamine A, est exclusivement d'origine animale. Cependant, sous ce nom de vitamine A se cachent en réalité aussi d'autres molécules, appelées vitamères, qui sont dotés de l'activité du rétinol, comme les caroténoïdes provitaminiques A qui sont très largement

rependus dans le règne végétal (ex :  $\alpha$ - et  $\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine) (Rucker, 2007). Ces provitamines sont des précurseurs des vitamines qui sont converties en leur structure active par le métabolisme. La famille des caroténoïdes fait référence à des composés liposolubles construits à partir d'unités isoprènes (Figure 1-11). Il s'agit de composés largement retrouvés dans le règne végétal, pour lesquels ils jouent un rôle de pigment. Ils forment de longues chaînes carbonées portant de nombreuses doubles liaisons conjuguées, et peuvent subir des modifications comme des cyclisations au cours de leur synthèse (Rao et Rao, 2007). Dans le cas particulier des xanthophylles, la voie de synthèse fait encore intervenir une introduction d'atomes d'oxygène au sein de ces structures. Parmi les caroténoïdes les plus rependus dans les fruits et les légumes, on compte le lycopène, la lutéine, le  $\beta$ - et  $\alpha$ -carotène ou encore le  $\beta$ -cryptoxanthine (Figure 1-12), représentant plus de 95 % des caroténoïdes retrouvés dans la circulation sanguine (Maiani et al., 2009).

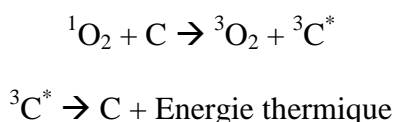


**Figure 1-11 : Unité isoprène**

La vitamine A possède une importante capacité anti-oxydante de par sa longue chaîne carbonée portant de multiples insaturations conjuguées (Landete, 2013). L'activité anti-oxydante des caroténoïdes repose essentiellement sur le piégeage de l'anion superoxyde ou de radicaux peroxydes. Cependant, le mécanisme principal n'est pas chimique, mais plutôt d'ordre physique. Il s'agit d'un phénomène de quenching physique dans la phase lipidique entre un caroténoïde et un  $O_2^{\cdot -}$  ou un  $^1O_2$  entraînant un transfert d'énergie à partir de ce dernier vers le caroténoïde (Figure 1-13). Il en résulte du dioxygène triplet et un caroténoïde triplet excité, qui sera capable de dissiper cette énergie et ainsi retrouver son état initial (Sies et Stahl, 1995; Stahl et Sies, 2003). Cette propriété des caroténoïdes est directement liée à leur chaîne carbonée poly-insaturée de structure conjuguée. Ainsi, plus cette chaîne est longue, plus la dissipation de l'énergie sera facilitée conférant un fort potentiel anti-oxydant (AOx). En conséquence, une molécule pourra exercer son action de manière cyclique, contrairement à ce que l'on observe dans le cas des réactions anti-radicalaires chimiques classiques. Cette activité protectrice est importante pour les plantes elles-mêmes, pour lutter contre le stress photo-oxydatif.



**Figure 1-12 : Exemples des principaux caroténoïdes**



**Figure 1-13 : Quenching physique de l'oxygène singulet par les caroténoïdes**

(D'après Stahl et Sies, 1993)  
 (C : caroténoïde ;  ${}^3\text{C}^*$  : caroténoïde triplet excité)

Néanmoins, les réactions chimiques entre caroténoïdes et radicaux libres peuvent aussi avoir lieu, mais seraient minoritaires. Enfin, dans certaines conditions particulières de pression partielle en oxygène élevée, ces caroténoïdes peuvent basculer vers une action de type pro-oxydante (Rahman, 2007).

### 1.5.2.1.2 Les polyphénols

Les polyphénols se définissent par des structures chimiques comptant au moins un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Le terme de biophénols est également employé pour décrire cette famille de molécules, afin de discriminer les composés de type phénolique qui ne sont pas d'origine biologique (Obied, 2013). La particularité de ces composés réside dans cette structure associant cycles aromatiques et groupements hydroxyles, car la présence de doubles liaisons conjuguées rend labile les atomes d'hydrogène du groupement hydroxyle (Vermerris et Nicholson, 2006). Les polyphénols sont pour la grande majorité des métabolites secondaires du règne végétal. Plus de 8000 structures différentes ont été répertoriées, dont certaines sont ubiquitaires à toutes les plantes, alors que d'autres sont

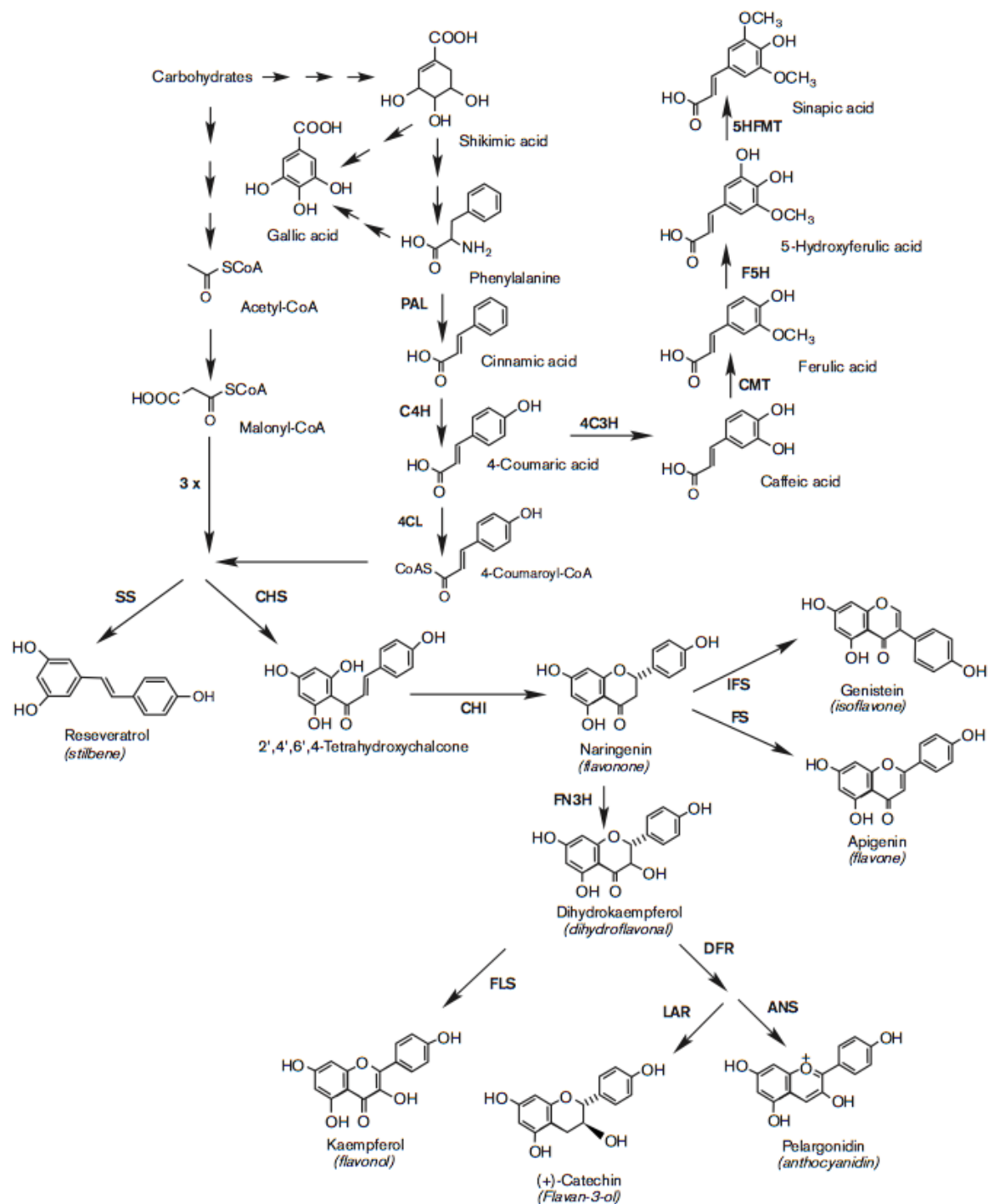
hautement spécifiques à un genre, une espèce, voire même un cultivar en particulier. De nombreuses classes de polyphénols ont pu être définies, rangeant et classant ainsi cet ensemble de molécules en fonction de leur structure chimique. Ces composés font généralement partie des moyens de défense des plantes, afin de lutter contre certains pathogènes, mais également contre les rayonnements UV. Parmi les rôles des polyphénols dans la plante, on peut citer l'action anti-oxydante, anti-microbienne, un rôle de photorécepteur, d'attracteur organoleptique (notamment visuel), ou encore une fonction d'agent repoussant vis-à-vis des insectes et animaux souvent liée à une astringence (Pietta, 2000).

Une indication très visuelle de fortes teneurs en polyphénols dans la majorité des fruits et légumes est le brunissement enzymatique de ce dernier après découpe. En effet, les polyphénols, étant anti-oxydants sont des réducteurs forts et vont eux-mêmes s'oxyder lorsqu'exposés à l'oxygène, réaction catalysée par la polyphénol oxydase (PPO) qui peut accéder à ses substrats une fois la compartimentation cellulaire rompue.

Le groupe des flavonoïdes est de loin le plus important, comptant plus de 5000 molécules décrites aujourd'hui. Il se caractérise par la présence de 3 cycles au sein de sa structure : il s'agit de deux cycles aromatiques A et B respectivement provenant de la voie de l'acétate et de la voie du shikimate (Bravo, 1998; Manach et al., 2004). Ces deux cycles sont encore reliés entre eux par l'hétérocycle oxygéné appelé C, noyau chromane. Dans la nature, la plupart de ces composés polyphénoliques sont trouvés sous forme de glycosides.

La voie du shikimate occupe une place centrale dans la biosynthèse des polyphénols, étant à l'origine de nombreux acides phénoliques comme l'acide gallique. La phénylalanine dérive également du shikimate, et sert de précurseur du cycle B et le noyau chromane notamment grâce à la phénylalanine ammonia lyase (PAL) (Tsao, 2010) (Figure 1-14). Le cycle A dérive quant à lui de 3 monomères de malonyl-CoA. L'ensemble est assemblé par la chalcone synthase, et peut être isomérisée pour aboutir à une structure de type flavanone grâce à la flavanone isomérase (Tsao, 2010).



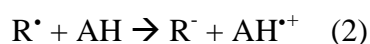


**Figure 1-14 : Voie de biosynthèse des principaux polyphénols**

(Duthie et Crozier, 2000)

La voie du shikimate et la voie de l'Acétyl-Coa sont à l'origine de la plupart des composés de la famille des polyphénols (PAL : phenylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; 4C3H : 4-coumarate 3-hydroxylase ; CMT : caffeate O-méthyltransférase ; F5H : férulate 5-hydroxylase ; 5HFMT : 5-hydroxyferulate O-méthyltransférase ; 4CL : 4-coumarate:CoA ligase ; CHS : Chalcone synthase ; SS : Stilbène synthase ; CHI : chalcone isomérase ; FS : flavone synthase ; IFS : isoflavone synthase ; FN3H : flavonone 3-hydroxylase ; FLS : flavonol synthase ; DFR : dihydroflavonol 4-réductase ; ANS : anthocyanidine synthase ; LAR : leucoanthocyanidine 4-réductase).

Deux mécanismes réactionnels sont classiquement décrits pour la capacité anti-oxydante des composés polyphénoliques. Il s'agit des réactions de transfert de proton ou de transfert d'électron (Figure 1-15).



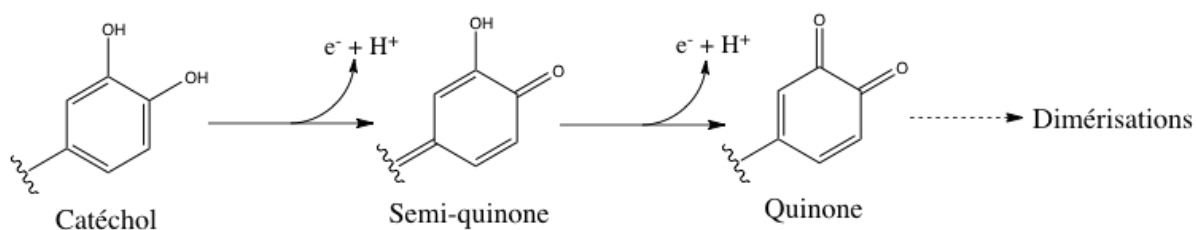
### Figure 1-15 : Principe des réactions anti-radicalaires

(1) : anti-oxydant par transfert de proton ; (2) : anti-oxydant par transfert d'électron ;  
R<sup>•</sup> : radical ; AH : anti-oxydant

L'activité anti-oxydante des polyphénols est généralement attribuée à leur structure hautement conjuguée à laquelle s'ajoutent les groupements hydroxyles ce qui induit la présence d'atomes d'hydrogène labiles (Tsao, 2010). Plusieurs études suggèrent l'importance du cycle catéchol du cycle B dans le piégeage des ROS, étant donné le fort caractère électro-donneur de cette fonction (Pietta, 2000). L'ajout d'une troisième fonction hydroxyle, c'est-à-dire un cycle pyrogallol, augmenterait davantage les capacités anti-oxydantes (Seyoum, Asres et El-Fiky, 2006), alors que dans le cas d'un seul hydroxyle sur le cycle phényle, l'activité anti-radicalaire est très réduite voire absente. Il en va de même pour les glycosylations, qui, lorsqu'elles affectent le nombre de groupements hydroxyles du cycle B, réduisent la capacité piègeuse de radicaux.

Il a été démontré que les molécules ayant une structure catéchol, caractérisée par un cycle aromatique dihydroxyle, ont une importante capacité donneuse de protons, de par leurs très faibles enthalpies de dissociation des liaisons O-H (Bond Dissociation Enthalpy : BDE) (Leopoldini et al., 2004). Ces réactions donnent lieu à des radicaux phénoxyes non-réactifs de par leur stabilité liée à la délocalisation électronique et des effets stabilisateurs de liaisons H (Figure 1-16). Les composés ne portant qu'un seul hydroxyle sur leur noyau aromatique ont des valeurs BDE plus élevées, expliquant ainsi une capacité anti-radicalaire réduite.

D'autres structures polyphénoliques peuvent exercer une activité anti-oxydante davantage par un transfert d'électron, qui est liée à leur potentiel d'ionisation (IP). Un IP bas serait la conséquence de la conjugaison des e<sup>-</sup> π, des effets de résonance et des structures planaires, le tout favorisant ainsi ce mécanisme réactionnel par transfert d'e<sup>-</sup>.



**Figure 1-16 : Mécanisme proposé de l'oxydation des polyphénols par le mécanisme HAT**

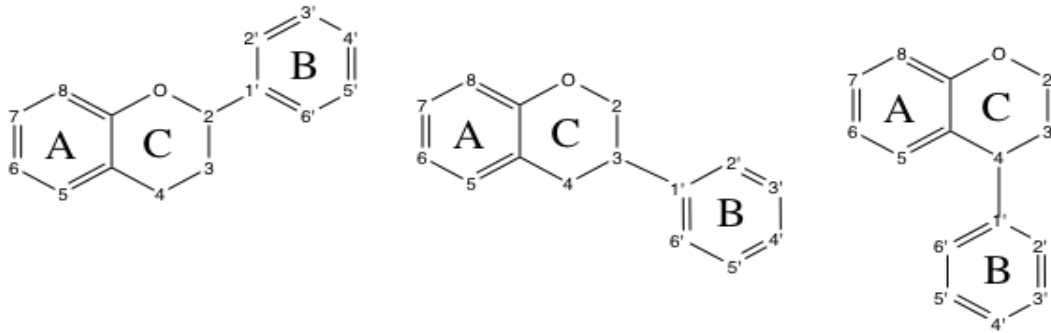
(D'après Sekher Pannala et al., 2001)

De plus, les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes sont capables de chélater les métaux, grâce aux hydroxyles adjacents du cycle B ou entre ceux des cycles A et C (Pietta, 2000).

La bio-activité des polyphénols, et notamment de la quercétine qui a été très étudiée, ne s'arrête pas uniquement aux réactions piégeuses de radicaux. Des actions anti-cancérigènes, anti-inflammatoires, anti-agrégants ou encore vasodilatateur ont été décrites dans la littérature (Erlund, 2004). Ces bio-activités seraient le fruit de la régulation de l'expression de certains gènes, de la modification (activation/inhibition) de l'activité d'enzymes, en plus des mécanismes anti-radicalaires. De par la grande diversité chimique des polyphénols, ces molécules n'exercent pas les mêmes bio-activités, et ne disposent pas des mêmes bio-disponibilités.

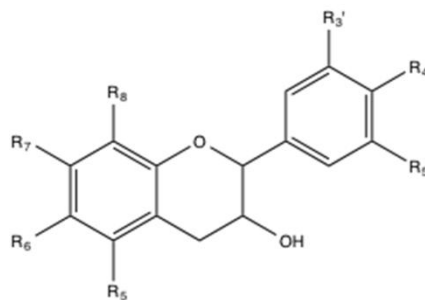
#### 1.5.2.1.2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes se caractérisent par 3 cycles, A, B et C, dont seuls A et B sont des cycles phénoliques, le cycle C étant un cycle chromane (Figure 1-17). Cette structure est généralement noté C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. La structure générale de cette famille présente le cycle B en position C2 du cycle C. Cependant, certaines sous-classes des flavonoïdes diffèrent en ce point avec une liaison en C3 ou C4 (Tsao, 2010). En effet, de nombreuses sous-classes se cachent derrière ce dénominateur commun : anthocyanes ; chalcones ; dihydrochalcones ; flavanols ; flavanones ; flavonols ; isoflavones etc. Ce sont le nombre de substitutions et le degré d'insaturations du cycle C qui permettent de les classer. Au sein d'une classe définie, ce sont les substitutions des cycles A et B qui différencient les molécules (Pietta, 2000). Les flavonoïdes représentent la classe la plus largement répandue de polyphénols dans les aliments. Les différents flavonoïdes sont retrouvés dans la nature soit sous forme de génines, c'est-à-dire aglycones, soit sous forme d'hétérosides (Ghedira, 2005).

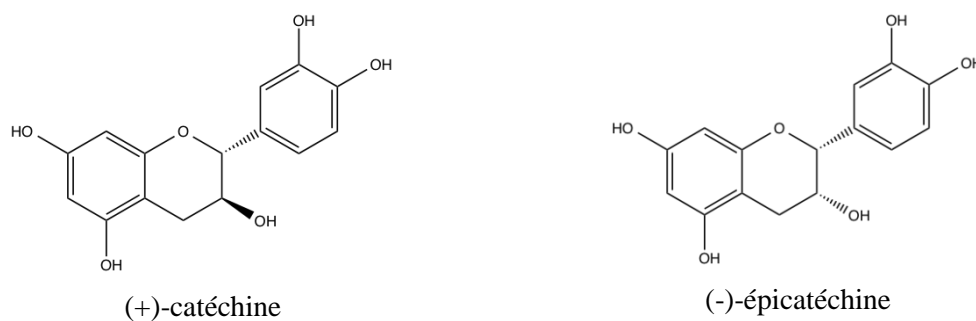


**Figure 1-17 : Squelette des flavonoïdes**

- Les flavanols, fréquemment référencés sous le nom de catéchines, peuvent être définis par un squelette C6-C3-C6 portant 2 groupements hydroxyles sur le cycle A en position 5 et 7, ainsi que sur le cycle B en position 3 et 4 (Figure 1-18). De plus, il peut y avoir une substitution en position C3, cis ou trans, du noyau chromane. L'absence d'insaturation entre C2 et C3 et d'une fonction carbonyle en C4 les différencie des autres flavonoïdes (Tsao, 2010). Les catéchines font partie des polyphénols les plus répandus dans la nature (Figure 1-19).

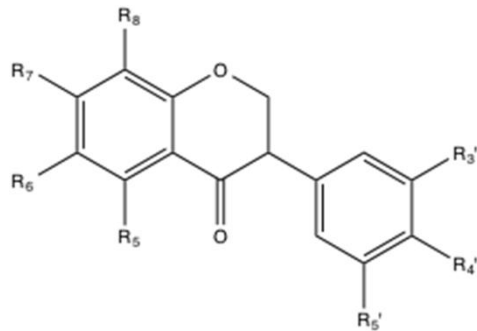


**Figure 1-18 : Les flavanols**

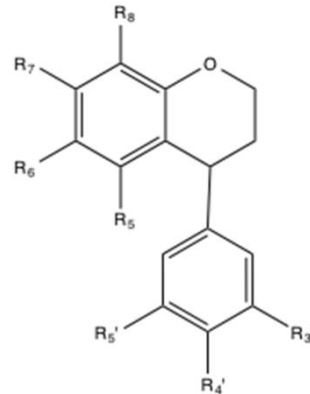


**Figure 1-19 : Exemples de flavanols**

- Les isoflavones portent le cycle B en position C3 du noyau chromane alors que les néoflavonoïdes le portent en position C4 (Figure 1-20).



Les isoflavones

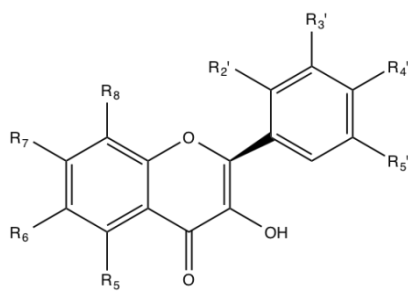


Les néoflavonoïdes

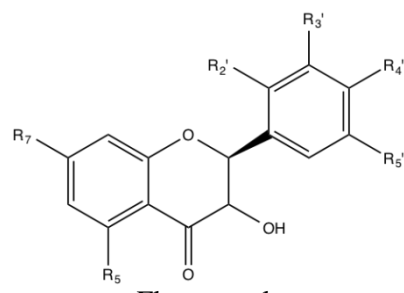
**Figure 1-20 : Les isoflavones et néoflavonoïdes**

- Les flavones, flavanones, flavonols et flavanonols ont des structures très proches C6-C3-C6. Les flavonols et flavanonols se distinguent des 2 autres sous-classes par une fonction alcool en position C3 du cycle C, et se distinguent entre eux par la présence d'une insaturation au niveau du cycle C (C2=C3) pour les flavonols (Figure 1-21).

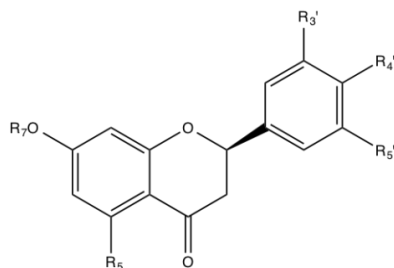
Les flavones diffèrent des flavanones également par la présence d'une insaturation au sein du cycle chromane C2=C3 (Tsao, 2010).



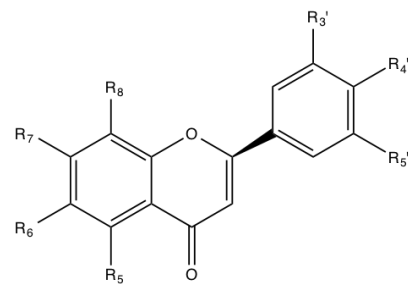
Flavonols



Flavanonols



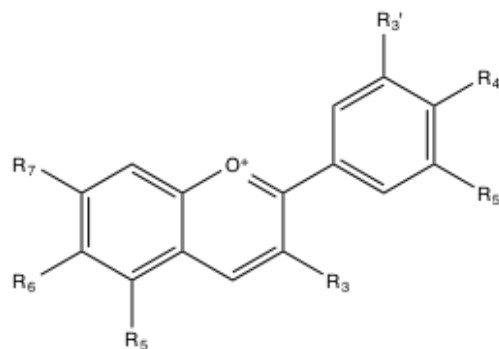
Flavanones



Flavones

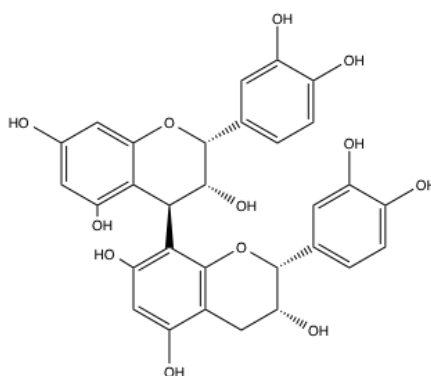
**Figure 1-21 : Structure générale des flavonols, flavanonols, flavanones et flavones**

- Les anthocyanes sont une structure classique en C6-C3-C6 composée de deux cycles aromatiques et d'un noyau chromane (Castañeda-Ovando et al., 2009). Deux hydroxyles sont en position C5 et C7 du cycle A, et au moins un hydroxyle en position C4 sur le cycle B. Mais ce qui caractérise réellement les anthocyanes sont les deux insaturations du noyau chromane entre O1=C2 et C3=C4 (Figure 1-22). Ceci confère un fort pouvoir colorant à ces composés, allant du bleu en milieu basique, au rouge en milieu acide. Dans la nature, ces molécules sont principalement retrouvées sous leur forme glycoside (anthocyanidines). Il s'agit d'une très grande classe de composés de par le nombre de groupements hydroxyles que porte le cycle B, mais surtout de par la grande diversité en termes de glycosylations et méthylations (Castañeda-Ovando et al., 2009). On distingue 3 principaux noyaux cyanidiques : la pélagonidine, la malvidine et la cyanidine (Tsao, 2010). La pélagonidine se caractérise par un hydroxyle en position 4' du cycle B. La cyanidine se distingue encore par un groupement hydroxyle supplémentaire en 3' du même cycle. Enfin, la malvidine ne présente qu'un seul hydroxyle en 4', ainsi que deux O-méthylations en position 3' et 5'.



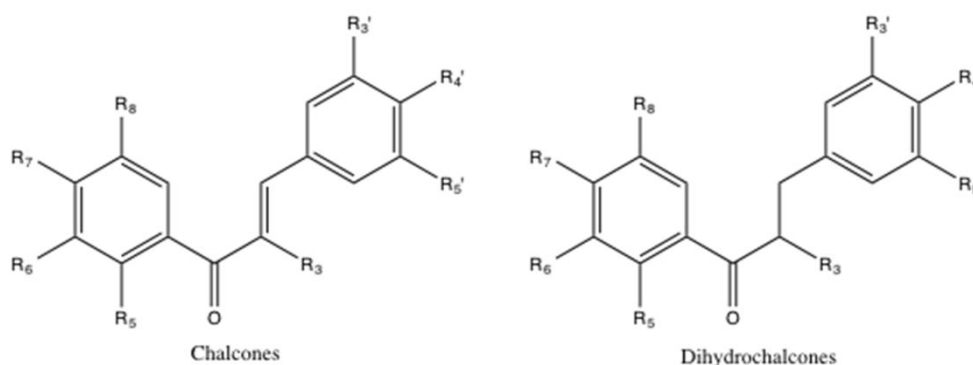
**Figure 1-22 : Les anthocyanes**

- Les procyanidines peuvent être considérées comme des polymères d'unités catéchiques, généralement présentant une liaison C4-C8 ou C4-C6 entre le cycle C d'une première unité et le cycle A de la suivante. Certaines procyanidines peuvent avoir 2 liaisons interflavoniques (procyanidines A) (Figure 1-23).



**Figure 1-23 : Exemple de procyanidine (B2)**

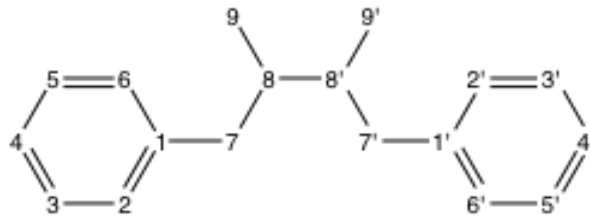
- Les chalcones et dihydrochalcones se caractérisent par une ouverture du noyau chromane, et ne possèdent donc pas d'hétérocycle central (Figure 1-24). Il s'agit donc de 2 cycles aromatiques reliés par une chaîne de 3 carbones, non saturée dans le cas des chalcones et saturée dans le cas des dihydrochalcones (Szliszka et al., 2010).



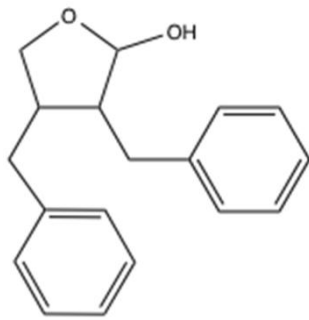
**Figure 1-24 : Les chalcones et dihydrochalcones**

#### 1.5.2.1.2.2 Les lignanes

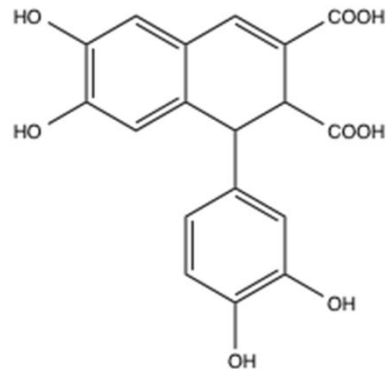
Cette classe de polyphénols se définit par une structure dimérique d'unités phénylpropanes C6-C3 reliées au niveau des carbones C8 (Figure 1-25) (Cunha et al., s. d.; Manach et al., 2004). Parmi les lignanes, on compte 8 sous-classes se différenciant par la position de l'oxygène au sein de la structure : les furofuranes ; les furanes ; les dibenzylbutanes ; les dibenzylbutyrolcatones ; les aryltetralines ; les arylnaphtalenes ; les dibenzocyclooctadiènes et les dibenzylbutyrolactols (Suzuki et Umezawa, 2007). Les différents composés des lignanes comportent pour la grande majorité un atome d'oxygène entre les carbones C9 et C9', mais ce n'est pas le cas de tous (Figure 1-26). Ceci est dû à deux voies de synthèse distinctes.



**Figure 1-25 : Squelette des lignanes**



Dibenzylbutyrolactone



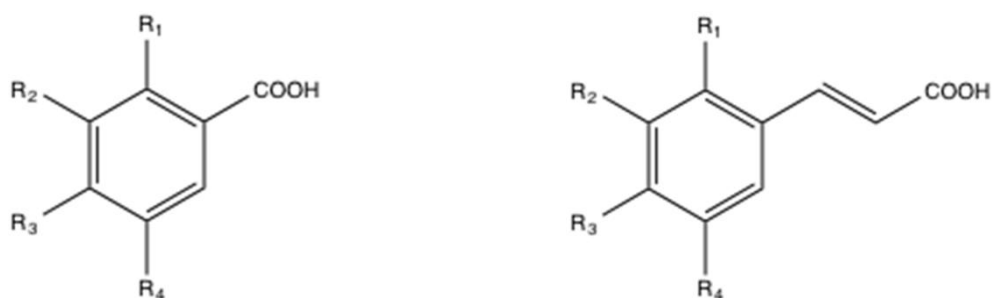
Acide epiphyllique

**Figure 1-26 : Exemples de lignanes**

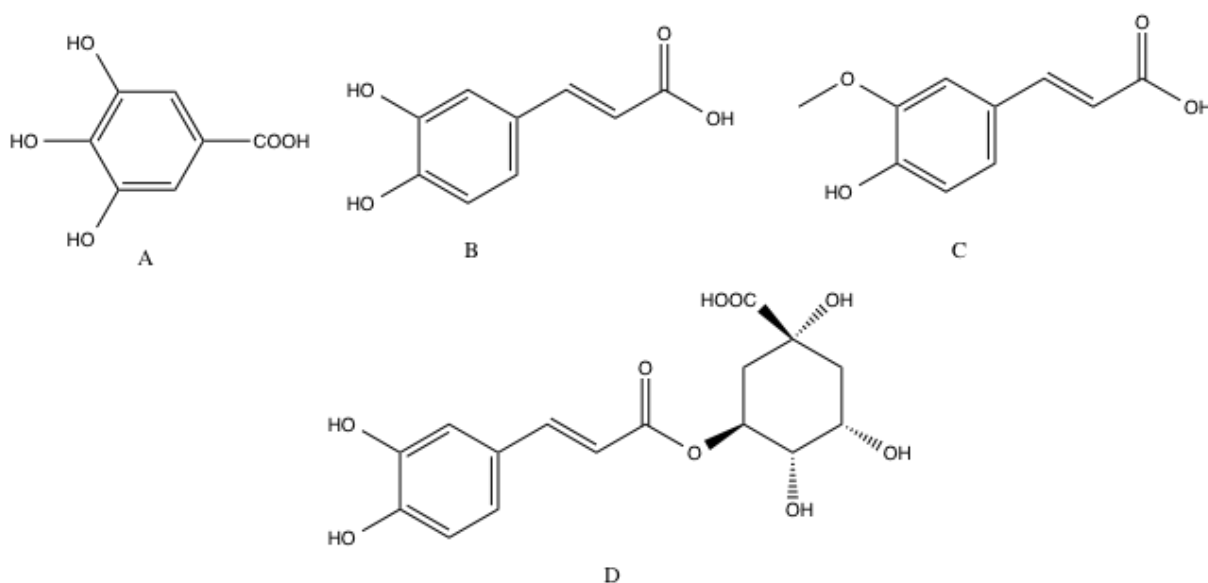
#### 1.5.2.1.2.3 Les acides phénoliques

Ce groupe est caractérisé par la présence d'un cycle aromatique portant d'une part un groupement acide carboxylique, et d'autre part un ou plusieurs hydroxyles (Figure 1-27). La classe des acides phénoliques est subdivisée en 2 sous-classes, les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (Tsao, 2010). Parmi ceux-ci, on peut citer l'acide gallique, une des acides phénoliques le plus simple, mais souvent décrit comme puissant anti-oxydant dans la littérature scientifique, surtout sous une forme conjuguée avec un autre noyau phénolique comme un flavanol (Rice-Evans, Miller et Paganga, 1997, 1996). Un exemple très répandu de dérivé de l'acide cinnamique est l'acide caféique, sous forme libre ou liée comme dans l'acide chlorogénique présent en quantité importante dans de nombreux fruits et légumes (Figure 1-28) (Manach et al., 2004). On peut encore citer l'acide férulique ou sinapique. D'autres exemples sont les acides hydroxybenzoïques dont l'acide salicylique.





**Figure 1-27 : Les acides phénoliques**

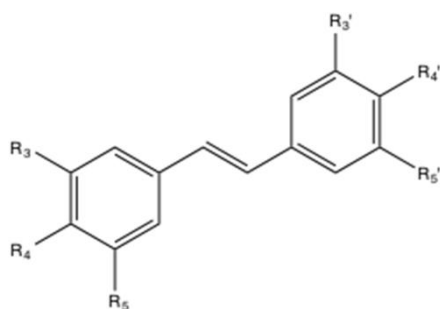


**Figure 1-28 : Exemples d'acides phénoliques**

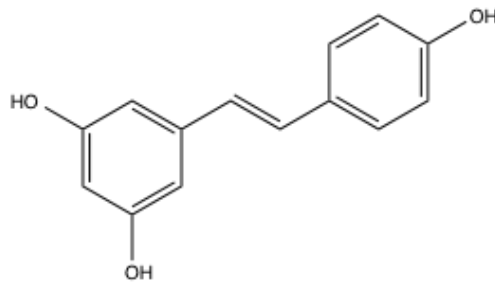
(A : acide gallique ; B : acide caféique ; C : acide férulique ; D : acide chlorogénique)

#### 1.5.2.1.2.4 Les stilbènes

Il existe deux sous-classes de stilbènes, les stilbènes monomères ou oligomères, qui partagent tous la présence d'un noyau 1,2-diphényl-éthylène (Figure 1-29) (Shen, Wang et Lou, 2009). Le resvératrol (Figure 1-30), un polyphénol du vin rouge, est sans doute le composé le plus décrit dans la littérature scientifique pour cette famille de molécules.



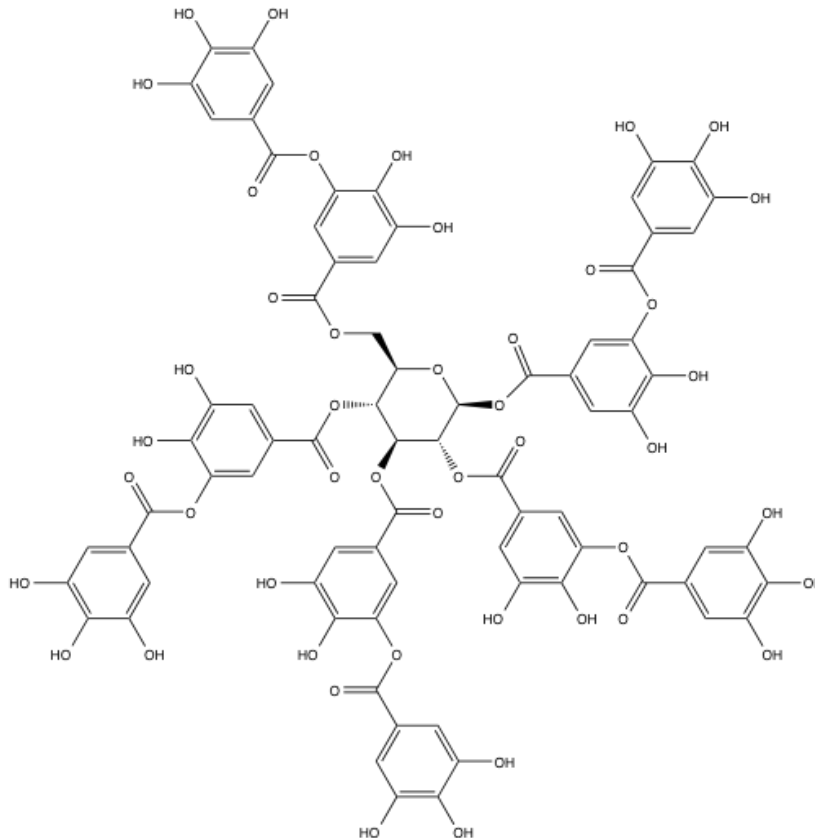
**Figure 1-29 : Monomère 1,2-diphényl-éthylène (sous-unité de constitution des stilbènes)**



**Figure 1-30 : Le resvératrol**

#### 1.5.2.1.2.5 Tannins

Les tannins sont des composés de taille plus importante que les classes décrites précédemment. En effet, il s'agit de molécules polymères. Deux sous-classes se distinguent encore parmi les tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés. Cette première sous-classe a une structure de base de polyesters d'acide gallique et d'ellagitannines (acide hexahydroxy-diphénique), avec comme plus illustre exemple l'acide tannique (Figure 1-31) (Bravo, 1998). La seconde sous-classe des tanins condensés correspond aux polymères d'unités catéchiqes décrites précédemment.



**Figure 1-31 : L'acide tannique**

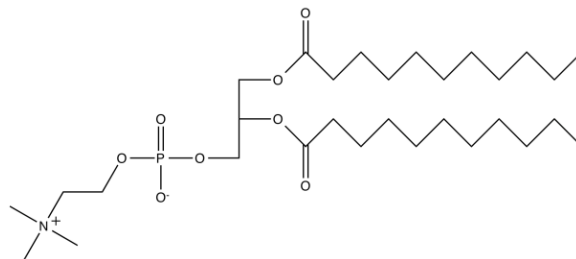
#### 1.5.2.1.2.6 Autres polyphénols

Plusieurs autres classes existent encore, dont voici une liste non-exhaustive :

- Curcuminoïdes
- Acides cinnamiques
- Hydroxycinnamaldéhydes
- Terpènes phénoliques
- Naphtoquinones

#### 1.5.2.2 Phospholipides

Les phospholipides ont un effet anti-oxydant principalement observé dans le processus de peroxydation lipidique. Leur fonction acide phosphorique, liposoluble, est tenue pour responsable de cette activité de par sa capacité piègeuse de métaux (Figure 1-32).



**Figure 1-32 : Exemple : phosphatidylcholine**

#### 1.5.2.3 Acides aminés et peptides

Certains acides aminés libres (acide glutamique, méthionine, alanine, asparagine, valine, acide aspartique, serine, lysine, tryptophane, histidine) ou certains peptides peuvent exercer une activité anti-oxydante (Shahidi, 1997). Les acides aminés libres anti-oxydants les plus forts seraient en particulier les acides aminés soufrés (Atmaca, 2004). Par exemple, une fraction d'un hydrolysate de protéines myofibrillaires porcines, composée de peptides de 5 à 11 acides aminés, a été révélée comme anti-oxydante de par une activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (Saiga, Tanabe et Nishimura, 2003). Par ailleurs, un peptide obtenu par hydrolyse enzymatique de la  $\beta$ -lactoglobuline a révélé une action anti-radicalaire importante (Hernandez-Ledesma et al., 2005).

Celle-ci se manifeste principalement à travers des mécanismes de chélation de métaux de transition ou de piégeage des radicaux lipidiques, notamment grâce au cycle imidazole dans le cas de l'histidine. D'autres acides aminés sont davantage donneurs de proton comme la tyrosine par exemple. Toutefois, la capacité anti-radicalaire des acides aminés est relativement faible, et nécessite donc des concentrations importantes afin de peser dans la balance.

#### 1.5.2.4 Les oligo-éléments

Les oligo-éléments (Cu, Zn, Se, Mn, Fe etc.) ne sont pas des anti-oxydants en tant que tels, mais agissent comme cofacteurs des enzymes constituant la première ligne de défense face aux attaques oxydatives (Leung, 1998). Il s'agit en réalité de catalyseurs redox de ces enzymes. Leur apport par l'alimentation permet donc de maintenir le bon fonctionnement de la machinerie anti-oxydante cellulaire et donc l'équilibre oxydatif.

Par ailleurs, certains oligo-éléments, selon leur état et leur concentration, peuvent être à l'origine d'une production de ROS par des mécanismes redox comme dans le cas du Fer et la réaction de Fenton. La supplémentation en oligo-éléments en cas de carence nécessite donc un certain contrôle.

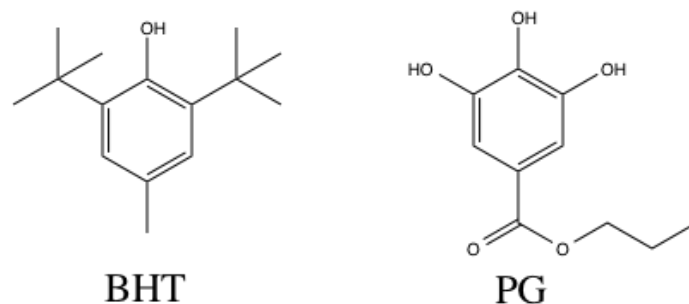
#### 1.5.2.5 Autres anti-oxydants ou modes d'action

La mélatonine, une neurohormone, possède un double rôle anti-oxydant. En effet, cette molécule est capable de piéger directement les radicaux libres, mais va également avoir un rôle dans la régulation des systèmes de défense de l'organisme en stimulant l'activité de certaines enzymes anti-oxydantes ou en stimulant l'expression de leurs gènes (Rodriguez et al., 2004).

Certains polyphénols comme les anthocyanes ont également une action modulatrice de l'expression des enzymes anti-oxydantes (GPx, glutathion S-transférase : GST, glutathion réductase, ou encore la NAD(P)H : quinone oxydoréductase), en plus de leur capacité chimique de réduire les espèces radicalaires elles-mêmes. Cette régulation par les anthocyanes passe par l'activation de la voie ARE (Antioxidant Response Element) en stimulant l'expression des enzymes de phase II. Il en est de même pour certains caroténoïdes, qui induisent l'expression des enzymes de détoxification de phase II de l'ARE, vraisemblablement en provoquant la translocation de Nrf2 (nuclear factor E<sub>2</sub>-related factor 2) du cytoplasme vers le noyau (Ben-Dor et al., 2005).

#### 1.5.2.6 Anti-oxydants de synthèse

Il existe certaines molécules anti-oxydantes de synthèse principalement destinées à la préservation des aliments vis-à-vis des réactions d'oxydations pendant leur stockage. Il s'agit bien souvent encore de structures chimiques de type phénoliques comme le BHT (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène) ou le PG (gallate de propyle) (Figure 1-33) (Marc et al., 2004). Le trolox et la stobadine ont été envisagés en tant qu'anti-oxydant protecteur *in vivo*.



**Figure 1-33 : Exemples d'antioxydants de synthèse**

### 1.5.3 Sources en anti-oxydants naturels dans l'alimentation

Les anti-oxydants naturels dans l'alimentation sont apportés en grande majorité par la consommation de fruits et légumes (F&L). Cependant, tous les F&L ne sont pas égaux en termes de teneurs en polyphénols, caroténoïdes, vitamines anti-oxydantes ou autres molécules piègeuses de radicaux. De plus, selon la méthode utilisée pour évaluer la teneur d'une famille de molécules, les résultats peuvent être très variables. L'analyse des valeurs en polyphénols totaux à partir de la base de données [www.phenol-explorer.eu](http://www.phenol-explorer.eu), est obtenue soit par la méthode de Folin Ciocalteu, soit par addition des valeurs des molécules individuellement dosées par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) (Perez-Jimenez et al., 2010). La couleur rouge des F&L semble être un bon indicateur de teneurs importantes en polyphénols. En effet, les fruits rouges sont pour la plupart très largement en tête du classement (framboise noire, mûre, groseille, myrtille, chou rouge etc). Toutefois, selon la méthode de dosage utilisée, certains F&L présentent des teneurs en polyphénols très différents. Ces écarts peuvent être liés au fait que les teneurs estimées grâce aux résultats obtenus par HPLC ne comptabilisent pas certains composés ou certaines classes de composés. Par ailleurs, il est fort probable que les valeurs obtenues par la méthode de Folin soient surestimées à cause du manque de spécificité de ce test, et la possibilité d'interférences (Tableau 1-1).

Les teneurs en caroténoïdes, représentées pour la grande majorité par les 6 caroténoïdes principaux ( $\alpha$ - et  $\beta$ -carotène ;  $\beta$ -cryptoxanthine ; lycopène ; lut et zéaxanthine), sont relativement faibles pour la plupart des F&L ( $< 0,5$  mg/100 g de matière fraîche (MF)), à l'exception des épinards, de la carottes ( $>10$  mg/100 g de MF) ou encore de l'abricot, du poireau, de la tomate et du haricot vert ( $>2$  mg /100 g de MF). Les valeurs répertoriées correspondent aux données provenant des références bibliographiques suivantes, et ont été moyennées en cas de redondance des F&L décrits [1] : (Biehler et al., 2010) ; [2] : (O'Neill et al., 2001) ; [3] : (Müller, 1997) ; [4] : (Maiani et al., 2009) ; [5] : (Bell, 2012).

Les teneurs en vitamines anti-oxydantes (E ou C) ont été extraites des tables de référence (Bell, 2012). La vitamine A, pourtant dotée d'activité anti-oxydante, a été ignorée du fait de sa provenance exclusivement animale.

**Tableau 1-1 : Teneurs en composés à potentiel anti-oxydant d'une sélection de fruits et légumes**

Fruits et légumes	Polyphénols Totaux <sup>a</sup> - Folin Ciocalteu (mg GAE/100 MF)	Polyphénols Totaux <sup>b</sup> - HPLC (mg/100 g MF)	Polyphénol(s) majoritaires	Vitamines anti-oxydants (E, C) (mg/100 g MF)	Caroténoïdes (mg/100 g MF)
<b>Framboise noire</b>	980	-	Flavonol (quer-3-o-rut) ; acide phénolique (acide ellagique)	-	-
<b>Mûre</b>	569	257	Anthocyanes (Cyan-3-O-gluc) ; HBA (acide ellagique)	E = 2,7 C = 17	0,28 [1][5]
<b>Myrtille</b>	472	836	Flavonols (quer)	E = 2,7 C = 22	0,03 4 [5]
<b>Groseille</b>	448	43	Anthocyane (cyan-3-xyl-rut)	E = 1,2 C = 36	0,02 5 [5]
<b>Prune</b>	410	189	HCA (CQA)	E = 0,94 C = 5,4	0,26 [2][5]
<b>Choux rouge</b>	348	1	Flavonols (quer)	E = 1,7 C = 57	0,02 [2][5]
<b>Fraise</b>	289	235	Anthocyanes (pelarg-3-O-gluc) Flavanols ((+)-catéchine)	E = 0,12 C = 57	0,02 2 [2][5]
<b>Epinards</b>	249	119	Flavonols (5,4'-dihydroxy-3,3'-diméthylène dioxyflavone 4'-O-glucuronide)	E = 2,3 C = 51	9,41 [1][2][5]
<b>Choux de bruxelles</b>	221	1	Flavonol (Kaempférol)	E = 0,56 C = 112	0,73 [2][5]
<b>Pomme (dessert)</b>	201	136	Flavonols (PB2)	E = 0,49 C = 12	0,11 [1][2][5]
<b>Brocoli</b>	199	45	Flavonol (Kaempf-3-soph)	E = 0,747 C = 94	1,22 [1][2][5]
<b>Raisin (noir)</b>	185	169	Anthocyanes (Malv-3-O-gluc)	E = 0,9 C = 4,2	0,22 [1][5]
<b>Cerise douce</b>	173	274	Anthocyane (Cyan-3-rut)	E = 0,13 C = 15	0,34 [1][2][5]
<b>Framboise rouge</b>	148	219	Anthocyanes (cyan-3-O-soph) HBA (lambertianin C ; sanguin H-6)	E = 4,0 C = 25	0,11 5 [2][5]
<b>Abricot</b>	133	34	HCA (3CQA)	E = 0,5 C = 9,4	2,46 [1][2][5]
<b>Raisin (vert)</b>	122	15	Flavonoïdes HCA (acide caffeoyl tartarique)	-	-
<b>Poire</b>	108	17	HCA (5-CQA)	E = 0,43 C = 4,6	0,04 5 [2][5]
<b>Oignon rouge</b>	103	169	Flavanols (quer-3,4'-O-digluc)	-	-
<b>Potiron</b>	86	60	HBA (Syringic acid)	-	1,18 cuit [2]

Fruits et légumes	Polyphénols Totaux <sup>a</sup> - Folin Ciocalteu (mg GAE/100 MF)	Polyphénols Totaux <sup>b</sup> - HPLC (mg/100 g MF)	Polyphénol(s) majoritaires	Vitamines anti-oxydants (E, C) (mg/100 g MF)	Caroténoïdes (mg/100 g MF)	
<b>Choux fleur</b>	82	38	HCA (Acide sinapique)	E = 0,27 C = 64	0,01 7	[2][5]
<b>Oignon jaune</b>	76	74	Flavanols (quer-3,4'-O-diglu)	E = 0,267 C = 7,4	0,00 5	[2][5]
<b>Asperge</b>	75	29	Flavanols (quer-3-O-rut)	E = 2,0 C = 20	0,83	[2][5]
<b>Poireau</b>	62	3	Flavanols (Kaempférol)	E = 0,547 C = 24	1,77	[1][2][5]
<b>Aubergine</b>	61	1	HBA (Protocatechique acid)	E = 0,03 C = 5,0	0,5	[2][5]
<b>Céleri-rave</b>	59	3	Flavones (Apigénine)	A = 0 E = 0,67 C = 8,3	0,01 5	[5]
<b>Carotte</b>	58	20	HCA (5-CQA)	E = 0,513 C = 7,0	13,1	[1][2][5]
<b>Navet</b>	55	55	-	E = 0 C = 20	0,72	[5]
<b>Pomme de terre</b>	54	28	HCA (5-CQA)	E = 0,05 C = 17	0,03	[2][5]
<b>Tomate</b>	45	4	HBA (5-CQA)	E = 0,93 C = 19	2,48	[1][2][5]
<b>Radis rouge</b>	44	1	Flavanols (Kaempférol)	-		
<b>Courgette</b>	30	1	Flavanols (Quer-3-O-rut)	E = 0 C = 18	0,14	[2][5]
<b>Concombre</b>	21	0,1	Flavonols (Kaempférol)	E = 0,1 C = 8,0	0,59	[2][5]
<b>Choux blanc</b>	15	0,1	Flavonols (Kaempférol ; querc)	E = 1,7 C = 52	0,09	[2][5]
<b>Coing</b>	-	19	HCA (5-CQA)	E = 0 C = 13	0,03	[5]
<b>Rhubarbe</b>	-	3	Flavonols ((+)-Cat)	E = 0,25 C = 10	0,09	[4][5]
<b>Haricot vert</b>	-	8	Flavanols (Quer-3-O-rut)	E = 0,42 C = 19	1,29	[1][5]
<b>Radis noir</b>	-	2	Flavanols (Kaempf)	E = 0 C = 27	0,01	[5]
<b>Mirabelle</b>	-	-	-	E = 0 C = 7,2	0,51	[3][5]

(<sup>a</sup> GAE : équivalent acide gallique ; <sup>b</sup> : somme des quantités des polyphénols individuels dosés par HPLC exprimée en mg de polyphénols/100 g de matière fraîche).

Quer : quercétine ; Rut : rutinoside ; cyan : cyanidine ; gluc : glucoside ; HCA : acide hydroxycinnamique ; CQA : acide caféoylquinique ; pèlarg : pèlargonidine ; kaemp : kaempférol ; PB2 : procyanidine ; malv : malvidine.

#### 1.5.4 Alimentation et biodisponibilité des anti-oxydants naturels

La biodisponibilité des différents polyphénols est intimement liée à la structure chimique de chacune de ces molécules.

Les anthocyanes forment une famille polyphénolique dont les composés sont décrits comme d'importants anti-oxydants étant donné leurs fortes teneurs dans certains aliments, ainsi que leur fort potentiel anti-radicalaire. La consommation d'une portion (100 g) de certains F&L peut ainsi apporter plusieurs centaines de mg d'anthocyanes. Cependant, les résultats combinant de nombreuses études à propos de la biodisponibilité de ces molécules,

suggèrent qu'ils sont peu absorbés et rapidement éliminés (Manach et al., 2004). En effet, les concentrations plasmatiques atteignent rapidement un maximum après ingestion d'anthocyanes, puis redescendent sous le seuil de détection en moins de 2 heures. Les formes glycosylées administrées sont retrouvées au niveau plasmatique, ainsi qu'une importante concentration en acide protocatéchique, mais sont toutes deux rapidement éliminées. Par exemple, entre 1,5 et 5 % des anthocyanes du vin rouge ont été retrouvées dans les urines après 12 h (Lapidot et al., 1998). Basés sur les résultats de plusieurs études, l'absorption des anthocyanes a été confirmée, mais leur faible recouvrement au niveau plasmatique ou dans l'urine leur attribue une faible biodisponibilité. Néanmoins, cette faible biodisponibilité apparente peut résulter du manque de méthodes adaptées à l'analyse de ces molécules et surtout de leurs métabolites. En effet, les méthodes analytiques se focalisent sur la détection de leur forme de cation flavylium. Il est peu probable de retrouver les anthocyanes sous cette forme *in vivo*. Les formes hémikétale ou chalcone sont davantage susceptibles d'être retrouvées *in vivo*. Ceci peut être une source de sous-estimation de la biodisponibilité de cette classe de composés (McGhie et Walton, 2007).

Parmi les flavonols, il a été démontré que la quercétine, sous ses formes glycolysées, est fortement absorbée par l'organisme (Manach et al., 2005). A l'inverse, l'aglycone présente généralement une biodisponibilité plus réduite. Par ailleurs, l'absorption de ces différents composés n'a pas lieu au même niveau du tractus gastro-intestinal. Les aglycones et glucosides seraient préférentiellement absorbés dans les parties supérieures, contrairement aux rutinosides pour lesquelles l'absorption plus tardive a lieu dans les parties distales (Erlund, 2004).

La biodisponibilité de la vitamine E a été démontrée dépendante de la teneur en matières grasses des repas. Une prise alimentaire composée de 3% de graisses serait optimale pour l'absorption de la vitamine E (Rucker, 2007). L'absorption des tocophérols alimentaires reste néanmoins toujours inférieure à 50%. La biodisponibilité de la vitamine C est très élevée, atteignant près de 100% lorsque ingérée dans des doses physiologiques. Toutefois, à des doses élevées, la grande majorité de la vitamine C sera éliminée dans les urines sous sa forme non-métabolisée.

La biodisponibilité des caroténoïdes est généralement considérée comme modérée voire faible lorsqu'ingérés sous leur forme naturelle, c'est-à-dire au sein de la matrice des F&L. Ceci est particulièrement vrai dans le cas du  $\beta$ -carotène des F&L, dont seul 14% de la quantité ingérée sont réellement absorbés (Hof et al., 2000). Les processus de transformation des aliments sont susceptibles d'améliorer la biodisponibilité des caroténoïdes par la



destruction de la matrice. D'autres caroténoïdes semblent plus facilement absorbés, comme la lutéine (67%).

### **1.5.5 Processus de transformation et potentiel anti-oxydant des aliments**

Les processus de transformation des aliments, notamment des fruits et légumes, sont susceptibles de provoquer des changements importants du point de vue de leur composition chimique, et donc de leur potentiel anti-oxydant. En effet, la cuisson de certains légumes, quelque soit le mode de cuisson : micro-ondes, vapeur, eau bouillante (haricots verts, poivrons, brocoli, épinards), induit une augmentation de leur activité anti-radicalaire (Turkmen, Sari et Velioglu, 2005). L'inactivation des peroxydases par la cuisson est suggérée comme responsable de cette augmentation. La formation de produits néoformés est également impliquée dans ces changements d'activité. Certains produits de Maillard (ou de brunissement non-enzymatique), issus des réactions ayant lieu sous l'effet de la chaleur, exercent eux-mêmes aussi une action piègeuse de radicaux. D'autres études démontrent à l'inverse une baisse du potentiel anti-oxydant suite à la cuisson. Par exemple, la cuisson conventionnelle du brocoli dans l'eau bouillante ou par micro-ondes résulte en une réduction des teneurs en polyphénols totaux, en caroténoïdes et en vitamine C, et ce de manière durée-dépendante. Ces baisses de concentration en molécules anti-radicalaires s'illustrent par la réduction significative de la capacité anti-oxydante mesurée (Zhang et Hamazu, 2004). Il semble encore que selon l'aliment, il y ait des différences importantes. Ainsi, la cuisson du brocoli ou de la pomme de terre induit un léger accroissement de leur activité anti-oxydante totale. A l'opposé, dans le cas de l'oignon, de la carotte ou du chou, une réduction importante est obtenue (Faller et Fialho, 2009). Enfin, une étude comparative de l'impact des modes de cuisson sur le potentiel AOX des poivrons démontre que la cuisson micro-ondes ou type wok préserve le mieux les composés AOX, alors qu'une baisse significative est observée dans le cas de la cuisson à l'eau (avec une tendance proportionnelle à la quantité d'eau utilisée et à la durée de cuisson). Ce dernier mode de cuisson semble induire une solubilisation de certains composés dans l'eau de cuisson qui seront donc éliminés (ex. vitamine C) (Chuah et al., 2008). Ces résultats se confirment dans une autre étude dans laquelle, pour la majorité des aliments, les propriétés anti-oxydantes sont mieux préservées voir même augmentées lorsque les aliments sont cuits par des méthodes évitant l'eau (Jiménez-Monreal et al., 2009).

Pour l'exemple de la tomate, la cuisson augmente la bio-accessibilité du lycopène, mais baisse les teneurs en vitamine C. Pour les polyphénols, la cuisson n'induit pas de changement (Dewanto et al., 2002). Il en résulte une action AOX significativement plus

élevée. En effet, les procédés de transformation ou de conservation des aliments comme la cuisson, la pasteurisation, la découpe/broyage peuvent directement être délétères pour certaines molécules, mais peuvent au contraire, par la destruction de la matrice, améliorer leur bio-disponibilité. La rupture de la matrice peut par exemple favoriser la solubilisation des caroténoïdes libres ou estérifiés (Maiani et al., 2009). Par contre, le simple stockage des aliments réduit drastiquement leur teneur en caroténoïdes. Une perte de plus de 60% du lycopène a été observée après 8 semaines de stockage des carottes à 1 °C (Maiani et al., 2009).

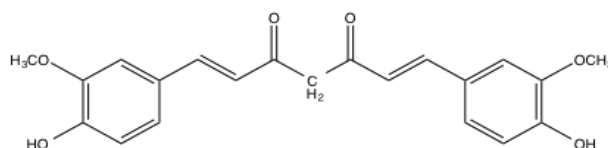
En résumé, les procédés de cuisson ou de transformation peuvent n'induire aucun changement du potentiel AOX, induire un accroissement de ce dernier, ou au contraire l'abaisser. Dans le premier cas, il peut n'y avoir aucun changement du profil chimique de l'aliment, ou alors une déperdition de certains composés AOX accompagnée de la néoformation de molécules elles-mêmes AOX contrebalançant cette perte. En cas d'augmentation de l'activité AOX, certaines molécules ont pu être rendues davantage accessibles, ou c'est encore la néoformation de composés AOX qui en est la source. Enfin, une baisse des capacités AOX peut être le fruit d'une perte des molécules AOX natives, ainsi que de la production de nouveaux composés pro-oxydants (Nicoli, Anese et Parpinel, 1999). L'ensemble de ces réactions est dépendante de la nature de l'aliment et du procédé de transformation.

## **1.6 Méthodes d'étude du potentiel anti-radicalaire des composés naturels**

L'étude du pouvoir anti-radicalaire d'un échantillon peut être abordée par de nombreuses techniques différentes, qui peuvent être séparées en 2 catégories : celles basées sur un mécanisme de transfert de proton (Hydrogen Atom Transfert : HAT) et celles qui mettent en évidence une réaction de type transfert d'électron (Electron Transfert : ET).

Ces deux mécanismes réactionnels aboutissent au même résultat, c'est-à-dire la neutralisation des espèces radicalaires mises en jeu dans la réaction, mais selon l'anti-oxydant considéré, les cinétiques d'ET et d'HAT seront différentes (Prior, Wu et Schaich, 2005). En effet, certaines molécules exerceront leur capacité piègeuse de radicaux préférentiellement par échange direct de protons, alors que d'autres passeront par un transfert d' $e^-$  pouvant être couplé dans un deuxième temps à un transfert de proton dans un solvant fortement accepteur de liaisons hydrogènes. La structure des anti-oxydants n'est pas le seul facteur influençant leur réactivité dans un sens ou dans l'autre. Le milieu réactionnel, c'est-à-dire la nature du solvant (polarité, pH etc.) serait également déterminante. Ainsi, le mécanisme HAT est

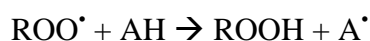
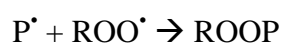
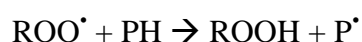
généralement favorisé dans les milieux apolaires (Foti, Daquino et Geraci, 2004). Il a été démontré par exemple que la curcumine réagit comme un puissant anti-radicalaire à travers une réaction HAT entre un pH 3 et 7. Le site donneur de proton dans ces conditions consiste en un CH<sub>2</sub> central qui présente deux atomes d'hydrogène labiles. Contrairement aux idées reçues, les deux cycles phénoliques ne participent que faiblement aux réactions anti-oxydantes impliquant la curcumine (Figure 1-34). En effet, ces derniers sont responsables d'une faible activité ET à pH basique, condition dans laquelle les réactions HAT n'ont plus lieu (Jovanovic et al., 1999).

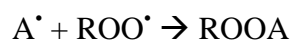


**Figure 1-34 : La curcumine**

Chaque méthode analytique se focalise donc sur l'un ou l'autre des mécanismes en détectant la capacité d'un échantillon de réduire un type particulier d'espèces radicalaires : radicaux peroxydes ; anion superoxyde ; oxygène singulet ; radical hydroxyle ou d'autres radicaux de synthèse utilisés pour faciliter leur détection de par la présence d'un chromophore.

Dans le cas des essais HAT, il s'agit principalement de réactions compétitives entre l'anti-oxydant et un substrat détectable vis-à-vis de radicaux peroxydes générés à partir d'un initiateur de radicaux de type azo, par dissociation thermique (Figure 1-35). Le substrat servira de sonde permettant de suivre la réaction. Parmi ces méthodes, on peut citer l'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), le TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter), le Crocin bleaching, mettant en jeu respectivement la fluorescéine, la R-phycoerythrin et la crocine en tant que sonde oxydable par les radicaux peroxydes initiés par la 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH). L'avantage de ces méthodes est la notion de cinétique, permettant de suivre et d'inclure dans l'interprétation des résultats des effets à la fois de latence de la consommation du substrat par les radicaux, mais également les variations de la vitesse de leur oxydation (Huang, Ou et Prior, 2005).





### Figure 1-35 : Oxydation compétitive entre une sonde (PH) et un anti-oxydant par des radicaux peroxydes

(D'après Huang, Ou et Prior, 2005).

( $ROO^{\bullet}$  : radical peroxyde ; PH : sonde oxydable; AH : Anti-oxydant)

Dans le cas des essais ET, il s'agit généralement de méthodes dites en lecture finale, qui mettent en jeu des radicaux facilement détectables par la présence d'un chromophore ou d'un fluorophore, qui est détruit par la réduction induite par un anti-oxydant (Figure 1-36).

Parmi ces méthodes, on peut citer la méthode des Polyphénols Totaux par Folin Ciocalteu, TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power), DPPH (Radical Scavenging Capacity Assay). Selon le radical utilisé, la réaction a lieu avec des cinétiques plus ou moins rapides. Dans le cas du DPPH, une durée importante est nécessaire pour aboutir à l'épuisement des anti-oxydants par leur oxydation, témoignant ainsi d'une cinétique très lente. Dans l'exemple du radical cation  $ABTS^{\bullet+}$ , impliqué dans la méthode TEAC, en quelques minutes, la majorité des molécules anti-radicalaires ont réagi, rendant cette technique très appréciable de par sa rapidité. En revanche, les essais basés sur l'ET reflètent en réalité la capacité réductrice des molécules, ne décrivant qu'une partie du mécanisme anti-oxydant possible (Huang, Ou et Prior, 2005). En effet, les effets chélateurs par exemple ne sont pas pris en compte.



### Figure 1-36 : Principe des méthodes ET

La grande majorité des méthodes d'évaluation du pouvoir anti-oxydant utilisent un référentiel commun, à savoir le Trolox (Figure 1-37). Il s'agit d'un analogue structural hydrosoluble de la vitamine E.

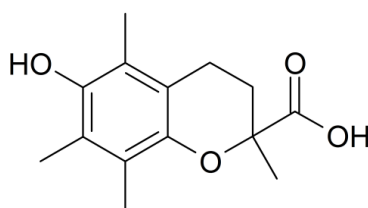


Figure 1-37 : Trolox

Enfin, d'autres méthodes permettent encore de mesurer spécifiquement le piégeage de certaines espèces réactives comme le radical hydroxyle (Hydroxyle Radical Scavenging Assay), l'oxygène singulet (Singlet Oxygen Scavenging Capacity Assay),

Toutefois, toutes ces méthodes basées sur la mise en évidence d'une réactivité chimique ne suffisent pas pour confirmer une bio-activité. En effet, il est indispensable de confirmer l'activité biologique par d'autres méthodes adaptées utilisant des modèles biologiques *in vitro* et/ou *in vivo*.

## 1.7 Homéostasie redox physiologique

Les concentrations intracellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont dépendantes à la fois de leur vitesse de production, mais aussi de leur élimination. En situation physiologique, il y a donc un équilibre maintenant des concentrations stables, tout en permettant une variabilité maîtrisée. Ainsi, ces entités réactives ne s'accumulent pas car elles sont majoritairement éliminées par le système enzymatique. Des variations sont cependant nécessaires, car les ROS ne sont pas seulement délétères pour de nombreuses cibles cellulaires, mais jouent également un rôle dans diverses voies de signalisation intracellulaire appelées signalisation redox. De cette manière, de nombreuses fonctions physiologiques sont en partie contrôlées par la variation des concentrations intracellulaires des ROS.

Une production de ROS peut alors être le résultat d'une régulation endogène transitoire du statut oxydatif, ayant pour objectif l'activation d'une voie de signalisation. Cependant, les réponses cellulaires peuvent également résulter de facteurs externes perturbant cet équilibre activant à tort ces différentes voies. Les régulations fines du statut oxydatif sont principalement contrôlées par des cytokines (ex : IL-1 $\beta$  ; IL-6 ; IL-3), des facteurs de croissance (ex : TNF- $\alpha$  ; NGF) ou encore certaines hormones. En effet, ces signaux cellulaires vont être à l'origine de la production de petites quantités de ROS à travers l'induction d'un burst oxydatif. Ces derniers agiront alors comme second messagers. Ainsi, les ROS vont pouvoir activer certains facteurs de transcription par exemple à travers des voies MAPK, comme le NF- $\kappa$ B intervenant dans la réponse inflammatoire (Valko et al., 2007).

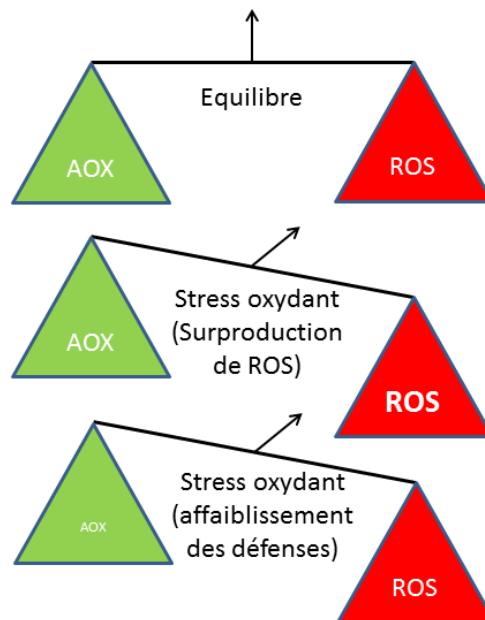
Un schéma général suggère une stimulation de la prolifération cellulaire en milieu réducteur, basculant vers la différenciation cellulaire dans un environnement légèrement oxydant. Plus le caractère oxydant s'accroît, plus les voies induisant l'apoptose et la nécrose seront stimulées (Valko et al., 2007).

Certains mécanismes comme l'inflammation et la défense vis-à-vis d'agents infectieux font notamment appel à une régulation volontaire de la balance oxydative par exemple.

L'activation de voies de signalisation par les ROS s'accompagne généralement d'une signalisation en cascade induisant l'augmentation de l'expression des enzymes constituant les défenses anti-oxydantes afin de permettre un retour à l'homéostasie redox. L'évaluation du statut redox a souvent été décrite par le ratio GSSG/2GSH, étant donné l'importance du glutathion en tant qu'anti-oxydant tampon (Valko et al., 2007).

## 1.8 Stress oxydant

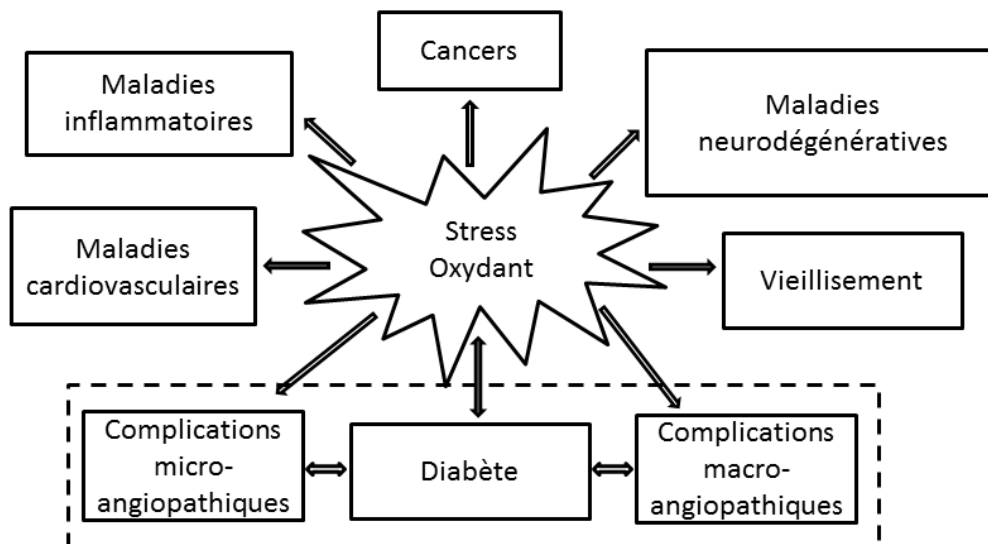
Le terme de stress oxydant peut se définir par la rupture de l'homéostasie redox. C'est-à-dire qu'une surproduction d'espèces radicalaires, ROS, NOS etc., ou alors un déficit des mécanismes de défense anti-oxydantes (enzymatiques ou non), ou enfin la combinaison de ces deux phénomènes aboutit à une surexposition des molécules biologiques cibles vis-à-vis des réactions oxydatives dommageables (Figure 1-38).



**Figure 1-38 : Le stress oxydant**

(D'après Scandalios, 2002)

En effet, l'accumulation d'entités oxydatives hautement réactives est généralement cytotoxique. Ainsi, une installation chronique d'un stress oxydant, comme c'est le cas dans de nombreuses pathologies comme le cancer, le diabète, les maladies neuro-dégénératives etc., peut à terme provoquer d'importantes altérations cellulaires et tissulaires (Figure 1-39).



**Figure 1-39 : La place centrale du stress oxydant au sein des pathologies**

## 1.9 Régulation de la glycémie et diabète

### 1.9.1 La régulation physiologique de la glycémie

Face aux besoins énergétiques des cellules de l'organisme pour assurer leurs fonctions, la régulation glycémique joue un rôle central. En effet, cette régulation, assurée principalement par deux hormones, l'insuline et le glucagon, permet de maintenir une glycémie entre 0,80 et 1,10 g/L.

Le foie et le pancréas agissent de concert dans la régulation glycémique. En effet, le foie est capable de stocker le glucose apporté par l'alimentation sous forme de glycogène par la glycogénogénèse. La synthèse de glucose à partir d'autres métabolites, dont certains acides aminés, est également possible à travers la néoglucogénèse. Le foie peut ensuite restituer le glucose en cas de besoin, c'est-à-dire quand la glycémie chute progressivement entre les repas, par la glycogénolyse. Enfin, le foie peut encore stocker ou déstocker le glucose respectivement par la lipogénèse et la lipolyse. Les messages sont donnés au foie par l'intermédiaire du pancréas grâce au glucagon, l'hormone hyperglycémisante, et à l'insuline, l'hormone hypoglycémisante. En effet, la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques est directement liée à la glycémie. L'insuline est sécrétée en cas d'augmentation de la glycémie, notamment après les repas, et va agir sur plusieurs enzymes inhibant la glycogénolyse et stimulant le stockage par la glycogénogénèse, résultant en une baisse du glucose circulant. Lors d'une baisse de la glycémie, il y a sécrétion du glucagon favorisant la glycogénolyse et la néoglucogénèse (Figure 1-40).

Ainsi, plusieurs hormones participent à la régulation de la glycémie mais seule l'insuline, est hypoglycémisante, et capable de mettre le sucre en réserve, ce qui la rend indispensable à la régulation de la glycémie.

Le diabète sucré est dû à un déficit de l'insuline (seule hormone hypoglycémisante).

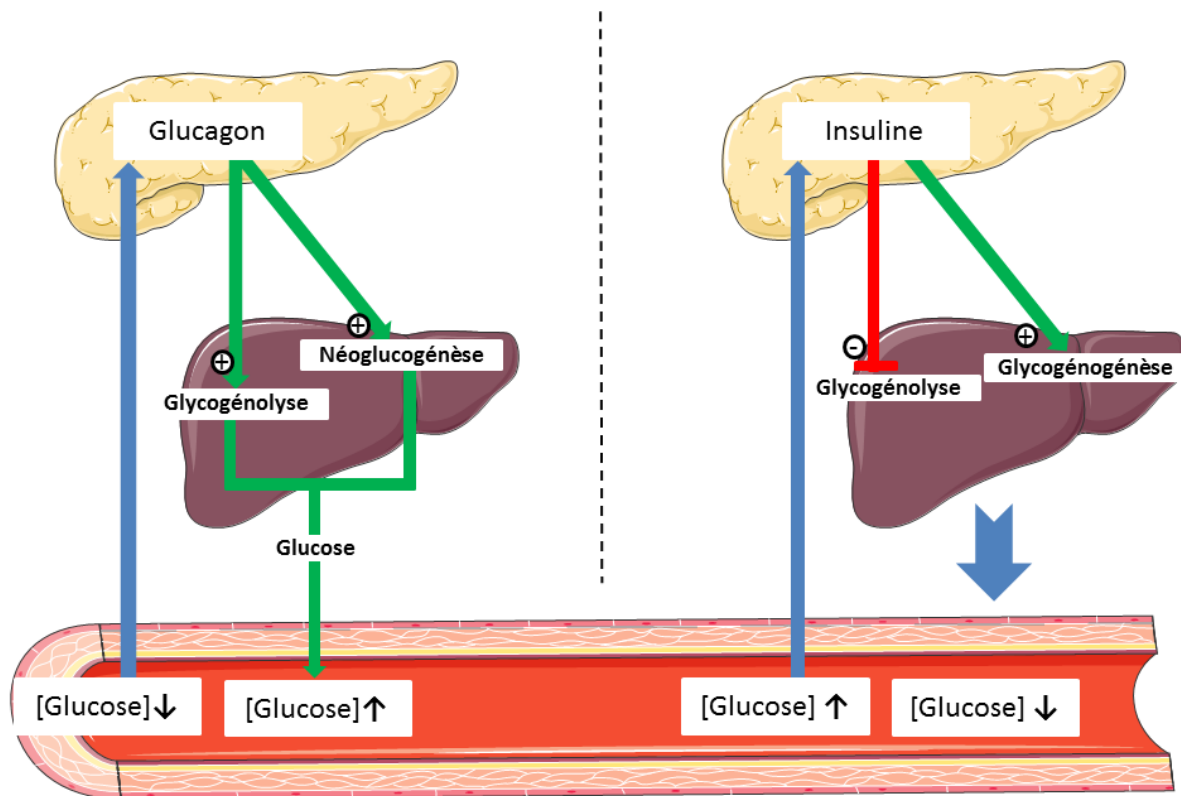


Figure 1-40 : La régulation glycémique

### 1.9.2 Le diabète : définition et épidémiologie

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique, et plus précisément par une glycémie plasmatique à jeun dépassant 1,26 g/L (Organisation Mondiale de la Santé : OMS), ou par une hyperglycémie provoquée par voie orale supérieure à 2,0 g/L 2 heures après ingestion de 75 g de glucose.

On distingue principalement deux formes de diabète :

- Le diabète de type 1 qui se caractérise par une carence, voire une absence de sécrétion d'insuline. Il s'agit dans ce cas de la conséquence de la destruction des cellules sécrétrices d'insuline, les cellules  $\beta$ -pancréatiques, par un mécanisme auto-immun. L'apparition du diabète de type 1 dépend de divers facteurs génétiques, impliquant notamment des allèles du complexe majeur d'histocompatibilité (Forbes et Cooper, 2013). La glycémie de patients souffrant du diabète de type 1 dépend ainsi essentiellement d'un apport exogène d'insuline.

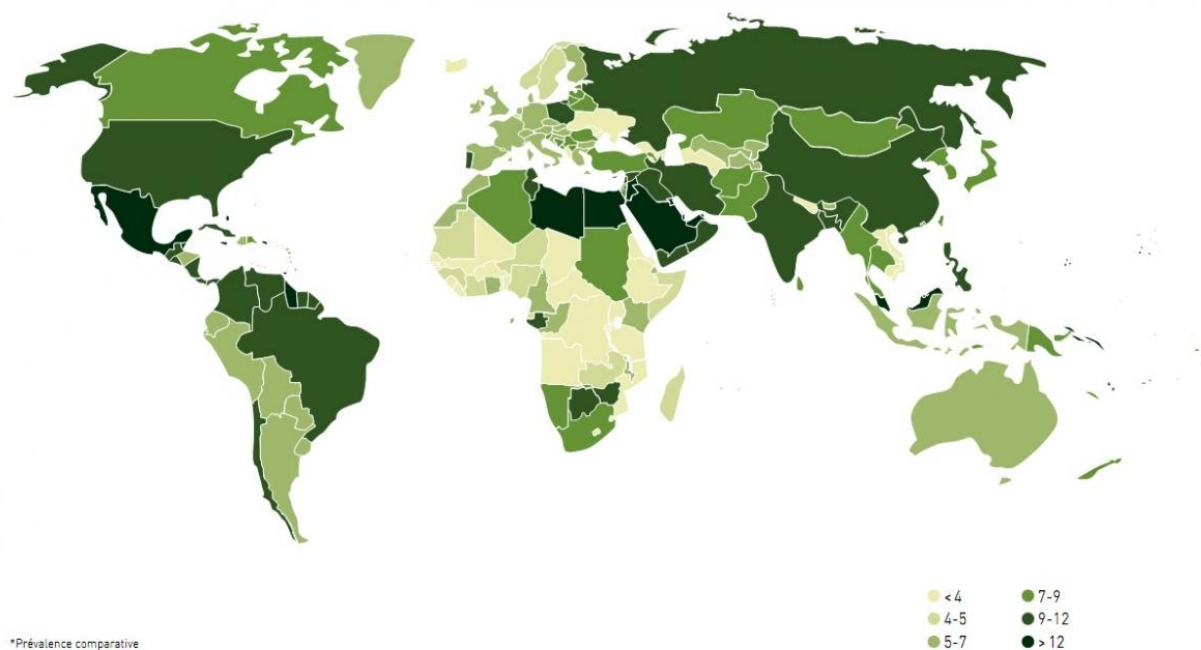


Le diabète de type 1 est minoritaire, représentant 6 % des cas traités en France (2011 ; Institut de veille sanitaire). Cette forme de la pathologie se déclare généralement à l'enfance ou l'adolescence.

- Le diabète de type 2 est lié à la fois à la désensibilisation des récepteurs à l'insuline, dit insulino-résistance, mais également au défaut de sa sécrétion à un stade plus avancé. Il s'agit de la forme la plus répandue, avec plus de 91,9 % des patients diabétiques. Le diabète de type 2 est d'origine polygénique et environnementale. Il survient classiquement chez l'adulte de plus de 40 ans présentant dans 55 % des cas une obésité (et dans 85 % des cas au moins une surcharge pondérale). Des prédispositions génétiques sont identifiées dans l'étiologie de cette maladie : avoir des membres de la famille (en particulier au premier degré) atteints de diabète de type 2 constitue un facteur de risque important pour en développer un également.

Avec un nombre de 347 millions de diabétiques dans le monde en 2011, cette pathologie n'épargne aucun pays (Figure 1-41) (Danaei et al., 2011). A l'origine, une progression exponentielle a été observée dans les pays développés, démontrant un lien direct entre le mode de vie et d'alimentation qui accompagnait l'industrialisation de ces pays. En effet, le développement de l'obésité, conséquence d'une sédentarité accrue et d'une alimentation déstructurée, est un élément qui va de pair avec le développement du diabète.

On comptait plus de 52 millions de patients diabétiques en 2011 au niveau européen, dont 3,2 en France. De plus, la progression s'intensifie d'année en année, comme le démontrent les prévisions alarmantes de plus de 3,8 millions de personnes atteintes en 2030 pour la France. L'OMS prévoit qu'en 2030, le diabète sera au 7<sup>ème</sup> rang des causes de mortalité. Les pays en voie de développement connaissent aujourd'hui également une forte hausse, imputable aux bouleversements des modes de vie, ainsi qu'à des prédispositions génétiques. A ces chiffres s'ajoutent encore les personnes non-diagnostiquées, ignorant donc leur maladie.



**Figure 1-41 : La prévalence du diabète dans le monde (%)**

(Source : [www.idf.org](http://www.idf.org))

En France, en 2006, le diabète a été déclaré comme cause de plus de 2% des décès, et ce taux s'élève à plus de 6% des décès lorsqu'on y associe ses complications. En effet, les complications du diabète sont multiples, et sont en réalité responsables de l'importante mortalité imputée au diabète.

Les complications du diabète sont soit d'ordre aiguë, à savoir l'hyper- ou l'hypoglycémie, soit d'ordre chronique donnant lieu à des lésions tissulaires. L'hyperglycémie chronique provoque ainsi à termes diverses complications principalement d'ordre micro- et macro-vasculaire. L'atteinte progressive des petits vaisseaux est notamment impliquée dans l'apparition de rétinopathies, neuropathies ou encore des néphropathies. Le diabète est notamment la principale cause de cécité chez l'adulte, car 60% des patients diabétiques de type 1 depuis plus de 20 ans présentent une forme de rétinopathie (Raccah, 2004). De même, après 35 ans de diabète de type 2, plus de 15% des patients développent une néphropathie. Les neuropathies sont également très fréquentes chez le patient diabétique (Raccah, 2004).

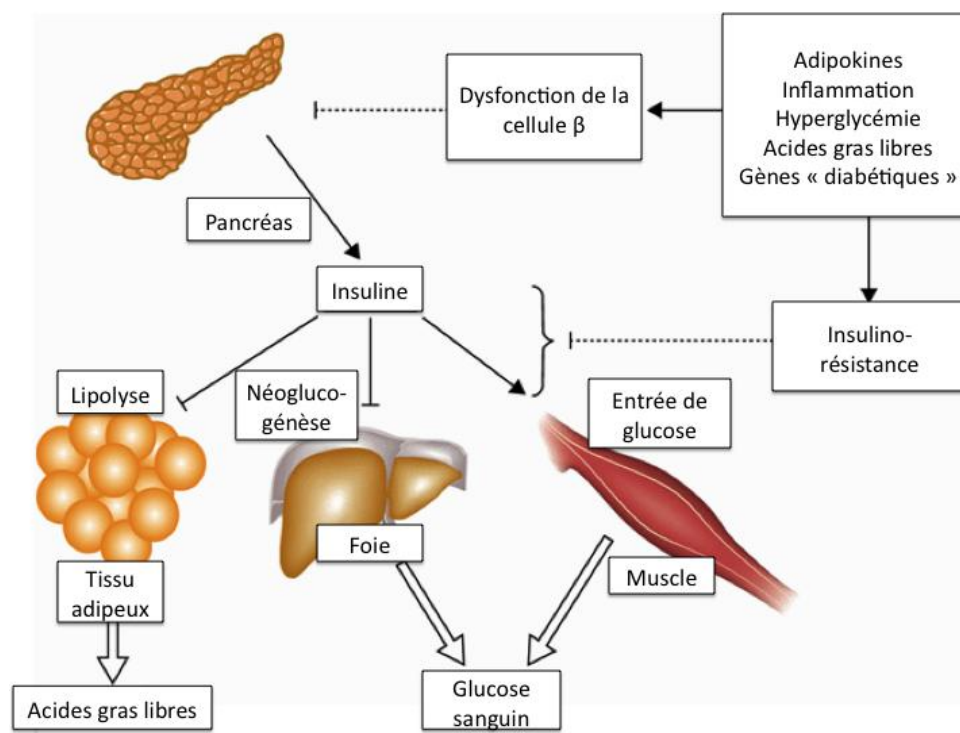
Lorsque les gros vaisseaux sont altérés, les conséquences peuvent être encore plus sévères (accidents vasculaires cérébraux ; infarctus du myocarde). Ces complications sont responsables de plus de 50% de la mortalité des patients diabétiques. En effet, le risque

d'infarctus d'un patient diabétique est équivalent à celui d'un individu non-diabétique ayant déjà subi une attaque (Forbes et Cooper, 2013).

Plus particulièrement, dans le cas du diabète de type 2, l'obésité et l'insulino-résistance favorisent l'accumulation de lipides dans le cytoplasme des hépatocytes à l'origine de la stéatose hépatique non alcoolique (Malaguarnera et al., 2009).

### 1.9.3 Physiopathologie et développement du diabète de type 2

Le diabète de type 2 associe deux mécanismes principaux : des anomalies de la sécrétion de l'insuline et l'insulino-résistance (Figure 1-42). Les anomalies de l'insulino-sécrétion sont à la fois qualitatives et quantitatives. Les premières anomalies de la sécrétion de l'insuline, pouvant apparaître à un stade précoce de la maladie, se manifestent généralement par la baisse de la réaction sécrétoire rapide après stimulation par le glucose apporté par un repas, appelé pic précoce de sécrétion. A un stade plus avancé, la sécrétion de l'insuline est altérée quantitativement suite à l'accentuation des atteintes des cellules pancréatiques pouvant aller jusqu'à l'insulinopénie profonde.



**Figure 1-42 : Obésité, insulino-résistance et hyperglycémie**

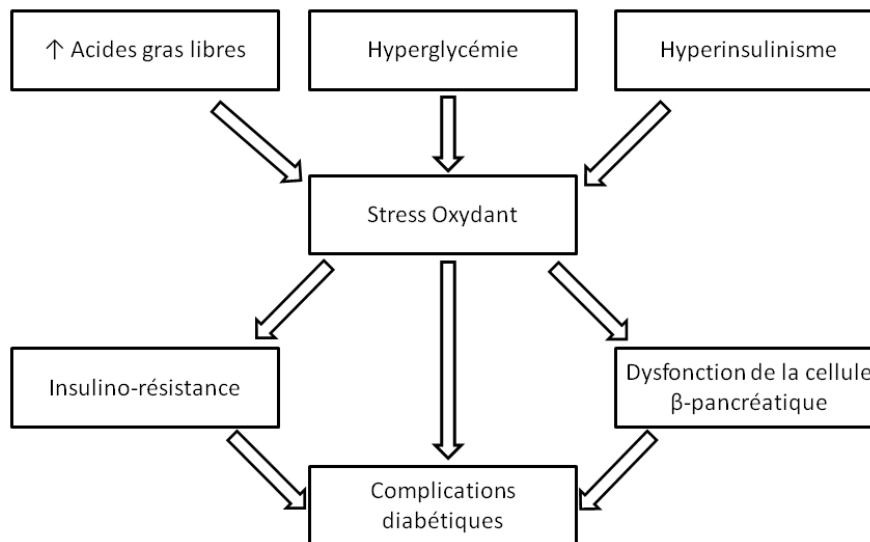
(D'après Stumvoll, Goldstein et van Haefen, 2005)

L'insulino-résistance, c'est-à-dire la réduction de l'effet hypoglycémiant produit par une sécrétion d'insuline, se manifeste de diverses manières selon le tissu considéré. Dans le

foie, elle se traduit par une hyperproduction de glucose due à la réduction de son inhibition normalement stimulée par l'insuline. De plus, souvent liée à l'obésité, l'hypertrophie du tissu adipeux viscéral induit notamment des taux importants d'acides gras libres (AGL) et de cytokines impliqués dans l'insulino-résistance. Il en résulte une tendance à l'augmentation de la glycémie, et une capacité réduite de l'organisme de réguler rapidement sa glycémie, ce que l'on appelle l'intolérance au glucose. L'intolérance au glucose est généralement considérée comme un état pré-diabétique. De plus, au niveau périphérique (muscles squelettiques et tissu adipeux), la réponse à l'insuline est altérée. Des anomalies de la translocation des transporteurs de glucose et de la phosphorylation du glucose stimulés par l'insuline sont notamment impliquées. A cela s'ajoute un mécanisme décrit comme le cycle de Randle (Magnan, 2006) qui suggère une utilisation préférentielle des acides gras plutôt que du glucose au niveau musculaire, inhibant encore la glycogénèse (Lewis et al., 2002; Reaven, 1988). Cependant, afin de palier à cette baisse de sensibilité vis-à-vis de l'insuline, on observe une période d'hyperinsulinisme, qui permet à l'organisme d'assurer en grande partie la régulation glycémique. Toute cette phase est souvent asymptomatique, et peut durer de 10 à 20 ans. Enfin, le pancréas ne pouvant plus assurer les besoins toujours croissant en insuline, l'insulino-déficience marque généralement le début des symptômes de cette pathologie, notamment les hyperglycémies chroniques.

#### **1.9.4 Stress oxydant et diabète de type 2**

De manière générale, le diabète implique des dérèglements du métabolisme. Or, la plupart des voies métaboliques annexes activées dans la pathologie du diabète sont accompagnées par une surproduction d'espèces oxydantes hautement réactives, mises en cause dans l'apparition des diverses complications (Figure 1-43). Les causes des complications et des pathologies associées au diabète sont d'une part des mécanismes directement oxydatifs du fait de l'état de stress oxydant chronique altérant les molécules biologiques, mais sont également les voies délétères pour les cellules activées par les ROS (Nishikawa, Edelstein et Brownlee, 2000).



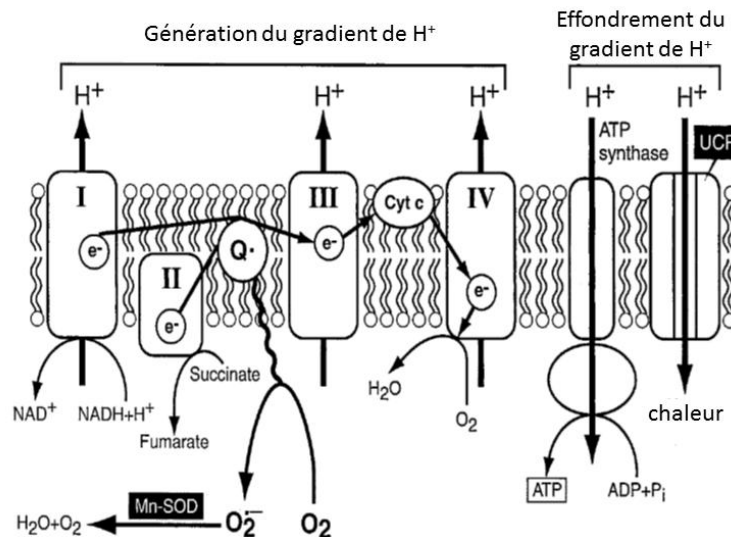
**Figure 1-43 : Les principales voies génératrices de complications diabétiques**

(D'après Evans et al., 2002)

#### **1.9.4.1 Production de ROS par la chaîne respiratoire induite par l'hyperglycémie**

Au niveau de la chaîne respiratoire, les métabolites issus du cycle de Krebs fournissent les électrons nécessaires au fonctionnement des pompes à protons permettant la mise en place d'un potentiel membranaire utilisé pour la synthèse d'ATP. Le transfert de ces électrons est assuré par les différents complexes au sein de la membrane mitochondriale interne. En cas d'hyperglycémie, l'oxydation du glucose est augmentée, provoquant la croissance du potentiel membranaire, qui, lorsqu'il atteint un seuil critique, bloque le transfert d' $e^-$  au niveau du complexe III. Les  $e^-$  non appariés échappent alors de l'ubiquinone pour produire l'anion superoxyde en réagissant avec l'accepteur final, l' $O_2$  (Figure 1-44) (Brownlee, 2001).

Dans les axones, la forte population de mitochondries et un accès direct au glucose peut expliquer l'apparition d'un stress oxydant en cas d'hyperglycémie. Ce stress peut provoquer la mitoptose à travers des dommages de l'ADN mitochondriale, et peut évoluer jusqu'à la mort cellulaire programmé à l'origine des neuropathies (Figuroa-Romero, Sadidi et Feldman, 2008).



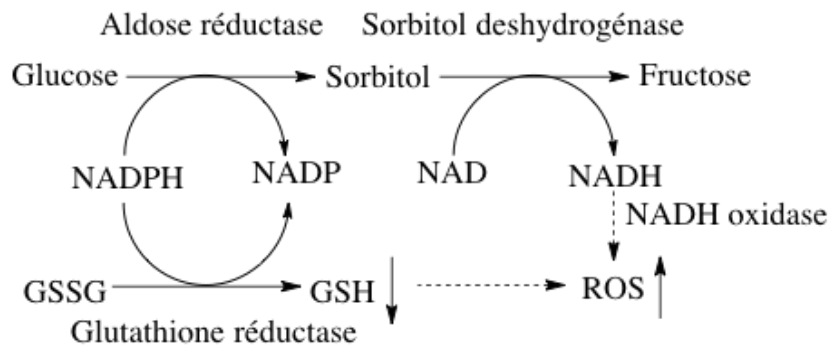
**Figure 1-44 : Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire**

(Brownlee, 2005)

Amplification de la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire induite par une entrée massive de glucose dans la cellule suivant un épisode hyperglycémique. (complexe I : NADH déshydrogénase ; complexe II : succinate déshydrogénase ; complexe III : ubiquinol-cytochrome c réductase ; complexe IV : cytochrome c oxydase ; Q<sup>•</sup> : ubiquinone ; Cyt C : cytochrome c ; Mn-SOD : Superoxyde dismutase) (Source : Brownlee, 2005)

#### 1.9.4.2 La voie des polyols

Dans les conditions d'hyperglycémie, on observe une augmentation de la conversion enzymatique du glucose en sorbitol par l'aldose réductase. Dans des conditions physiologiques, cette réaction a également lieu, mais due à la faible affinité de l'enzyme pour son substrat cette voie reste limitée (Defraigne, 2005). Ensuite, la sorbitol déshydrogénase (SDH) prend le relais en générant du fructose. Les activités enzymatiques de cette voie affaiblissent d'une part les défenses anti-oxydantes par la consommation du NADPH nécessaire à la régénération du GSH, et stimulent d'autre part la production indirecte de ROS par la NADH oxydase liée à l'accumulation de NADH (Figure 1-45). Un stress oxydant apparaît donc suite à l'affaiblissement des défenses anti-oxydantes et une surproduction des entités réactives (Baynes et Thorpe, 1999; Brownlee, 2001).



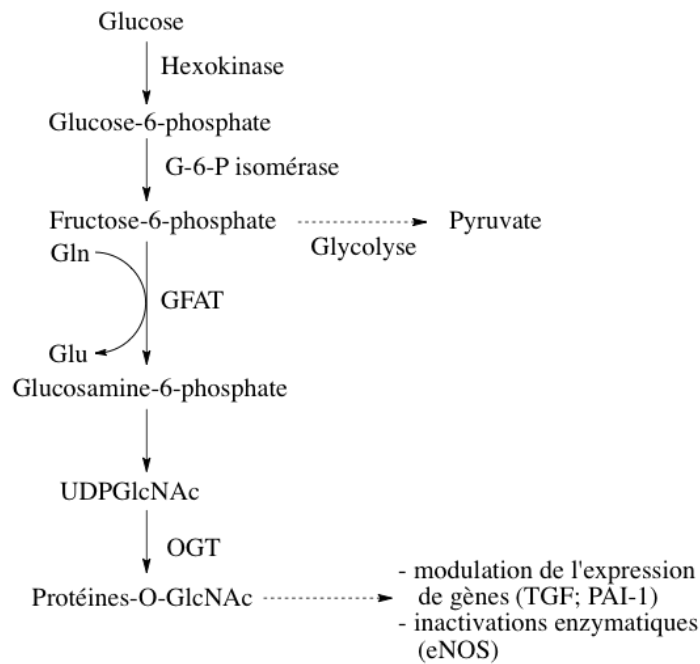
**Figure 1-45 : Voie des polyols**

(D'après Tang, Martin et Hwa, 2012)

L'activité accrue de la SDH favorise encore la formation des AGEs (Defraigne, 2005). Enfin, l'accumulation de sorbitol perturbe l'équilibre osmotique de la cellule et participe à la mise en place de l'insulino-résistance. Il a été démontré ainsi que la voie des polyols est une des causes principales de stress oxydant au niveau de la rétine des patients diabétiques (Chung et al., 2003).

#### 1.9.4.3 La voie des hexosamines

Une partie du glucose intracellulaire peut également être détournée de la glycolyse au profit de la voie des hexosamines. Cette voie, à travers la baisse de l'activité glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et l'activation de la glutamine:fructose-6 phosphate aminotransférase (GFAT), est à l'origine de l'O-acétylglucosamylation des protéines (Figure 1-46). Ceci peut résulter en la perte de leur fonction (Brownlee, 2001; Du et al., 2000). Par exemple, dans les cellules endothéliales, lorsque l'eNOS est concernée, elle est inactivée, ce qui entraîne une altération de la fonction endothéliale. De plus, l'augmentation des taux cytoplasmiques de glucosamine génère la production de  $H_2O_2$ . Ainsi, l'hyperglycémie conduit notamment à une perte de fonctionnalité des cellules  $\beta$ -pancréatiques, à travers ce mécanisme d'activation de la voie des hexosamines, productrice de ROS (Kaneto et al., 2001).



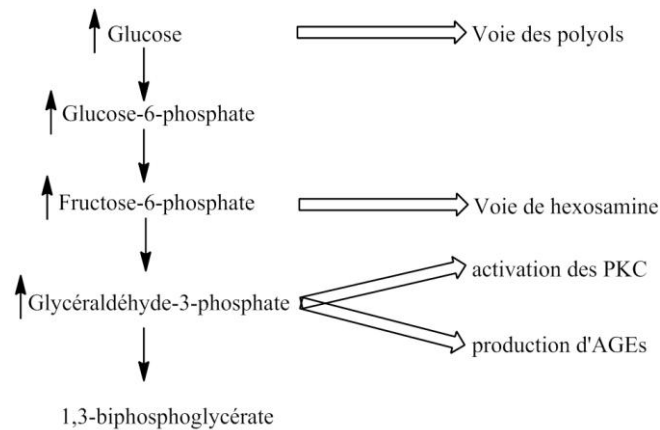
**Figure 1-46 : Voie des hexosamines**

(D'après Lima et al., 2012)

#### 1.9.4.4 La voie des protéines kinase C

L'hyperglycémie induit là encore la synthèse de diacylglycérol (DAG) soit à partir des métabolites intermédiaires de la glycolyse, soit indirectement par la production de ROS stimulant à leur tour la production de DAG. (Das Evcimen et King, 2007). L'accumulation de DAG initie l'activation de la voie des protéines kinases C (PKC) (Figure 1-47). D'une part, les PKC génèrent une surproduction d'anion superoxyde (Ceriello, 2003; King et Loeken, 2004). D'autre part, les PKC vont agir sur diverses voies de signalisation impliquées dans plusieurs complications diabétiques. Parmi celles-ci, les PKC réduisent l'expression d'eNOS dans les cellules endothéliales induite par l'insuline mise en cause de la dysfonction endothéliale.





**Figure 1-47 : Stimulation des voies cataboliques annexes de la glycolyse par l'hyperglycémie**

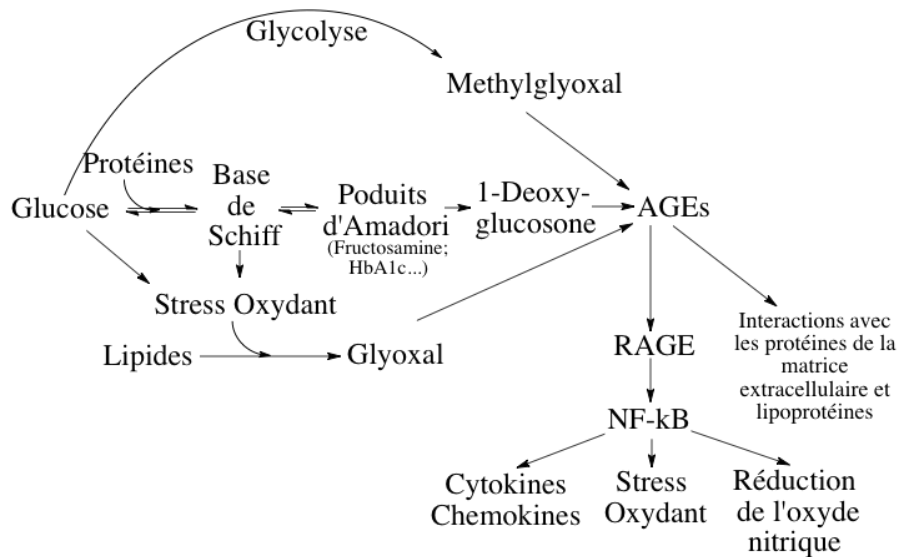
(Defraigne, 2005)

## 1.9.5 Cibles biologiques des réactions oxydatives

### 1.9.5.1 La formation des produits avancés de glycation (AGEs)

Les produits avancés de glycation (AGEs) sont le fruit des réactions non enzymatiques entre protéines et glucose. Cette chaîne de réactions est initiée en cas d'hyperglycémie par l'auto-oxydation du glucose aboutissant à la formation de composés dicarbonylés très réactifs. Ces derniers sont capables de réagir avec les groupements amines des protéines par des réactions non-enzymatiques pour former les AGEs, en passant par la génération de bases de Schiff et de produits d'Amadori (Figure 1-48). Dans des conditions physiologiques, cette production de bases de Schiff a également lieu, mais reste réversible. Une fois les produits d'Amadori formés, aucun retour n'est possible. La glycation protéique aboutissant aux AGEs est un processus très long pouvant prendre plusieurs mois. De plus, l'activation de la voie des polyols stimule également la formation d'AGEs due à l'accumulation du glycéraldéhyde-3-phosphate (G-3-P).

Les AGEs sont responsables d'effets délétères à plusieurs niveaux. D'une part, les protéines intra- et extra-cellulaires modifiées par les AGEs perdent leurs fonctions au moins partiellement (ex : collagène). La rigidification de la matrice extracellulaire par les AGEs est, par exemple, impliquée dans l'apparition de lésions rénales. D'autre part, différents types cellulaires comme les cellules endothéliales possèdent des récepteurs aux AGEs qui, lorsqu'ils sont activés, induisent directement une production de ROS, qui peuvent modifier l'expression de certains gènes (Brownlee, 2001).



**Figure 1-48 : Production des AGEs et conséquences cellulaires**

(D'après Meerwaldt et al., 2008)

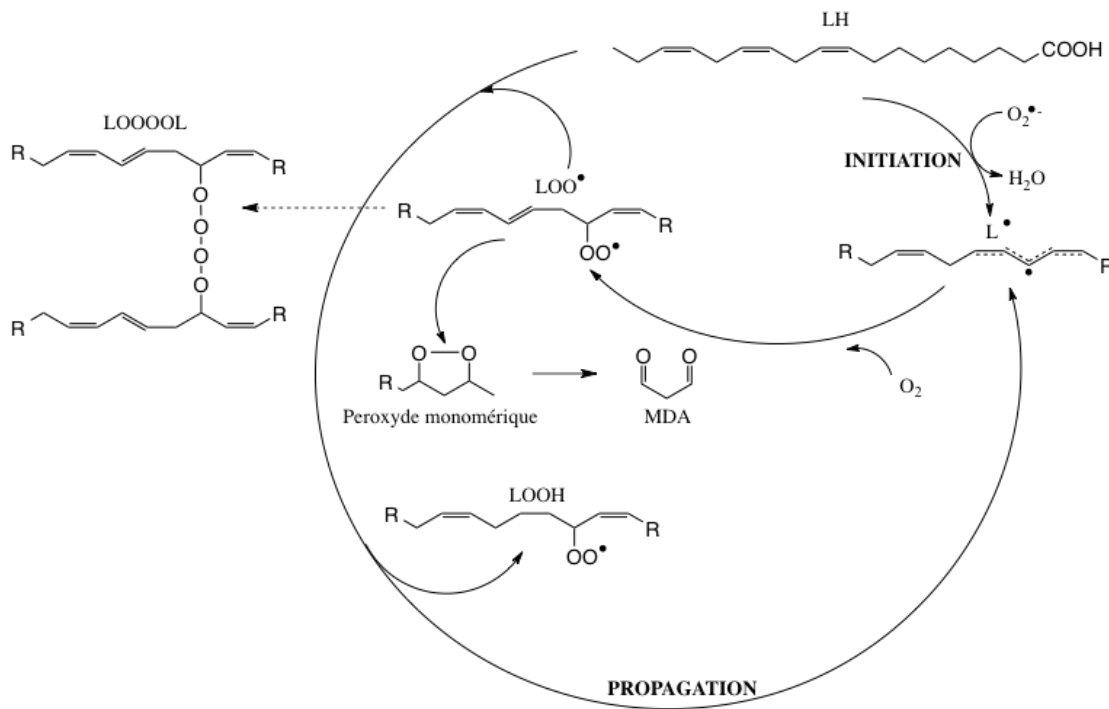
- Dommages de l'ADN :

Les altérations de l'ADN liées aux mécanismes oxydatifs dans le cas du stress oxydant sont de plusieurs types. Elles peuvent concerner des sites abasiques, des bases puriques ou pyrimidiques, et enfin peuvent donner lieu à des coupures simple ou double brin (Kryston et al., 2011). Une cible privilégiée des attaques oxydatives au niveau de l'ADN sont les guanines. En effet, on retrouve ainsi la 8-hydroxydéoxyguanosine (8-OHdG) notamment dans les urines suite aux réparations de l'ADN, qui représente un marqueur intéressant d'évaluation du stress oxydant (Wu, Chiou, et al., 2004). Ces modifications peuvent le plus souvent être réparées par les mécanismes d'excision de bases ou d'excision de nucléotides. Les lésions de l'ADN chez le patient diabétique peuvent être impliquées dans le vieillissement accéléré ou les micro-angiopathies, dont notamment les néphropathies (Ha et Kim, 1999).

- Peroxydation lipidique :

Les réactions de la peroxydation lipidique définissent un ensemble de réactions en chaîne dont le résultat se résume souvent à la production de malondialdéhyde (MDA), composé toxique pour la cellule. Cette suite de réactions est initiée comme la plupart des réactions d'oxydation biologiques par l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle, qui va arracher un proton à partir des lipides et plus particulièrement des acides gras polyinsaturés, donnant lieu à un radical lipidique (Figure 1-49). Ces radicaux lipidiques vont en milieu aérobie subir des réarrangements moléculaires, mais également permettre la génération de

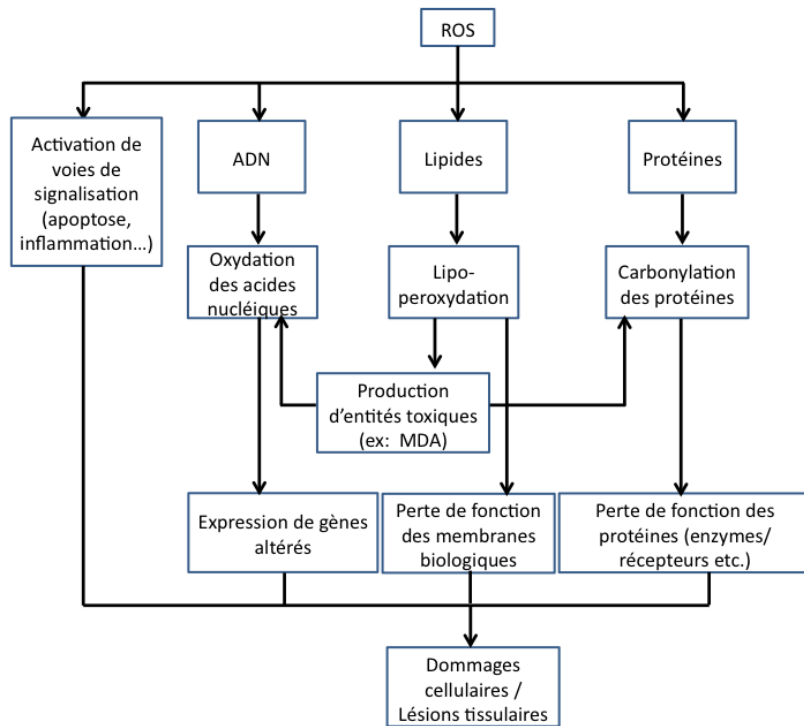
radicaux peroxydes par réaction avec l'O<sub>2</sub> dont le produit final est le MDA. Enfin, ces radicaux peroxydes peuvent soit polymériser entre eux, soit directement attaquer les molécules biologiques comme l'ADN ou les protéines, soit propager des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique en s'attaquant eux-mêmes aux acides gras (Halliwell et Chirico, 1993; Södergren, 2000). La peroxydation lipidique est en partie responsable de l'athérogénèse à l'origine des macro-angiopathies.



**Figure 1-49 : Peroxydation lipidique**

(D'après Chan et al., 2012)

Lors des épisodes chroniques de stress oxydant, les concentrations élevées des espèces radicalaires hautement réactives résultent en de nombreux dommages au niveau de la cellule, suite aux attaques sur les lipides, protéines et l'ADN (Figure 1-50). En parallèle à ces réactions en chaîne délétères pour les molécules biologiques nécessaires au bon fonctionnement cellulaire, les ROS et autres radicaux sont capables d'activer des voies de signalisation menant vers l'apoptose, l'inflammation etc. L'ensemble de ces événements génère à termes diverses altérations des tissus et/ou organes impliqués dans l'apparition des nombreuses complications du diabète.



**Figure 1-50 : Cibles des ROS**

(D'après Fulle et al., 2008)

### 1.9.5.2 Hyperinsulinisme et stress oxydant

L'hyperglycémie et l'hyperlipidémie ne seraient pas les seuls responsables des états de stress oxydant chroniques. En effet, l'hyperinsulinisme va aussi affaiblir les défenses anti-oxydantes de l'organisme, et stimuler la production d'entités oxydantes. L'insuline stimulerait la production de peroxyde d'hydrogène, et accélérerait ainsi la production du radical hydroxyle à travers la réaction de Haber-Weiss. Une croissance de l'activité NOS a également été associée à l'hyperinsulinisme. Il en résulte une surproduction de l'oxyde nitrique et de peroxy-nitrite, inhibant la CAT et la SOD, et favorisant la production d'anions superoxyde par la chaîne respiratoire (Facchini et al., 2000). Enfin, l'hyperinsulinisme inhibe l'activité du protéasome, favorisant l'accumulation des protéines oxydées.

### 1.9.6 Prévention du diabète de type 2 et de ses complications

Le diabète de type 2 passe par un processus long avant son installation définitive, tout comme les complications qui y sont liés. Des mesures de prévention de l'aggravation notamment de l'obésité viscérale ou du syndrome métabolique vers un diabète de type 2 peut être envisagée de plusieurs manières.

### ***1.9.6.1 Mesures hygiéno-diététiques (MHD)***

Le principal responsable incriminé pour induire le diabète de type 2 est la surcharge pondérale, et plus spécifiquement l'excès de tissu adipeux viscéral. Le principal objectif d'une prise en charge à travers une prise de mesures hygiéno-diététiques est donc logiquement la perte de poids. Il s'agit donc de changer les habitudes alimentaires, en rectifiant les apports caloriques quotidiens par rapport aux réels besoins énergétiques (une réduction entre 20 et 30%), mais surtout en fractionnant cet apport calorique sur 3 repas. De plus, la répartition des nutriments est généralement rectifiée pour être approchée de 50 % de glucides (en favorisant les sucres lents), 30 % de lipides (en favorisant les acides gras insaturés) et 20 % de protéines. A ces mesures alimentaires vont s'ajouter l'exercice physique qui joue un rôle déterminant dans la régulation de l'équilibre glycémique. En effet, le sport favorise l'utilisation directe du glucose par le tissu musculaire, et améliore la sensibilité à l'insuline. Le tabagisme est encore un facteur aggravant l'insulino-résistance, et peut donc aussi faire l'objet de mesures d'hygiène. Enfin, l'alcool consommé en trop grande quantité est néfaste de par son fort caractère calorique. Toutefois, il semble qu'une consommation modérée présente des bénéfices métaboliques (Scheen AJ 2005).

L'ensemble des différentes MHD ont déjà prouvé leur efficacité à travers diverses études. En effet, l'étude finlandaise de prévention du diabète de type 2 a démontré une réduction de plus de 50% du risque de développement d'un diabète de type 2 par des MHD au bout de 2 ans (suivi diététique et exercice physique) chez des sujets obèses et intolérants au glucose (Alberti KGMM et al 2007). L'étude Malmö a également révélé que le changement de style de vie chez des sujets diabétiques de type 2, ou intolérants au glucose réduit considérablement la mortalité. 12 ans après le début de l'étude, les sujets intolérants au glucose soumis aux MHD ne présentent pas de différence en termes de mortalité par rapport aux sujets témoins sains, alors que leur mortalité est 2 fois plus élevée s'ils ne sont pas soumis aux MHD (Alberti KGMM et al 2007). De plus, une réduction du nombre de sujets ayant développé un diabète de type 2, ainsi qu'une amélioration de la tolérance au glucose est également observée.

### ***1.9.6.2 Anti-diabétiques oraux (ADO)***

Il existe différents types de médicaments rangés sous le nom d'anti-diabétiques oraux, mais les mécanismes d'action sont très différents. Ces traitements sont généralement prescrits chez le patient diabétique de type 2 avant le stade insulino-requérant.

Parmi ceux-ci, les biguanides améliorent la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique, permettant ainsi de limiter la néoglucogénèse, et stimulent l'utilisation du glucose dans les tissus périphériques. Cette action est liée d'une part à l'activation de la glycogène synthase, et d'autre part à l'augmentation de l'entrée du glucose dans les cellules par stimulation des transporteurs GLUT. Il s'agit généralement de médicaments de première intention dans le cas d'un diabète de type 2 ou d'un pré-diabète, qui sont utilisés lorsque les mesures hygiéno-diététiques ont échouées, afin d'améliorer la régulation glycémique. Ils peuvent également être prescrits dans un cas de diabète de type 1, en parallèle à l'insulinothérapie. Les glitazones, aujourd'hui interdits, sont des agonistes des récepteurs PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), qui permettent, chez le patient diabétique de type 2, d'améliorer la sensibilité à l'insuline au niveau du tissu adipeux, des muscles et du foie. Enfin, les sulfamides hypoglycémisants et les glinides agissent directement sur les cellules  $\beta$  au niveau du pancréas en provoquant une dépolarisation membranaire à l'origine de l'insulino-sécrétion.

### **1.9.7 Prévention du stress oxydant par les anti-oxydants d'origine naturelle**

D'autres mesures préventives peuvent encore être envisagées. De nombreuses études se sont intéressées au potentiel protecteur des molécules anti-oxydantes naturelles dans le cas du diabète. Parmi ces recherches, la plupart se focalisent sur l'administration d'une dose particulière d'une molécule seule, comme la vitamine E par exemple. Dans certaines de ces études, de réelles bio-activités bénéfiques pour la santé en général, ou particulièrement dans la prévention du diabète de type 2 ont pu être mises en évidence. Or, ces mêmes molécules se trouvent dans les aliments communs comme les fruits et légumes, et donc sous forme d'un mélange complexe. Toutefois, rares sont les études portant directement sur l'effet de la consommation de ces aliments à potentiel anti-oxydant.

#### ***1.9.7.1 Effet d'une supplémentation de vitamine E sur l'incidence et les conséquences du diabète de type 2***

Il a été démontré qu'une supplémentation alimentaire par la vitamine E chez des sujets présentant un diabète de type 2, permet, à des doses quotidiennes élevées (250 à 800 mg/jr), de réduire les phénomènes inflammatoires (Devaraj et Jialal, 2000; Upritchard, Sutherland et Mann, 2000). Elle induit de plus une baisse significative des complications cardiovasculaires (Milman et al., 2008), et améliore les défenses anti-oxydantes, notamment en augmentant la résistance vis-à-vis de l'oxydation des LDL (Neri et al., 2005; Upritchard, Sutherland et

Mann, 2000) ou encore en réduisant la glycation protéique (Ceriello et al., 1991). Par ailleurs, une étude a démontré une corrélation entre des faibles concentrations plasmatiques de vitamine E et une incidence du diabète de type 2 près de 4 fois supérieure à la normale. Ces résultats suggèrent encore le rôle du stress oxydant dans l'étiologie du diabète de type 2, et donc l'intérêt des molécules anti-oxydantes.

D'autres études suggèrent au contraire l'inefficacité de cette supplémentation en vitamine E sur l'incidence du diabète. L'étude SU.VI.MAX (Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants) a notamment démontré l'absence d'effet après 7 ans et demi de supplémentation sur la glycémie à jeun d'une population ayant un comportement alimentaire général sain (Czernichow et al., 2006). Cependant, dans cette étude, la vitamine E a été administrée à une dose quotidienne beaucoup plus faible que dans les études décrites plus haut (environ 10 fois moins), et elle était associée à d'autres anti-oxydants.

#### *1.9.7.2 Les fruits et légumes et le diabète de type 2*

Plusieurs études ont été menées afin d'évaluer la possibilité d'un effet bénéfique de la consommation de fruits et légumes et l'incidence du diabète de type 2. Parmi celles-ci, certaines n'attestent d'aucun effet bénéfique significatif d'une alimentation riche en fruits et légumes vis-à-vis du diabète (Liu et al., 2004)(Carter et al., 2010). Par contre, d'autres études ont démontré que le risque de développer un diabète semble considérablement réduit grâce à la consommation régulière de fruits et légumes (Ford et Mokdad, 2001). Il y aurait en outre une tendance bénéfique d'une alimentation riche en légumes-feuilles verts. Par ailleurs, un lien a pu être établi entre des concentrations plasmatiques élevées de vitamine C, utilisée comme marqueur de la consommation de fruits et légumes, et la réduction de l'incidence du diabète de type 2 (Harding et al., 2008). Enfin, le régime méditerranéen associant une forte consommation de fruits et légumes, d'huile d'olive ou encore de poisson, a également été associé à un risque de diabète réduit (Martinez-Gonzalez et al., 2008).

Les différentes études épidémiologiques peuvent ainsi être contradictoires, ou peu affirmatives quant au potentiel préventif des fruits et légumes, mais suggèrent toutefois une tendance positive sur la santé de manière générale.

L'administration de fruits ou légumes spécifiques chez l'homme a parfois permis de mieux rendre compte de leur potentiel protecteur. Par exemple, l'administration d'une dose quotidienne de lyophilisat de fraise ou de boisson à base de fraises pendant plusieurs semaines, respectivement chez des femmes présentant un syndrome métabolique et chez des hommes et femmes hyperlipidémiques, a permis de réduire des phénomènes oxydatifs

néfastes (Basu et al., 2009; Burton-Freeman et al., 2010). La diminution des dommages oxydatifs de l'ADN a également été observée chez des hommes et femmes âgés après 2 semaines de consommation d'une ration quotidienne de jus de cerise (Traustadóttir et al., 2009). Le jus de tomate a encore révélé des effets anti-oxydants et anti-inflammatoires similaires à ceux décrits précédemment pour la vitamine E chez des patients diabétiques de type 2 (Upritchard, Sutherland et Mann, 2000).

### ***1.9.7.3 Etudes in vivo du potentiel préventif des fruits et légumes vis-à-vis du diabète et du stress oxydant sur un modèle animal***

Les bienfaits de la consommation de divers fruits et légumes dans le cas du diabète a fait l'objet de plusieurs études *in vivo* chez l'animal (Tableau 1-3). Ces recherches ont principalement été menées sur un modèle de rat rendu diabétique par un agent diabétogène comme la streptozotocine (STZ) ou l'alloxane. Ce sont des molécules particulièrement toxiques pour les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Les F&L sont généralement administrés sous forme d'extraits, de lyophilisats ou encore de jus. Pour bon nombre d'entre eux, il en ressort une amélioration des paramètres du statut oxydatif, démontrée par l'évaluation du niveau de peroxydation lipidique, des lésions de l'ADN, de l'activité des enzymes anti-oxydantes ou encore la formation des AGEs. Ces phénomènes ont par exemple été démontrés dans le cas de l'asperge, l'oignon, l'ail, le chou rouge, le radis noir, la fraise, la cerise etc. Des effets sur la pathologie même du diabète ont également pu être observés. Divers aliments semblent ainsi améliorer la régulation glycémique, la tolérance au glucose, la fonctionnalité des cellules  $\beta$ -pancréatiques sécrétrices d'insuline. Toutefois, ces modèles ne sont certainement pas les plus pertinents quand il s'agit du diabète de type 2. D'autres études se basent ainsi sur un modèle de rat rendu hyperlipidémique par une alimentation riche en matière grasse : High Fat Diet (HFD). La supplémentation d'une telle alimentation par de l'oignon, de l'ail, de la fraise ou encore du jus de radis noir a ainsi entraîné une diminution du stress oxydant et de ses effets délétères, voire une inhibition des phénomènes inflammatoires (Tableau 1-2). L'utilisation de ces modèles de stress oxydant induits par l'alimentation dans l'étude des effets préventifs des fruits et légumes reste cependant moins fréquente.



**Tableau 1-2 : Etudes in vivo des effets bénéfiques des fruits et légumes vis-à-vis du diabète et du stress oxydant.**

Étude	Produit étudié	Dose administrée	Effets observés	Ré
STZ)	Extrait méthanolique	500 mg/kg/jr (28 jrs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ La fonctionnalité des cellules β pancréatiques</li> <li>• ↓ L'hyperglycémie</li> <li>• Améliore le statut oxydatif</li> </ul>	(H 20
STZ)	Poudre d'oignon lyophilisée (voie orale)	8 jrs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Améliore la régulation glycémique</li> </ul>	(B;
STZ)	Extrait d'oignon (intubation gastrique)	500 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Améliore la tolérance au glucose (après ingestion d'amidon)</li> </ul>	(K;
STZ)	Lyophilisat d'oignon (6%) + ND (voie orale)	12 semaines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ L'hyperglycémie</li> <li>• ↓ Le stress oxydant (TBARS ; 8-OHdG)</li> </ul>	(A)
h Fat )	5% d'oignon	4 semaines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Le stress oxydant (TBARS)</li> <li>• ↓ L'activité NADH oxydase</li> </ul>	(Y;
STZ)	Extrait d'ail	0,1 ; 0,25 ou 0,5 g/kg/jr (14 jrs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ La glycémie sérique</li> <li>• ↓ Les triglycérides sériques</li> <li>• ↓ Le cholestérol sérique</li> </ul>	(Ei)
e)	Jus d'ail	4g/kg (4 semaines)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxydant</li> <li>• ↓ L'hyperglycémie</li> </ul>	(Ei) N <sub>e</sub>
STZ)	Extrait d'ail	100 mg/kg/jr (8 semaines)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Améliore la dysfonction endothéliale</li> </ul>	(B; 20
	2% d'ail	8 semaines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Le stress oxydant (peroxydation lipidique)</li> </ul>	(K; 20
B e)	Extrait de la peau de courgette	250 ou 500 mg/kg /jr (15 jrs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ La glycémie</li> <li>• ↑ L'insulinémie</li> <li>• ↓ L'cholestérol ; et triglycérides</li> </ul>	(D
B e)	Extrait de la peau de concombre	250 ou 500 mg/kg /jr (15 jrs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ La glycémie</li> <li>• ↓ L'cholestérol ; et triglycérides</li> </ul>	(D

Produit étudié	Dose administrée	Effets observés	Références
Extrait de chou rouge (voie orale)	1g/kg/jr	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ La glycémie</li> <li>• Améliore la fonction rénale</li> <li>• ↓ La peroxydation lipidique</li> <li>• ↑ L'activité des enzymes anti-oxydants (CAT ; GPx ; SOD)</li> </ul>	(Kataya et al)
Extrait aqueux de radis (voie orale)	800 ou 1600 mg/kg/jr (14 jours)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ L'holostérol ; et triglycérides</li> <li>• Pas d'effet sur la glycémie</li> </ul>	(Dehghani, 2012)
Jus de radis noir (voie orale)	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ peroxydation lipidique</li> <li>• Améliore le statut anti-oxydant plasmatique</li> </ul>	(Lugasi et al)
Poudre de fraise (voie orale)	24 semaines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Inflammation (Protéine C réactive CRP)</li> <li>• ↓ La glycémie</li> </ul>	(Parelman et al)
Extrait éthanolique de cerise (voie orale)	200 mg/kg/jr (30 jrs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ La glycémie</li> <li>• Améliore la fonction rénale</li> </ul>	(Lachin et R)
Apigénine extraite du céleri-rave (voie orale)	0,78 mg/kg/jr (10 jrs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ La sécrétion d'insuline</li> <li>• ↓ La peroxydation lipidique</li> <li>• ↑ L'activité des enzymes anti-oxydantes (CAT ; SOD ; GSH)</li> </ul>	(Panda et K)
Phlorodizine (polyphénol de pomme) (voie orale)	5 ; 10 ; 20 ; 40 mg/kg (21 jrs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ TG, LDL, VLDL sériques</li> <li>• ↓ Prise alimentaire</li> <li>• ↓ Poids</li> <li>• ↓ La glycémie</li> </ul>	(Najafian et al)
Extrait de haricot-verts (voie orale)	200 mg/kg/jr (45 jrs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ La formation d'AGEs (↓ collagène ramifié)</li> </ul>	(Pari et Ven)
Extrait de tomate (lycopène)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Peroxydation lipidique</li> <li>• ↓ La glycémie</li> <li>• Améliore l'insulino-sécrétion</li> <li>• ↑ L'activité des enzymes anti-oxydantes (CAT, SOD, GPx)</li> </ul>	(Ali et Agha)
Extrait aqueux d'échalote (voie orale)	1g/kg	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Améliore la tolérance au glucose (OGTT)</li> </ul>	(Survay et al)
Extrait aqueux d'échalote (voie orale)	500 mg/kg/jr (8 semaines)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ La glycémie</li> </ul>	(Jalal et al., 2012)

## 1.10 Objectifs des travaux de thèse

Mon travail de thèse, visant à compléter les connaissances en matière de prévention du diabète de type 2 et du stress oxydant, porte sur le potentiel anti-oxydant des aliments et plus précisément les fruits et légumes.

Ainsi, le premier objectif de cette étude a consisté en la mise au point, ou l'optimisation de méthodes analytiques permettant de réaliser un screening des aliments focalisé sur l'évaluation de leur potentiel anti-oxydant. Dans cette optique, le premier objectif consistait en l'étude du pouvoir anti-radicalaire total des extraits de fruits et légumes à travers des méthodes classiques, afin de permettre un premier classement de ces aliments. Cette étude a ensuite été poursuivie par une approche cherchant à déterminer sélectivement quelles molécules présentes au sein des fruits et légumes sont réellement impliquées dans les réactions chimiques anti-radicalaires, et de quantifier spécifiquement leur activité plutôt que leur concentration.

Le second objectif de cette étude consistait en l'évaluation du potentiel protecteur des extraits étudiés vis-à-vis d'une situation de stress oxydant sur un modèle biologique *in vitro*. Il s'agissait donc de confronter les potentiels anti-radicalaires des extraits déterminés par l'approche analytique, à un modèle permettant de vérifier que ceux-ci se traduisent par une activité biologique. Pour ce faire, nous avons cherché à mettre en place et à utiliser un modèle d'étude pertinent dans le contexte de la pathologie du diabète de type 2.

Enfin, le dernier objectif de cette étude a consisté à valider le potentiel anti-oxydant des aliments sélectionnés à l'issue des phases précédentes vis-à-vis du stress oxydant et du diabète sur un modèle biologique de diabète de type 2 *in vivo*. Il s'agissait donc, dans un premier temps de mettre en place un modèle animal de diabète de type 2 pertinent, puis de l'appliquer à l'étude de l'impact des fruits et légumes sélectionnés.

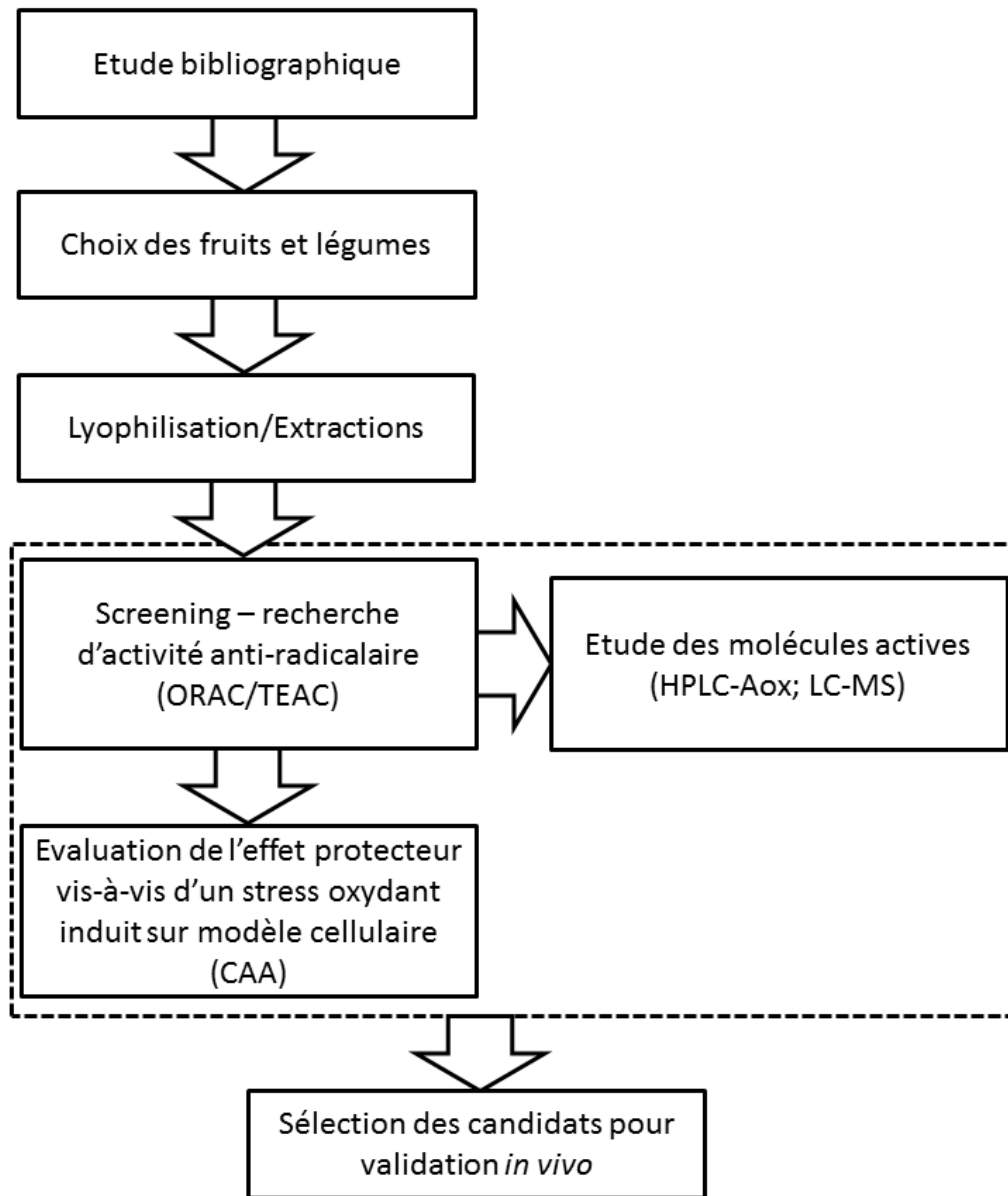


## **2 Démarche expérimentale**

Nous avons focalisé nos efforts sur des produits qui font partie de notre alimentation quotidienne, en ciblant plus particulièrement les composés dotés de capacité anti-radicalaires, tout en gardant à l'esprit le potentiel préventif de certains aliments vis-à-vis du stress oxydant. Pour ce faire, nous avons tout d'abord abordé un premier volet analytique, qui vise à étudier la capacité chimique des molécules contenues dans un extrait de fruit ou de légume à réduire les radicaux libres. C'est ainsi qu'une première classification des échantillons a pu être réalisée. Le second volet s'intéresse à l'évaluation de l'activité biologique de ces extraits *in vitro* sur un modèle de culture cellulaire, permettant d'affiner davantage la classification. L'ensemble des résultats obtenus lors de ces 2 phases permet ensuite de sélectionner les échantillons candidats dont l'effet préventif vis-à-vis du stress oxydant et du diabète de type 2 sera évalué sur un modèle animal rendu diabétique par une approche alimentaire.

Dans le cadre du projet EVA, 14 fruits et légumes ont été sélectionnés. Les échantillons ont dans un premier temps été étudiés pour en déterminer un potentiel anti-radicalaire chimique global, mettant en œuvre deux méthodes, parmi les nombreuses décrites dans la littérature, dans le but de classer les aliments étudiés. Puis nous avons approfondi ces résultats en recherchant quels composés au sein de ces échantillons sont réellement impliqués dans les réactions anti-radicalaires. Pour ce faire, nous avons optimisé une méthode couplant une technique séparative moléculaire à un système de détection spécifique des molécules actives en termes de piégeage des espèces radicalaires (Koleva, Niederländer et van Beek, 2001). Une première application de cette approche a été l'étude des composés anti-oxydants du café et leur devenir au cours du processus de torréfaction. Il s'agissait de déterminer les conditions de torréfaction (température, durée) permettant de préserver au mieux l'activité anti-radicalaire des composés du café. Puis dans le cadre du projet EVA, nous nous sommes intéressés aux fruits et légumes régionaux, avec pour contexte la prévention du stress oxydant dans l'obésité et le diabète de type 2, ainsi que les complications qui y sont associées. Ce projet ne s'arrête donc pas à la détection et la quantification d'un pouvoir anti-radicalaire et à l'identification des molécules actives d'un aliment. Nous avons également confirmé la réactivité chimique d'un point de vue biologique *in vitro* et *in vivo*. Des tests d'évaluation de l'effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress oxydant induit sur un modèle cellulaire ont servi dans un second volet de méthode de classement des aliments. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces deux premières étapes du projet EVA, ont permis de sélectionner les candidats parmi les fruits et légumes en vue d'une validation des effets préventifs ou curatifs liés à leur consommation par le biais d'un modèle *in vivo* (Figure 2-1). Ainsi, nous avons évalué

l'impact d'une intervention nutraceutique ou hygiéno-diététique basée sur la consommation de F&L, sur un modèle animal de rat présentant un syndrome métabolique induit par une approche alimentaire (progressant vers un diabète de type 2). Divers paramètres métaboliques, et indicateurs de stress oxydant ont fait l'objet de cette étude, en parallèle aux évaluations des atteintes tissulaires liées au stress oxydant.



**Figure 2-1 : Objectifs du projet EVA**





# **3 Matériels et méthodes**

## 3.1 Etude du potentiel anti-radicalaire des aliments

### 3.1.1 Matières premières – préparation des échantillons

#### 3.1.1.1 Le café

Un café vert *Arabica* de crible 17/18 et de production brésilienne (Santos, Sul de Minas) nous a été fournis par Café Reck (Strasbourg, France). Des fractions aliquotes de 100 g ont été préparées puis torréfiées à différentes températures (200 °C ; 225 °C ou 235 °C), et cela pendant des durées différentes (5; 10; 15; 20; 25 ou 30 minutes), à l'aide d'un torréfacteur CBR-101A *Gene Cafè* (Séoul, Corée du Sud). Nous considérerons les échantillons torréfiés à 200 °C, 225 °C et 235 °C respectivement comme légèrement, moyennement ou intensément torréfiés. Après la torréfaction, suit une période de maturation d'une semaine, pendant laquelle les échantillons sont conservés à température ambiante avant d'être cryo-broyés au moyen d'un 6870 Freezer/Mill (Spex CertiPrep, Stanmore, Grande Bretagne). Les échantillons sont pour cela plongés dans l'azote liquide et subissent 3 répétitions d'un cycle de broyage de 5 minutes à 24 cp/s. Les poudres ainsi obtenues ont été stockées à -20 °C jusqu'à leur analyse.

La fraction polyphénolique du café a été extraite grâce à un extracteur ASE 350 Dionex (Accelerated Solvent Extractor) (Sunnyvale, Etats-Unis). Pour chaque échantillon, cette opération a été réalisée en triplicat. Une cellule ASE en acier inoxydable de 5 mL a pour cela été remplie de 1 g de poudre de café dispersée dans une quantité suffisante de sable de fontainebleau pour remplir la cellule ASE. Une première étape de dégraissage au dichlorométhane est réalisée par 3 répétitions d'un cycle à 80 °C et un temps statique de contact de 5 minutes. Puis les polyphénols totaux ont été extraits par 5 répétitions de cycle d'extraction au méthanol (MeOH) à 80 °C avec un temps statique de contact de 5 minutes. Les 5 extraits obtenus correspondant à chaque cycle sont ensuite regroupés, puis le volume final a été ajusté à 50 mL.

#### 3.1.1.2 Les fruits et légumes d'Alsace

Suite à une étude bibliographique focalisée sur la composition des fruits et légumes en anti-oxydants naturels, ainsi que leur potentiel protecteur vis-à-vis du diabète et de ses complications, nous avons sélectionné 14 fruits et légumes qui ont fait l'objet du projet EVA (Tableau 3-1).

**Tableau 3-1 : Fruits et légumes étudiés dans le cadre du projet EVA**

Fruit/Légume	Nom binomial	Variété	Origine géographique
<b>Fraise</b>	<i>Fragaria ananassa</i>	Salsa	Jardin des Fraises Nordhouse
	<i>Fragaria ananassa</i>	Florence	
<b>Cerise</b>	<i>Prunus avium</i>	Folfer	Verexal - Obernai
	<i>Prunus avium</i>	Régina	
<b>Asperge</b>	<i>Asparagus officinalis</i>	Andreas	Riedinger Hoerd
<b>Tomate</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cindel	Sélestat
<b>Courgette</b>	<i>Cucurbita pepo</i>	XXX	Duttlenheim
<b>Coing</b>	<i>Cydonia oblonga</i>	Commun	Westhoffen
<b>Chou rouge</b>	<i>Brassica oleraceae</i>	Lectro	Oberschaeffolsheim
<b>Radis noir</b>	<i>Raphanus sativus</i>	Long Maraîcher	Sélestat
<b>Oignons</b>	<i>Allium cepa</i>	Hybelle	Niedernai
<b>Carottes</b>	<i>Daucus carota</i>	Bolero	Hoerd
<b>Céleri rave</b>	<i>Apium graveolens</i>	Mentor	Mussig
<b>Epinards</b>	<i>Spinacia oleracea</i>	El Mundo	Sélestat

Après réception des produits frais, ceux-ci ont été lavés puis directement coupés en lamelles grossières, puis congelés et lyophilisés (Lyobeta 25, Telstar, Espagne). Les lyophilisats ont enfin été broyés et homogénéisés à l'aide d'un broyeur.

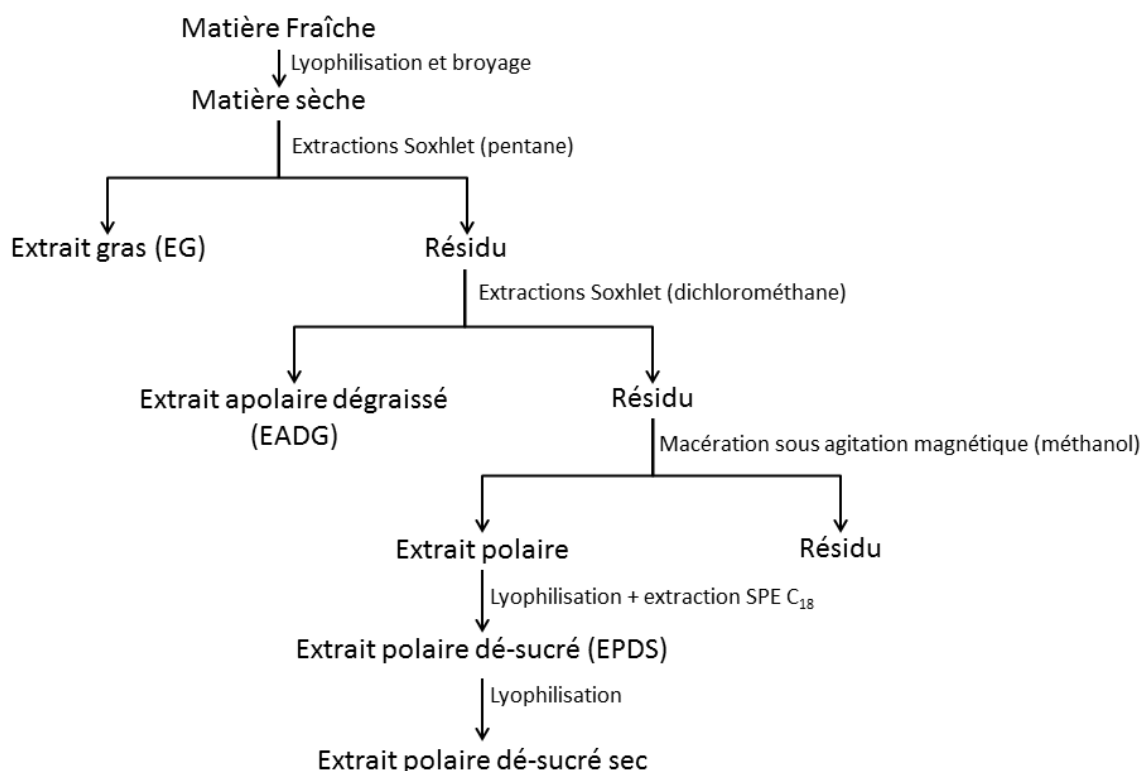
Trois types d'extractions ont été réalisées sur les lyophilisats de fruits et légumes (Figure 3-1) :

Premièrement, une extraction des molécules les plus apolaires est réalisée par extraction Soxhlet au pentane (VWR, Fontenay-sous-bois, France). Chaque cartouche d'extraction a été remplie de 18 à 20 g de matière sèche, puis a été soumise à 3 extractions de 1h30 (18-20 cycles) avec 150 mL de pentane, donnant l'extrait gras (EG). Le résidu a alors été soumis à une seconde série de 3 extractions Soxhlet de 1h30 (14-16 cycles) avec 150 mL de dichlorométhane (VWR, Fontenay-sous-bois, France), aboutissant à la fraction apolaire

dégraissée (EADG). Les extraits gras et apolaires dégraissés ont ensuite été évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Une étape de 3 répétitions de macération de 1h30 dans 150 mL de méthanol (VWR, Fontenay-sous-bois, France) a été utilisée, afin d'obtenir l'extrait le plus polaire. Ce dernier a encore été dé-sucré après une étape de lyophilisation par extraction en phase solide (SPE) sur une cartouche C18 comme suit:

1 g de chaque extrait polaire sec a été dissout dans l'eau Milli-Q, puis déposé sur une cartouche Chromabond C18ec (45 mL/5000 mg) (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) préconditionnée par 37,5 mL de méthanol puis 37,5 mL d'eau Milli-Q. La cartouche a ensuite été lavée par 2 volumes d'eau Milli-Q (75 mL) afin d'en éluer les sucres les plus polaires. Enfin, un volume de méthanol (37,5 mL) a permis d'éluer la fraction d'intérêt : l'extrait polaire dé-sucré (EPDS). Ces derniers ont été évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis repris dans l'eau Milli-Q pour pouvoir être transférés et congelés avant d'être lyophilisés et stockés à -80 °C.

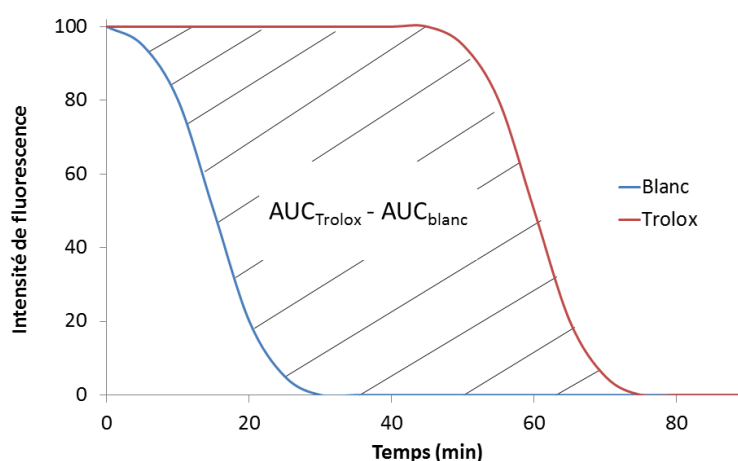


**Figure 3-1 : Méthode de préparation des échantillons**

### 3.1.2 Etude de l'activité anti-radicalaire au sein d'un échantillon naturel

#### 3.1.2.1 ORAC

La méthode ORAC se base sur un principe de compétition pour des radicaux peroxydes entre les molécules anti-oxydantes et une sonde fluorescente (Ou et al 2001). En effet, la fluorescéine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) est utilisée dans cet essai, car elle est dégradable par les espèces radicalaires à travers des réactions d'oxydation, résultant en l'extinction de sa fluorescence. Le 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) se dissocie à 37 °C en libérant des radicaux peroxydes. Il sert donc d'initiateur à la réaction d'oxydation. Les anti-oxydants protégeant la fluorescéine, et jusqu'à leur épuisement, ralentissent la baisse du signal de fluorescence en induisant un temps de latence (Figure 3-2). L'aire sous la courbe de la cinétique de fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité et à l'efficacité des composés anti-oxydants présents dans un échantillon. Les résultats seront donc exprimés en  $\mu$ mole d'Equivalent Trolox/g d'extrait sec.



**Figure 3-2 : Principe de mesure de l'activité anti-oxydante par ORAC**

(Blanc : oxydation de la fluorescéine en absence d'anti-oxydants ; Trolox : oxydation de la fluorescéine en présence de trolox)

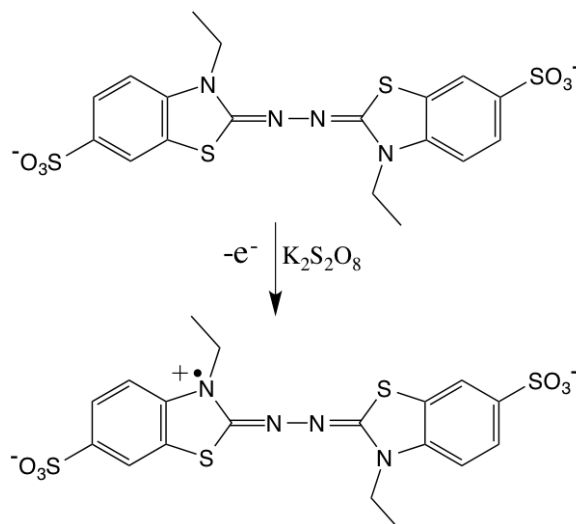
Les EPDS des fruits et légumes sont dissous dans un mélange eau Milli-Q/Méthanol (70/30) à 1 mg/mL, puis sont dilués dans l'eau Milli-Q à 0,1 et 0,01 mg/mL avant d'être déposés en triplicat en plaque 96 puits à hauteur de 10  $\mu$ L/puits. Les EG et EADG ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1 mg/mL et dilués à 0,1 mg/mL dans l'eau Milli-Q avant dépôt dans les mêmes conditions que les EPDS. Une gamme étalon de Trolox entre 25 et 500  $\mu$ mol/L a également été déposée en triplicat. Ensuite, une solution aqueuse de 150  $\mu$ L de fluorescéine à  $8,5 \cdot 10^{-8}$  mol/L a été ajoutée par puits avant une incubation à 37 °C

pendant 10 minutes dans un lecteur de fluorescence pour microplaques (Varioskan Thermo Scientific). Un distributeur automatique a ensuite permis l'initiation de la réaction par l'ajout de 30  $\mu\text{L}$  d'AAPH à 153 mmol/L à chaque puits. L'intensité de fluorescence émise à 528 nm a alors été mesurée à raison d'un point toutes les 5 minutes pendant 2 h, avec une longueur d'onde d'excitation de 485 nm. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mole}$  de Trolox équivalent/g d'extrait sec.

### 3.1.2.2 TEAC

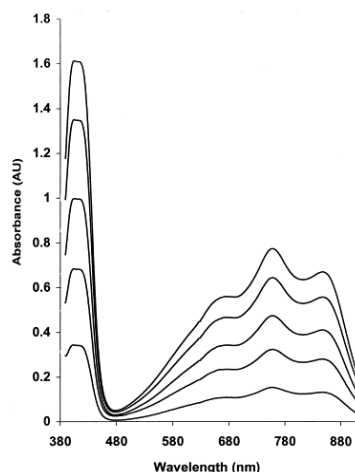
La méthode TEAC est une technique spectrophotométrique basée sur l'utilisation d'un radical cationique coloré (bleu-vert) stable (Figure 3-4), l'ABTS<sup>•+</sup> (acide 2,2'-Azino-bis-(3-éthylbenthioazoline-6-sulfonique), qui se décolore lorsque réduit par un anti-oxydant, suite à un transfert d'électron. Une molécule de référence, le Trolox, (acide (+)-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxilique), est utilisée afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux. Il s'agit d'un analogue structural hydrosoluble de la vitamine E.

La solution mère d'ABTS (Biochemica Appllichem, Darmstadt, Allemagne) est préparée par sa dissolution à 7,5 mmol/L dans l'eau milli-Q en présence de 2,5 mmol/L de persulfate de potassium, générant le radical cation ABTS<sup>•+</sup> par oxydation (Figure 3-3). La stoechiométrie de la réaction (entre ABTS et  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) étant de 1:2, l'ABTS est en excès.



**Figure 3-3 : Génération du radical cation de l'ABTS**

(D'après Sekher Pannala et al., 2001)



**Figure 3-4 : Spectre UV-Visible de l'ABTS<sup>+</sup>**

(Re et al., 1999)

Une gamme étalon de Trolox (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) (10; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 200  $\mu\text{mol/L}$ ) est préparée dans l'eau Milli-Q à partir d'une solution mère à 1 mmol/L dans un mélange eau Milli-Q/Méthanol (50/50), et permet l'expression des résultats des échantillons en  $\mu\text{mole Equivalent Trolox/g d'extract sec}$ .

### 3.1.2.2.1 Méthode TEAC en microplaques

La solution de travail est préparée par la dilution au 100<sup>ème</sup> de la solution mère dans un tampon phosphate (PBS : 140 mmol/L NaCl ; 9,8 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 23 mmol/L KCl dissouts dans 1 L d'eau Milli-Q, le pH est ajusté à 7,4 par ajout de NaOH à 0,1 mol/L). La dilution est corrigée en cas de besoin afin d'obtenir une absorbance de  $0,7 \pm 0,02$  à 734 nm.

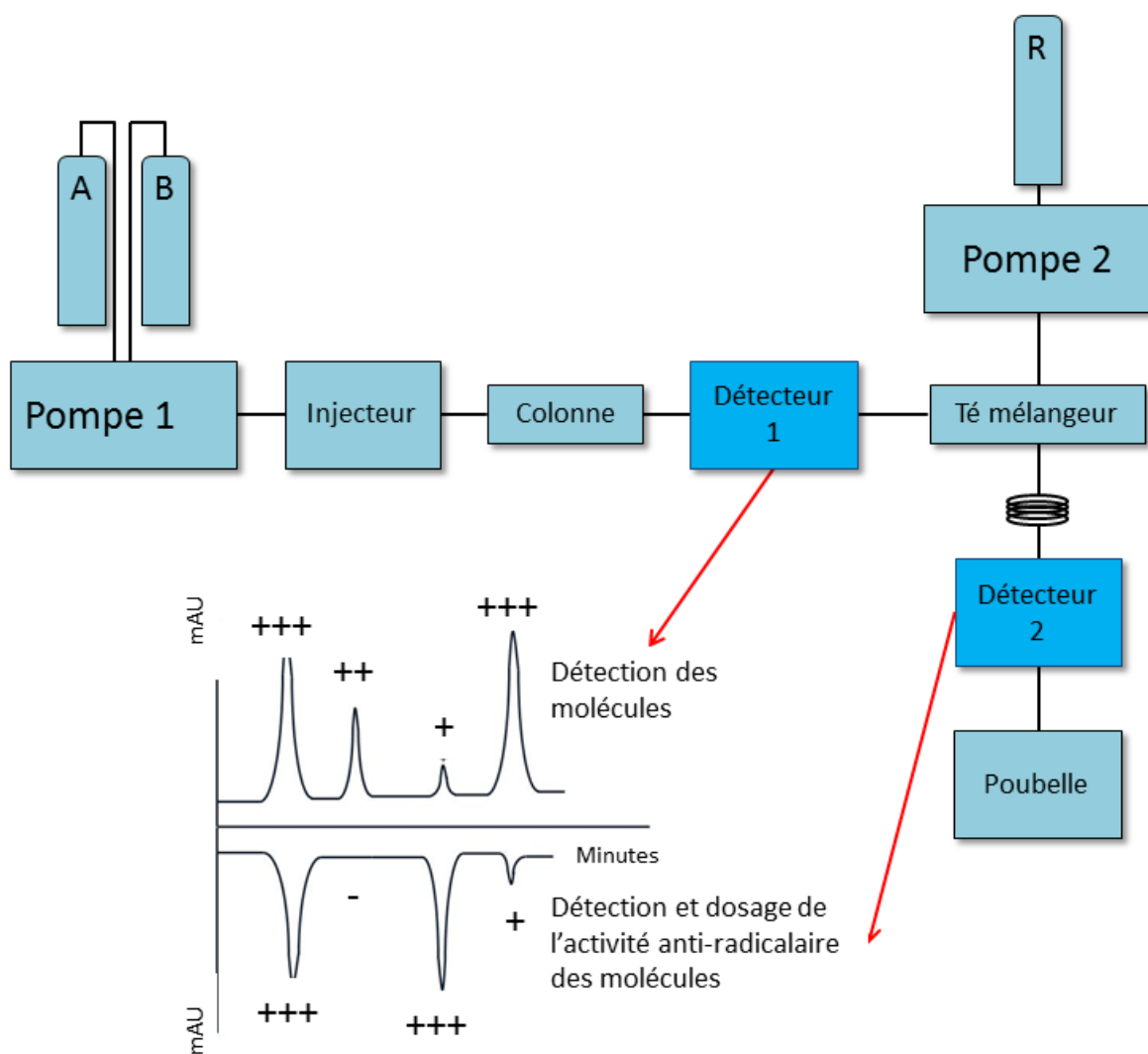
Les EPDS ont été dissous dans un mélange eau Milli-Q/Méthanol (70/30) à 1 mg/mL, puis dilués dans l'eau Milli-Q à 0,1 ou 0,01 mg/mL, et les EG et EADG sont dissous dans du DMSO (VWR, Fontenay-sous-bois, France) à 1 mg/mL puis dilués à 0,1 mg/mL dans l'eau Milli-Q. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon ou de point de gamme (0 à 500  $\mu\text{mole/L}$ ) a été déposé en triplicat en plaque 96 puits, auquel sont ajoutés 200  $\mu\text{L}$  de solution d'ABTS<sup>+</sup> de travail. La plaque est alors incubée à 37 °C pendant 10 minutes, avant lecture de l'absorbance à 734 nm par un lecteur de fluorescence (Varioskan Thermo Scientific). Il s'agit donc d'une mesure en point final, qui ne tient pas compte de la cinétique des réactions.

### 3.1.2.2.2 Détection et mesure de l'activité anti-radicalaire au niveau moléculaire (HPLC-AOx)

La détermination des molécules anti-radicalaires au sein d'un échantillon complexe à été réalisée par l'association d'une technique séparative, la chromatographie liquide de haute performance, et d'un système de détection mettant en évidence spécifiquement la capacité des molécules individuelles à réduire une espèce radicalaire grâce à un système de réaction post-colonne, basé sur le principe de la méthode TEAC (HPLC-AOx) (Figure 3-5).

Ainsi, les composés d'un échantillon sont séparés sur une colonne chromatographique grâce à un premier groupe de pompes, puis sont détectés dans un premier temps par un détecteur à barrette de diodes. En sortie du premier détecteur, la phase mobile, véhiculant les composés séparés, est ensuite mélangée au réactif ABTS<sup>•+</sup> apporté par la 2<sup>ème</sup> pompe. Le mélange phase mobile/ ABTS<sup>•+</sup> est ainsi acheminé à travers une boucle de réaction jusqu'au deuxième détecteur destiné à enregistrer la décoloration du radical. La présence d'une molécule peut donc être détectée par absorbance classique dans l'UV-visible (conditionné par la présence d'un chromophore au sein de sa structure), et l'activité anti-radicalaire se manifestera par l'apparition d'un pic négatif au niveau du 2<sup>nd</sup> détecteur, traduisant la décoloration du réactif.





**Figure 3-5 : Montage du couplage HPLC-AOx**

Dans un but d'amélioration de cette technique, différents paramètres concernant la réaction post-colonne ont été modifiés, en suivant leur influence sur la hauteur et l'aire des pics. Parmi ces paramètres il y a la concentration de l'ABTS<sup>+</sup>, son débit, la longueur de la boucle de réaction, et son diamètre interne et enfin la température de la boucle de réaction.

Par ailleurs, nous avons également cherché à mettre au point des méthodes séparatives adaptées pour la séparation des échantillons considérés. Pour ce faire nous avons testé plusieurs phases stationnaires, phases mobiles et gradients de phase mobile.

#### 3.1.2.2.2.1 Essais de couplage HPLC-RPE

Des essais de couplage HPLC-RPE ont été réalisés dans le but de remplacer le détecteur n°2 du montage présenté dans le paragraphe précédent, par un spectromètre RPE permettant l'utilisation de radicaux différents de l'ABTS<sup>+</sup>.

Le système chromatographique est composé d'une pompe binaire Prostar 210, d'un injecteur automatique Prostar 410 et d'un détecteur à barrette de diodes UV/vis Prostar 330 (Varian, les Ulis, France). Le réactif ABTS est délivré par une pompe Prostar 210. La mesure de la décoloration après réaction post-colonne est réalisée grâce à un Tunable Absorbance Detector 486 (Waters, Saint-Quantin-Fallavier, France).

L'analyse des molécules standards est réalisée sur une colonne Agilent Zorbax eclipse XDB-phenyl, 250 x 4,6 mm, 5 µm ; avec une phase mobile binaire composé de A : H<sub>2</sub>O/Acide formique (99,9/0,1 v/v) ; et de B : acétonitrile ; à un débit de 1 mL/min avec le gradient présenté en tableau 3-2 ; et enfin un débit du réactif ABTS<sup>•+</sup> 0,5 mL/min. Le réactif ABTS est préparée comme décrit précédemment (§ 3.1.2.2).

**Tableau 3-2 : Gradient de phase mobile**

Rt (min)	%A	%B
0	97	3
40	82	18
50	55	45
53	0	100
58	0	100
60	97	3
70	97	3

Les conditions d'acquisition de spectres RPE :

La résolution spectrale est de 512 (points par scan). Le champ magnétique est centré à 0,3533 T, avec une largeur de champ de 0,008 T. Le temps de conversion est de 1,28 ms. La constante de temps est de 0,32 ms. L'amplitude de modulation est de 0,001 T. La puissance micro-onde est fixée à 50,41 mW, avec une fréquence de 9,883 GHz. Enfin, la durée de balayage est de 0,655 s, et un spectre final correspond au cumul de 3 scans (1 spectre toutes les 1,97 s).

#### 3.1.2.2.2 Analyse des composés anti-oxydants des extraits de café

Le système utilisé pour analyser spécifiquement les composés anti-radicalaires dans les extraits de café est composé d'un système chromatographique classique et d'autre part d'un système permettant la réaction post-colonne. La chaîne chromatographique est constituée d'une pompe Waters 600 S controller, d'un passeur d'échantillons Waters 717 plus Autosampler et d'un détecteur à barrette de diodes Waters 2996 PDA (Waters, Saint-Quantin-Fallavier, France). Le réactif ABTS<sup>•+</sup> est délivré par une pompe Varian ProStar 210

Solvent delivery Module (Varian, Les Ulis, France), et mélangé à la phase mobile sortant du premier détecteur au moyen d'un T mélangeur. L'ensemble est acheminé jusqu'au second détecteur Waters Tunable Absorbance Detector, au travers d'une boucle de réaction en PEEK mesurant 3 m de long avec un diamètre interne de 0,25 mm. La détection de la décoloration du radical ABTS<sup>•+</sup> est suivie à 412 nm.

La colonne chromatographique utilisée dans cette méthode est la Waters Sunfire C18 5 µm, 4,6 x 250 mm. La phase mobile, composée de deux voies : A : H<sub>2</sub>O Milli-Q/Acide formique (99,9/0,1)(v/v) ; et B : Méthanol, est délivrée avec un débit de 1 mL/min, avec le gradient présenté dans le tableau 3-3).

Le réactif ABTS<sup>•+</sup> est préparé à partir d'une solution mère à 7,5 mmol/L (cf 3.1.2.2). La solution de travail est préparée par dilution au 50<sup>ème</sup> dans le tampon phosphate à pH 7,4. Cette dilution est ensuite ajustée pour atteindre une absorbance de 1,2 ± 0,02 à 734 nm. Ce dernier est délivré au système après la première détection à un débit de 0,5 mL/min.

**Tableau 3-3 : Gradient de phase mobile pour l'analyse des extraits de café**

Temps (min)	% voie A	% voie B
0	90	10
20	85	15
30	85	15
68	70	30
93	10	90
100	10	90
103	90	10
120	90	10

Avant l'analyse des échantillons, ces derniers ont été soit concentrés soit dilués dans le MeOH afin de respecter la gamme de linéarité du Trolox pour l'analyse de l'ensemble des différents composés de ces extraits. Les échantillons ont tous été filtrés sur une membrane Chromafil<sup>®</sup> PET-Xtra 0,45 µm (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

#### 3.1.2.2.3 Analyse des composés anti-oxydants des fruits et légumes

Le système est composé d'un autosampler (Dionex Ultimate Autosampler WPS3000FC), d'une pompe double gradient à faible pulsation (Dual Gradient Pump 3600 SD), d'un détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector 3000(RS)) et d'un détecteur UV mono-longueur d'onde Variable Wavelength Detector 3100. Tous les résultats sont traités avec le logiciel Chromeleon 6.7.

### 3.1.2.2.2.3.1 Etude des extraits polaires dé-sucrés (EPDS)

Les EPDS sont analysés dans les conditions suivantes : la phase stationnaire est une colonne C18-PFP ; 250 x 4,6 mm ; 5 µm (ACE), thermostatée à 25 °C ; la phase mobile est composée de deux voies (voie A : Eau Milli-Q/Acide Trifluoro-acétique (TFA) ; voie B : Acétonitrile ; avec un débit de 1 mL/min, et le gradient présenté dans le tableau 3-4).

Le réactif ABTS<sup>+</sup> est préparé comme décrit dans le paragraphe 3.1.2.2.2.1. Celui-ci est délivré au débit suivant :  $D_{ABTS^{+}} = 0,5$  mL/min. La double détection consiste premièrement en une détection dans l'UV-visible entre 200 à 700 nm, suivie par la détection post-réaction à 412 nm. La boucle de réaction (PTFE) mesure 25 m de long pour un diamètre interne de 0,25 mm. Les EPDS sont dissous à une concentration finale compris entre 3 et 6 mg/mL dans un mélange eau Mill-Q/Acétonitrile (80/20) (v/v) et filtrés sur membrane PET Chromafil<sup>®</sup> PET-Xtra 0,45 µm (Macherey-Nagel, Hoerd, France) avant leur analyse en triplicat.

**Tableau 3-4 : Gradient de phase mobile (EPDS)**

Temps (min)	% voie A	% voie B
0	97	3
35	79,5	20,5
45	79,5	20,5
55	72	28
57	0	100
64	0	100
66	97	3
76	97	3

### 3.1.2.2.2.3.2 Etude des extraits gras (EG)

Les EG sont analysés dans les conditions suivantes : la phase stationnaire est une colonne C18-EC-Nucleodur HTec ; 250 x 4,6 mm ; 3 µm (Macherey-Nagel, Hoerd, France), thermostatée à 60 °C ; la phase mobile est composée de trois voies (voie A : eau Milli-Q (0,1% acide formique)/acétonitrile (20/80) ; voie B : acétonitrile ; voie C : isopropanol/acétonitrile (80/20), avec un débit de 1 mL/min et le gradient présenté dans le tableau 3-5). Le réactif ABTS<sup>+</sup> est préparé comme décrit dans le paragraphe 3.1.2.2.2.1., et son débit ainsi que les paramètres de la double détection sont identiques à ceux décrits dans le paragraphe 3.1.2.2.2.2.1.

**Tableau 3-5 : Gradient de phase mobile (EG)**

Temps (min)	% voie A	% voie B	% voie C
0	20	80	0
10	0	100	0
40	0	25	75
42	0	0	100
47	0	0	100
49	20	80	0
59	20	80	0

### 3.1.3 Purification et identification des composés anti-oxydants

Pour déterminer la nature des structures chimiques des molécules responsables de l'activité anti-oxydante des extraits étudiés, celles-ci sont purifiées par la collecte des pics chromatographiques sur microplaques. Pour ce faire, les mêmes méthodes séparatives sont utilisées, mais sans le couplage au système réactionnel post-colonne.

- Collecte de pics chromatographiques :

Les molécules d'intérêt, c'est-à-dire ayant démontré leur capacité à décolorer le radical ABTS<sup>•+</sup> et donc leur capacité anti-oxydante, ont été purifiées par collection de leurs pics chromatographiques. La collection des pics a été réalisée sur le système HPLC Dionex décrit précédemment. Pour ce faire, une méthode de purification est mise au point pour chaque échantillon, se basant sur la méthode séparative ayant permis l'analyse de leur réactivité chimique sans le couplage post-colonne. Les pics chromatographiques sont ainsi collectés sur microplaques par l'autosampler WPS3000FC. Les temps de rétention des molécules d'intérêt, déterminés au préalable, définissent les plages de collecte autorisées. Un seuil d'absorbance minimum ainsi qu'une pente minimale de début et de fin de pic chromatographique sont définis pour chaque échantillon. Lorsque ces deux conditions sont remplies dans les limites d'une plage prédéfinie, le pic est alors collecté. Cette opération a été répétée de nombreuses fois, jusqu'à obtention de quantités voisines du mg ou de 0,1 mg. Les pics collectés correspondants sont ensuite rassemblés et évaporés à sec au moyen d'un speedvac concentrator SDP121P (Thermo Scientific, Gometz le Châtel, France), avant d'être re-solubilisés dans le MeOH, deutéré ou non, pour respectivement leur analyse par RMN et par spectrométrie de masse.

#### 3.1.3.1 Identification des molécules anti-oxydantes du café

- Analyse par spectrométrie de masse :

Les formules brutes des molécules étudiées sont déterminés par spectrométrie de masse à l'aide d'un spectromètre Agilent Accurate Mass Q-TOF, utilisant le logiciel Agilent Masshunter B 04 (Agilent).

- Analyse spectrale RMN :

Les analyses RMN ont été réalisés à 400 MHz (Bruker Avance III 400 MHz) ou à 500 MHz (Bruker Avance III 500 MHz) en utilisant le signal du MeOH non deutéré comme référence interne. Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  ont été réalisés à 400 MHz. Les résultats sont présentés de la manière suivante : les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, la multiplicité (s : singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet), le nombre de protons, les constantes de couplage en Hz et désignation de la position du proton.

### *3.1.3.2 Identification des molécules d'intérêt des EPDS des fruits et légumes*

Les composés d'intérêt isolés des EPDS ont été analysés par spectrométrie de masse. Le système LC-MS est composé d'un autosampler Varian 410, de 2 pompes Varian Prostar Solvent Delivery Module 210, d'un détecteur à barrette de diodes Varian PDA UV/Vis ProStar 330 et d'un spectromètre de masse Varian 1200L triple quadrupôle équipé d'une source ESI.

La phase stationnaire est une colonne C18-PFP ; 250 x 4,6 mm ; 5  $\mu\text{m}$  (ACE), thermostatée à 25 °C. La phase mobile consiste en un mélange isocratique A/B (40/60) : voie A : eau Milli-Q/ acide formique (99,9/0,1) (v/v) ; voie B : acétonitrile ; avec un débit de 1 mL/min.

Une dérivation post-colonne sépare la phase mobile avec un ratio de 1:4 vers le spectromètre de masse et le PDA respectivement. Une première analyse Full scan est réalisée en mode positif et négatif dans une gamme de masse comprise entre 120 et 1500 m/z. Le capillaire est fixé à un potentiel de 45 V, avec une température de 200 °C pour le gaz de séchage, l'azote. Le multiplicateur d' $e^-$  est polarisé à 1200 V. Une seconde injection est réalisée pour chaque composé isolé, en mode  $\text{MS}^2$ , utilisant l'argon comme gaz de collision dans une gamme d'énergie comprise entre 5 et 40 V. Tous les résultats sont traités avec le logiciel MS Workstation 6.9.

## **3.2 Etude de la bio-activité des extraits de fruits et légumes d'alsace - Etude *in vitro***

### **3.2.1 Culture cellulaire des RINm5F**

Les cellules productrices d'insuline RINm5F (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Etats-Unis) servent de modèle. Ce sont des cellules  $\beta$  d'une lignée cancéreuse d'insulinome de rat clone m5F. Ces cellules adhérentes sont cultivées dans un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Sigma, St Louis, Etats-Unis) supplémenté d'une part de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma), et d'autre part de 1% d'une solution antibiotique-antimycotique (ABAM, Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Grand Island, Etats-Unis), que l'on considère comme « milieu complet ». L'ABAM consiste en une association de pénicilline G (10000 U/mL) et d'amphotéricine B (25  $\mu$ g/mL). Les cellules sont cultivées en atmosphère contrôlée à 5% CO<sub>2</sub> et thermostatée à 37 °C. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours, et à l'approche de la confluence (80 – 90%), les cellules sont repiquées au moyen de la trypsine EDTA à 0,05% (Sigma).

### **3.2.2 Etude de l'effet des extraits polaires dé-sucrés sur la viabilité cellulaire – Cell Titer**

L'effet d'une incubation des cellules RINm5F avec les EPDS sur la viabilité est étudié au moyen d'un test colorimétrique : CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, Etats-Unis). Cette méthode se base sur l'évaluation de l'activité mitochondriale à travers une réaction enzymatique impliquant les déshydrogénases mitochondriales, qui témoignent d'une activité métabolique. Le substrat est un sel de tétrazolium (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) (MTT), qui est réduit sous l'action enzymatique en formazan, un produit coloré. La production de formazan est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes et à leur activité mitochondriale.

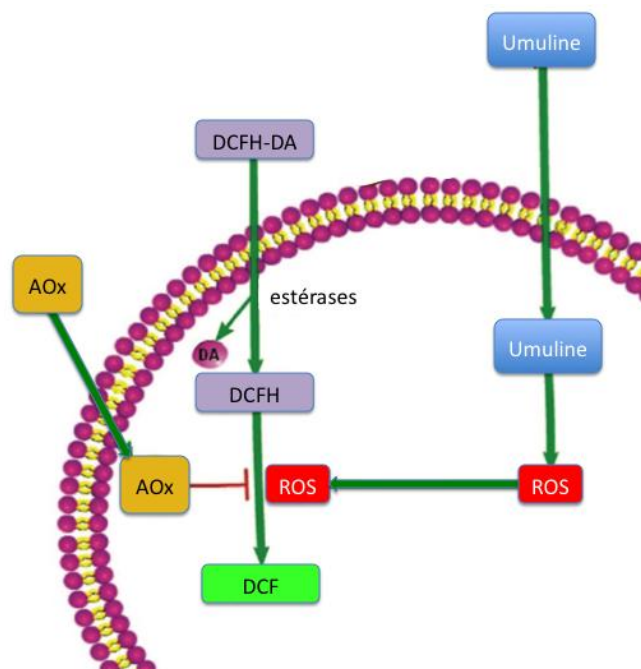
Les cellules sontensemencées à 100 000 cellules/puits en plaque 96 puits dans 200  $\mu$ L de milieu complet, puis cultivés 48 h. Le surnageant est ensuite retiré, avant ajout de 100  $\mu$ L de milieu sans SVF (« milieu (-) ») contenant une concentration donnée en EPDS (10 ; 20 ; 50 ; 80 ; 150 ; 200 ou 300  $\mu$ g/mL). Après 24 h d'incubation avec ces extraits, le surnageant est éliminé, les puits sont alors rincés avec 100  $\mu$ L de tampon Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Grand Island, Etats-Unis), et enfin 20  $\mu$ L de CellTiter et 100  $\mu$ L

de milieu (-) sont ajoutés par puits. Les plaques sont enfin incubées pendant 1 h avant lecture de l'absorbance à 490 nm.

### 3.2.3 Etude de l'effet protecteur des extraits polaires dé-sucrés vis-à-vis d'un stress oxydant induit

#### 3.2.3.1 Activité anti-oxydante cellulaire (CAA)

L'activité anti-oxydante cellulaire est évaluée au moyen d'une méthode adaptée au test CAA développé par Wolfe et al (2007). Cet essai se base sur l'utilisation d'une sonde, la 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) capable d'être internalisée par les cellules (Figure 3-6). Sous l'action des estérases cellulaires, qui vont cliver la fonction di-acétate, celle-ci se retrouve alors piégée dans le compartiment cellulaire sous forme de DCFH. Enfin, les espèces radicalaires vont pouvoir dégrader cette DCFH générant la DCF fluorescente à 538 nm lorsqu'excitée à 485 nm. Une augmentation de la fluorescence par rapport à un contrôle va donc traduire la présence de radicaux libres et donc un stress oxydant. Le pouvoir antioxydant des extraits est ainsi évalué en pré-incubant les cellules avec à la fois la sonde et l'extrait étudié, avant d'induire un état de stress oxydant par l'insuline.



**Figure 3-6 : Principe de la méthode de mesure de la capacité anti-oxydante cellulaire**

(Adapté de Wolfe et al 2007)

Les cellules sontensemencées à 100 000 cellules/puits dans 200 µL de milieu complet en plaque de 96 puits, puis cultivés pendant 48 h. Le surnageant est ensuite éliminé et



remplacé par le milieu (-) contenant 60 µmol/L de DCFH-DA ainsi qu'une concentration donnée d'EPDS (10 ; 20 ; 50 ; 80 ; 150 ; 200 ; 300 µg/mL). Les cellules sont cultivées pendant 24 h, puis les puits sont rincés 2 fois par 200 µL de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Lonza, Verviers, Belgique), avant l'induction du stress oxydant par ajout de 100 µL d'Umuline NPH (Lilly, France) à 25 UI/mL dans du milieu (-). Immédiatement après induction du stress oxydant, une cinétique de fluorescence est réalisée (Ex : 485 nm ; Em 538 nm) avec une mesure toutes les 5 minutes pendant 100 minutes. L'activité anti-oxydante cellulaire pour chaque concentration est calculée en intégrant l'aire sous la courbe cinétique, selon l'équation suivante :

$$CAA = \left[ 1 - \frac{(\int \text{échantillon} - \int \text{blanc})}{(\int \text{contrôle} - \int \text{blanc})} \right] \times 100$$

Le blanc représente le contrôle négatif, c'est-à-dire des cellules incubées avec la DCFH-DA mais qui ne subissent aucun stress oxydant induit. Le contrôle correspond aux cellules incubées avec la DCFH-DA, soumis ensuite au stress oxydant induit.

### 3.2.3.2 Observations microscopiques

#### 3.2.3.2.1 Les ROS au niveau cellulaire – DHE

La dihydroéthidine (DHE) (Sigma) est un agent chimique permettant la mise en évidence de ROS dans les cellules. Cette molécule est capable d'entrer dans les cellules, et en présence de ROS, elle sera transformée en éthidium qui a la particularité d'être fluorescent et de s'intercaler à l'ADN. Ceci peut être révélé par l'observation de l'émission à 610 nm au microscope à fluorescence suite à l'excitation à 488 nm.

Les cellules RINm5F sontensemencées à  $1.10^6$  cellules/puits dans le milieu complet en plaque 6 puits, et sont cultivées pendant 48 h. Le surnageant est ensuite éliminé, et un milieu (-) contenant 20, 50 ou 80 µg d'EPDS de cerise (var. Regina)/mL est ajouté à raison de 1 mL/puits. Les cellules sont alors incubées pendant 1 h à 37 °C, puis les puits sont rincés au HBSS avant induction d'un stress oxydant par ajout de 1 mL/puits de HBSS contenant 50 µmol/L de peroxyde d'hydrogène. Les cellules sont encore incubées pendant 1 h, puis les puits sont rincés avec de l'HBSS avant l'ajout de 1 mL/puits de DHE à  $2,5.10^{-6}$  mol/L. Après une dernière incubation de 30 minutes, le surnageant est éliminé, les puits sont rincés au HBSS, puis les observations de la fluorescence à 610 nm sont réalisées au microscope avec

une excitation à 488 nm et une immersion x 40 (NIS-Element BR, Nikon, France). 4 à 5 plages sont observées par puits, afin de pouvoir déterminer le niveau moyen de fluorescence par puits, et donc d'évaluer le niveau de ROS dans chaque condition testée.

### **3.2.3.2.2 Observation du potentiel protecteur des EPDS vis-à-vis d'un stress oxydant induit par un hyperinsulinisme in vitro (DCFH-DA)**

Les cellules RINm5F sontensemencées à  $2.10^6$  cellules/puits dans le milieu complet en plaque de 6 puits, puis cultivées pendant 48 h. Suit alors une pré-incubation de 24 h avec les extraits (à 50 ou 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dans le milieu (-) contenant 60  $\mu\text{mol}/\text{L}$  de DCFH-DA. Les puits sont ensuite rincés 3 fois par 2 mL de HBSS, avant induction du stress insulinique par ajout de 1 mL d'Umuline NPH à 25 UI/mL dans le milieu (-), et incubation pendant 100 minutes. Les puits sont enfin rincés 3 fois par 2 mL de HBSS. Les observations en microscopie à fluorescence (NIS-Element BR, Nikon, France) sont réalisées dans les conditions suivantes : longueur d'onde d'excitation de 485 nm ; longueur d'onde d'émission de 538 nm ; immersion x 40. Afin d'évaluer le potentiel préventif des traitements des cellules par pré-incubation avec les extraits de F&L, chaque puits est observé sur 5 plages différentes permettant ensuite de mesurer le niveau de fluorescence moyen. Ce niveau de fluorescence est alors comparé aux conditions « contrôle » et « stress insulinique sans pré-traitement ».

### **3.2.3.3 Effets des extraits sur l'expression des enzymes endogènes anti- et pro-oxydantes**

Afin d'évaluer l'effet des EPDS de cerise, de carotte et de chou rouge vis-à-vis de l'expression des enzymes impliqués dans la balance oxydative sur le modèle cellulaire des RINm5f, nous avons procédé à un dosage de plusieurs enzymes par la technique de western blot.

Les cellules RINm5f sontensemencées en plaque de 6 puits à raison de  $2.10^6$  cellules/puits, puis incubées pendant 48 h à 37 °C.

- Les traitements consistent en l'incubation des cellules à 1 mL/puits avec du milieu sans SVF contenant 50 ; 150 ou 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'EPDS de cerise (var. Régina), de chou rouge ou de carotte.
- Le stress insulinique est induit par l'incubation des cellules à 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$  avec du milieu sans SVF contenant 25 UI/mL d'Umuline NPH.

Les conditions suivantes ont été testées :

- CTL : aucun traitement ni stress induit
- Traitement seul 24 h
- Stress seul 24 h
- Traitement 24 h puis stress 24 h
- Stress 24 h puis traitement 24 h

Les extractions de protéines sont réalisées grâce au tampon de lyse Tris Ultra Pure (Euromedex, Souffelweyersheim, France), consistant en 137 mmol/L de NaCl (Merck, France), 1% Igepal (Sigma), 31 mmol/L de PMSF (Eurobio, Les Ulis, France), 10% glycérol (Sigma), et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le lysat est récupéré, incubé 30 min dans la glace en vortexant toutes les 10 minutes, puis il est centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes. Les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Bradford. Puis 10 µg de protéines sont déposées et séparées sur un gel 4-12% Bis-Tris Criterion™ XT Precast (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France) et enfin transférées sur membrane Immobilon PVDF (Millipore, Molsheim, France). Les membranes sont alors bloquées à température ambiante pendant 2 h grâce à un tampon bloquant contenant 5% de poudre de lait dégraissé afin de prévenir la fixation non-spécifique. Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps primaires à 4 °C pendant la nuit.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

Anti-MnSOD (1/500) et anti-Catalase (1/500) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France)  
Anti-GADPH (1/500), Anti-p22phox (NADPH Oxydase) (1/500).

Enfin, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire couplé à la protéine HRP (Horseradish peroxidase). La quantification relative des protéines est réalisée par comparaison avec la  $\beta$ -actine, protéine de référence, grâce au logiciel Image J.

#### **3.2.4 Etude de la bio-activité des fruits et légumes d'Alsace – Etude *in vivo***

Le protocole d'étude implique 168 rats Wistar mâles (centre d'élevage DEPRE, Saint Douchlard, France) maintenus en rythme nyctéméral 12 h/12 h avec la nourriture et la boisson *ad libitum*. Une quarantaine d'une semaine est respectée avant le baguage et la randomisation. Le protocole de l'étude EVA est en accord avec la législation française concernant l'expérimentation animale (décret 87-848 19/10/1987 modifié par le décret 2001-464 29/03/2001) et a été approuvé par le Comité Régional d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale (CREMEAS) : AL/65/72/02/13.

### ***3.2.4.1 Modèle de diabète de type 2 induit par une approche alimentaire – High Fat High Fructose (HFHF)***

Un modèle de rat rendu diabétique de type 2 par une approche alimentaire a été mis au point au laboratoire. Les rats sont soumis à une alimentation High Fat High Fructose (HFHF), c'est à dire enrichie en matières grasses, High Fat Diet (SDS, Saint Gratien, France) : 21,4 % graisses ; 17,5% protéines ; 50% glucides ; 3,5% fibres ; 4,1% cendres) (4,6 kcal/g) combiné à un important apport en fructose, High Fructose : 25% de fructose (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) dans l'eau de boisson (1kcal/mL). Les groupes contrôles sont nourris avec un régime normal composé de 3,1% de graisses, 16,1% de protéines, 3,9% de fibres, et 5,1% de cendres et 57,5% de glucides (2,9 kcal/g) (normal diet : ND) (SAFE, Augy, France).

### ***3.2.4.2 Etude des effets modulateurs d'une supplémentation de l'alimentation en fruits ou légumes sur le stress oxydant et ses complications (ex de la cerise et du chou rouge)***

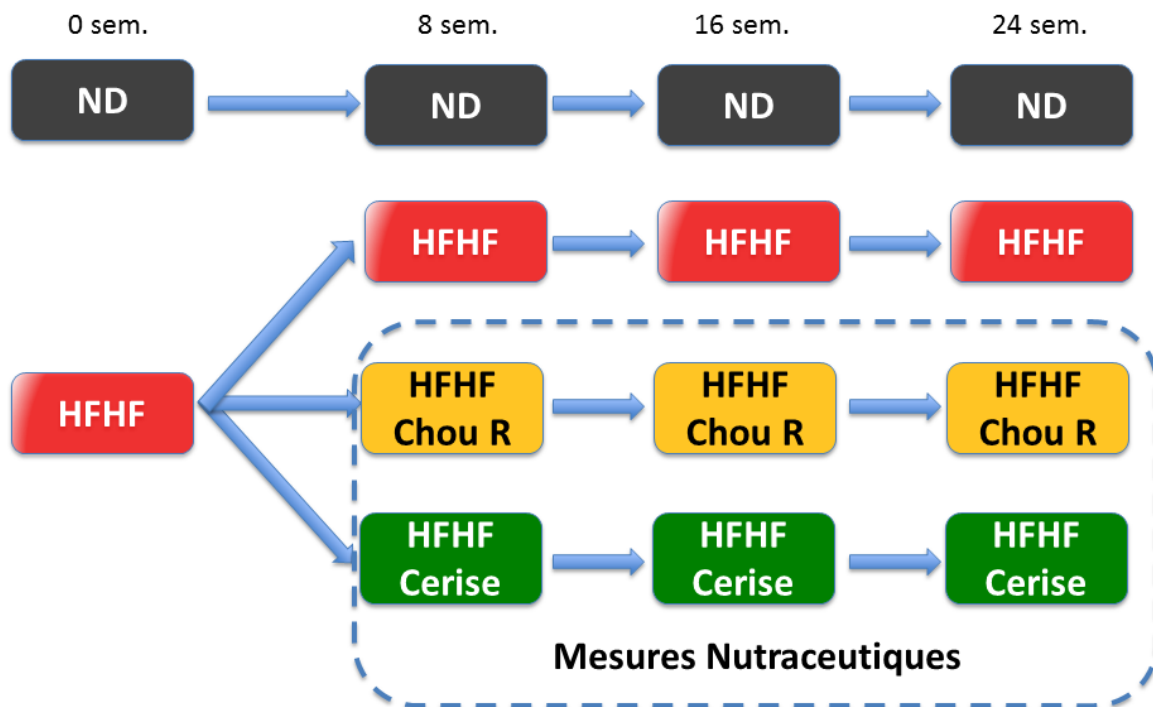
#### **3.2.4.2.1 Protocole EVA**

Sur la base d'un fruit et d'un légume candidat issus des premières phases d'étude, un protocole d'étude *in vivo* est élaboré, ayant pour finalité la validation des effets protecteurs des molécules présentes dans ces produits alimentaires vis-à-vis du stress oxydant lié au syndrome métabolique et au diabète. Deux approches sont envisagées au sein de cette étude :

- l'approche nutraceutique
- l'approche hygiéno-diététique

#### ***3.2.4.2.1.1 Approche nutraceutique***

Dans cette approche, les rats sont soumis au régime HFHF pendant une première période de 2 mois, permettant l'installation d'un syndrome métabolique (Figure 3-7). Puis, le potentiel nutraceutique du chou rouge et de la cerise sont étudiés. Ainsi, une supplémentation de cette alimentation par un lyophilisat de cerise ou de chou rouge est réalisée lors des 4 mois suivants. Pour ce faire, la cerise dénoyautée et le chou rouge ont été préalablement broyés grossièrement puis lyophilisés (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues, Pleubian), broyés finement (Technopoudre, Ancenis) et mélangés à hauteur de 10 % dans la nourriture HFD. Les animaux CTL(+) restent soumis au régime HFHF pendant toute cette période. Les animaux CTL(-) ont été nourris par un régime ND et de l'eau.

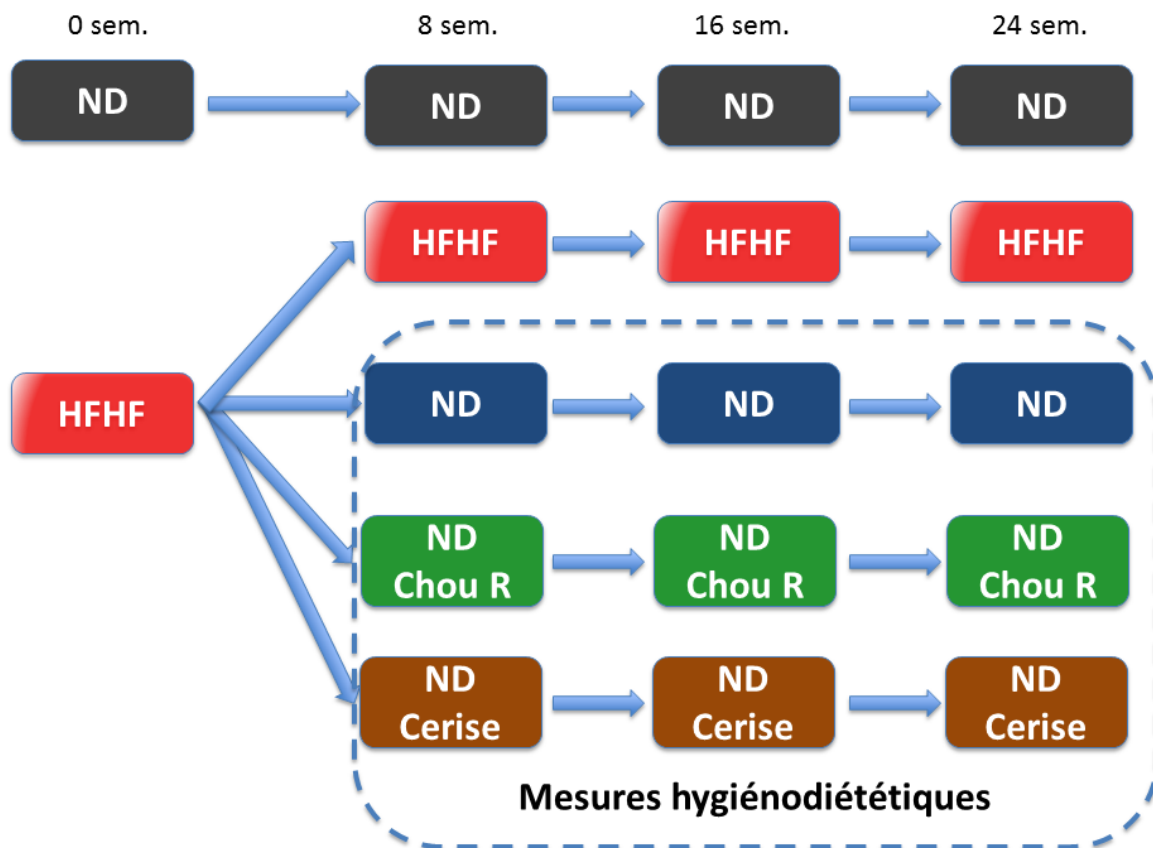


**Figure 3-7 : Etude des effets d'une démarche nutraceutique vis-à-vis de la progression du syndrome métabolique et du stress oxydant.**

(HFHF: High Fat High Fructose ; ND : Normal Diet ; CR : Chou rouge ; Cer : Cerise)

#### 3.2.4.2.1.2 Approche hygiéno-diététique

Dans cette approche, les rats sont soumis au régime HFHF pendant une première période de 2 mois, permettant l'installation d'un syndrome métabolique (Figure 3-8). Puis, l'effet d'un changement de comportement alimentaire est étudié. Les animaux sont alors soumis à une alimentation ND supplémentée ou non en cerise ou en chou rouge. Ainsi, les lyophilisats de cerise et de chou rouge décrits précédemment ont été mélangés à hauteur de 10 % dans la nourriture ND. Les animaux CTL(+) restent soumis au régime HFHF pendant toute cette période. Les animaux CTL(-) ont été nourris par un régime ND et de l'eau.



**Figure 3-8 : Etude des effets d'une démarche hygiéno-diététique vis-à-vis du syndrome métabolique et du stress oxydant.**

(HFHF: High Fat High Fructose ; ND : Normal Diet ; CR : Chou rouge ; Cer : Cerise)

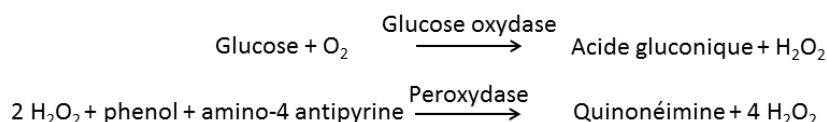
### 3.2.4.3 Suivi des paramètres métaboliques et physiques

Les rats ont été pesés de manière hebdomadaire, et leur prise de nourriture a été évaluée par le suivi de la consommation de nourriture et de boisson par semaine.

#### 3.2.4.3.1 Glycémie (lecteur et RTU)

Les glycémies à jeun sont mesurées tous les mois. Deux mesures de glycémie sont effectuées par utilisation d'un glucomètre (Accu-Check preforma<sup>®</sup>, Roche, Mannheim, Allemagne), et par le dosage du glucose RTU<sup>™</sup>.

Le dosage RTU se base sur les réactions enzymatiques de la glucose-oxydase permettant la production d'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène (Figure 3-9). Puis, la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène, de phénol et de l' amino-4 antipyrine génère la quinonéimine, un produit coloré, et du peroxyde d'hydrogène.



**Figure 3-9 : Principe du dosage du glucose plasmatique par méthode RTU**

Les échantillons et un étalon de glucose à 10 mM sont déposés en plaque 96 puits à hauteur de 2 µL/puits, auxquelles sont ajoutés 200 µL de réactif RTU® (Biomérieux, Marcy-L'Etoile, France), avant d'être incubés à 37 °C pendant 10 minutes. L'absorbance est mesurée à 550 nm (iMark™ Microplate reader, Biorad Laboratories Inc, Etats-Unis).

#### **3.2.4.3.2 Tolérance au glucose et insulino-sécrétion**

Une hyperglycémie provoquée par voie intrapéritonéale (IpGTT) est réalisée sur les rats à jeun aux stades 0 ; 1 ; 2 ; 4 et 6 mois de l'étude. Nous avons mesuré la glycémie capillaire, à l'aide du glucomètre (Accu-Check performa®, Roche, Mannheim, Allemagne), à 0, 15, 30, 60, et 120 minutes après l'injection de 2 g/kg de glucose (Fisher, Leicestershire, USA) (20% de solution). Des échantillons de sang sont récoltés à la queue à 0 et 60 minutes après l'injection de glucose afin de mesurer la glycémie plasmatique par la méthode du glucose RTU® (Glucose RTU®, Biomérieux, France) et de doser le c-peptide, reflet de l'insulino-sécrétion (Mercodia kit Elisa c-peptide, Upsalla, Suède).

L'insulino-sécrétion est évaluée à 0 et 60 minutes. Le dosage du peptide C est réalisé au moyen d'un kit Elisa (Mercodia kit Elisa c-peptide, Upsala, Suède). Le peptide C établit le lien entre les chaînes A et B de l'insuline. Sa demi-vie est très courte. Sa concentration plasmatique est donc un bon reflet de l'insulino-sécrétion à un temps donné.

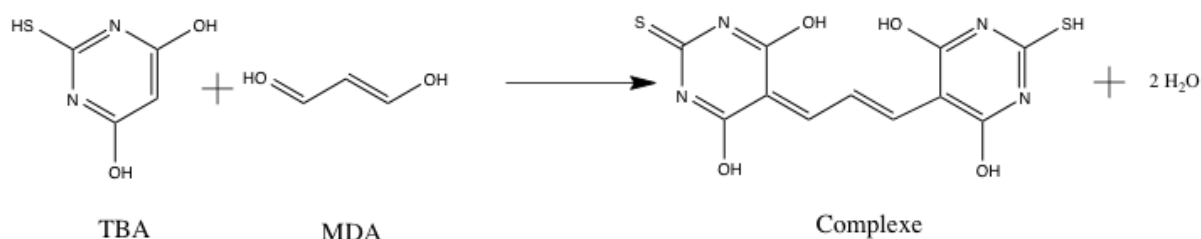
#### **3.2.4.3.3 Evaluation de la leptinémie**

La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes. Plus la masse grasse corporelle est importante, plus la sécrétion de la leptine est importante. Son dosage est réalisé par une méthode Elisa (Elisa kit rat leptin, Millipore, Billerica, MA, USA).

#### **3.2.4.3.4 Etude des paramètres oxydatifs plasmatiques**

La peroxydation des lipides est estimée par le kit TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) (OxiSelect™ TBARS Assay Kit-MDA Quantitation, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). Ce dosage consiste en la quantification du malondialdéhyde (MDA), un agent alkylant provenant de la dégradation des lipides polyinsaturés par les ROS (Figure 3-

10). Ce dosage repose sur la réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide résultant en un complexe possédant un chromophore lui conférant une coloration rose. Par mesure spectrophotométrique, il est donc possible de déterminer la quantité de MDA présente dans le sérum, reflétant le taux de peroxydation lipidique.



**Figure 3-10 : Principe du dosage du MDA**

### 3.2.4.4 Etude histologique

#### 3.2.4.4.1 Sacrifice – Prélèvement et congélation des organes

Lors de la mise en place du modèle, six rats de chaque groupe sont sacrifiés à 0, 4, 8, 16 et 32 semaines. Lors de l'étude des effets des fruits et légumes, six rats sont sacrifiés à T0, et six de chaque groupe à 4, 8, 16 et 24 semaines d'étude. Avant l'anesthésie, chaque rat est pesé, sa glycémie capillaire est mesurée à l'aide d'un glucomètre et un prélèvement sanguin à la queue est réalisé afin de mesurer les paramètres métaboliques. Puis, les rats sont anesthésiés avec du pentobarbital sodique (Centravet, France) en intrapéritonéal (50 mg/kg). Les rats sont ensuite positionnés en décubitus dorsal. Le sang est prélevé dans l'aorte abdominale et recueilli sur héparinate de lithium ou sur tubes secs. Les échantillons de plasma et de sérum sont stockés à -80°C après centrifugation, afin de déterminer les paramètres biochimiques et oxydatifs. Le pancréas, le foie, le tissu adipeux, le muscle gastrocnémien, ainsi que l'artère mésentérique sont récoltés, puis inclus dans de l'OCT Tissue-Tek® (*Optimal Cutting Temperature compound*, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) et congelés dans l'azote liquide ou bien congelés directement à sec, conservés à -80°C afin de déterminer les paramètres histologiques. Seuls les résultats du foie et du pancréas des sacrifices aux temps 0, 4, 8 et 16 semaines seront présentés dans ce manuscrit. Les autres tissus prélevés seront analysés ultérieurement au cours du projet EVA.



#### **3.2.4.4.2 Coupes d'organes au Cryostat**

Les organes inclus en OCT sont coupés à une épaisseur de 10 µm à l'aide du cryostat Leica CM 3050S. La chambre et la tête sont refroidies à -20°C pour le foie et le pancréas. Les coupes, avant coloration, sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes.

#### **3.2.4.4.3 Visualisation du glycogène hépatique**

Le procédé de digestion de la diastase ( $\alpha$ -amylase), suivi par la coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS) est utilisé comme aide dans le diagnostic du stockage de glycogène (système de coloration de PAS, Sigma-Aldrich, St Louis, MOIS, Etats-Unis) et est exécuté selon le protocole du fabricant. Les coupes digérées et non digérées par la diastase sont placées dans la solution d'acide périodique, puis dans le réactif de Schiff et enfin dans l'Hématoxyline pour une contre coloration des noyaux en bleu. Les coupes sont ensuite visualisées au microscope Nikon Eclipse 50i (Paris, France). Une décoloration des coupes avec la diastase permettra de mettre en évidence la présence de glycogène.

#### **3.2.4.4.4 Coloration à l'Hématoxyline/Eosine (HE)**

Les structures du foie (hépatocytes) est visualisées par coloration HE.

#### **3.2.4.4.5 Coloration au Red Oil O et au Trichrome de Masson**

La coloration au Red Oil O est une coloration des lipides présents dans les organes inclus en OCT, complétée d'une contre coloration HE. C'est un lysochrome qui colorera la graisse en rouge. Le Red Oil O est employé pour confirmer la stéatose hépatique. La stéatose a été évaluée grâce à cette coloration, selon la classification de Kleiner (2005) : score de 0 pour une stéatose inférieure à 5% (surface du foie stéatosé), score de 1 si elle est comprise entre 5 et 33%, score de 2 si elle est comprise entre 33 et 66% et score de 3 si elle est supérieure à 66%.

La fibrose du foie est étudiée grâce à la coloration au Trichrome de Masson. En effet, la stéatose peut mener à la stéato-hépatite ou NASH (non alcoholic steatohepatitis) qui peut être caractérisée par l'apparition d'une fibrose à la stéatose existante (Nseir, Nassar et Assy, 2010).

#### **3.2.4.4.6 Etude du stress oxydant tissulaire**

La sonde fluorescente, dihydroéthidine (DHE), est employée pour évaluer la formation *in situ* des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par une méthode décrite par Dal-Ros et al. (2010 ; 2011). Des cryocoupes de 10 µm de foie et de muscle sont incubées avec la DHE (2.5

$\mu\text{mol/L}$ ) en chambre noire humide à 37°C pendant 30 minutes. La fluorescence émise (610 nm) est visualisée par microscopie et l'intensité de fluorescence est calculée sur cinq champs aléatoires par coupe (NIS-Éléments BR, Nikon, Paris, France) (Dal-Ros et al., 2010). Les résultats sont exprimés par rapport aux rats contrôles considérés à 100 % de fluorescence.

# **4 Résultats et discussions**

#### 4.1 Mise au point des paramètres de réaction post-colonne du système HPLC-AOx

La première partie de mon travail a consisté en l'optimisation des paramètres de réactivité du couplage chromatographique post-colonne. De nombreux paramètres ont ainsi été étudiés : la concentration du réactif ABTS<sup>•+</sup> ; la nature du solvant de dilution du réactif ; le débit du réactif ; les dimensions et la géométrie de la boucle de réaction ; et la température de la boucle de réaction. Nous avons étudié l'influence de ces paramètres sur les aires et les hauteurs des pics négatifs résultant de la décoloration post-colonne du radical ABTS<sup>•+</sup>, ainsi que sur la préservation de la résolution chromatographique obtenue avant le système post-colonne.

La concentration et le débit du radical se sont révélés déterminant, car ils définissent l'amplitude et la sensibilité de la détection. En effet, une concentration trop faible implique une saturation rapide de par la décoloration totale du radical par un anti-oxydant. Au contraire, une concentration trop élevée nécessite également une concentration importante des analytes afin de détecter la décoloration, résultant souvent en une perte de résolution chromatographique. La longueur et le diamètre interne de la boucle de réaction définissent le temps de contact entre la phase mobile et le réactif avant la seconde détection. Ainsi, plus le volume de la boucle est grand, plus ce temps de contact est important, et plus les composés anti-oxydants ayant une cinétique de réactivité lente sont détectés. Le diamètre interne est également déterminant quant à la préservation de la résolution chromatographique. L'utilisation d'un Té mélangeur favorisant un mélange plus homogène entre la phase mobile et le réactif et permet une meilleure stabilité de la ligne de base.

Ainsi, dans un premier temps les conditions optimales trouvées sont présentées dans le tableau 4-1, et ont été appliquées pour l'analyse des composés anti-oxydants du café :

**Tableau 4-1 : Conditions de réaction post-colonne pour l'étude des anti-oxydants du café**

Paramètres choisis		
<b>Réactif ABTS<sup>•+</sup></b>	Solvant de dilution	Tampon phosphate pH 7,4
	Concentration	Dilution au 50 <sup>ème</sup> de la solution mère, ajustée à une absorbance de $1,2 \pm 0,02$ à 734 nm
	Débit	0,5 mL/min (ratio 1:2 p/r au débit de la phase mobile)
<b>Réacteur</b>	Longueur	3 m
	Diamètre interne	0,25 mm
	Température	20 °C

Après acquisition d'un nouveau système chromatographique (Dionex), des modifications à cette méthode ont encore été apportées avant de procéder à l'analyse des composés anti-oxydants dans les extraits de fruits et légumes (Tableau 4-2). Par ailleurs, les pompes de ce système HPLC générant moins de pulsations lors du pompage du réactif ABTS<sup>•+</sup>, le mélange entre la phase mobile et le réactif est plus homogène, résultant en la réduction importante du bruit de la ligne de base.

**Tableau 4-2 : Conditions de réaction post-colonne choisies pour l'étude des anti-oxydants des fruits et légumes**

Paramètres choisis		
<b>Réactif ABTS<sup>•+</sup></b>	Solvant de dilution	Tampon phosphate pH 7,4
	Concentration	Dilution au 50 <sup>ème</sup> de la solution mère, ajustée à une absorbance de $1,2 \pm 0,02$ à 734 nm
	Débit	0,5 mL/min (ratio 1:2 p/r au débit de la phase mobile)
<b>Réacteur</b>	Longueur	25 m (augmente le temps de contact)
	Diamètre interne	0,25 mm
	Géométrie	Ajout de nœuds (turbulences locales favorisant le mélange entre la phase mobile et le réactif)
	Température	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 °C pour l'analyse des EPDS</li> <li>• 60 °C pour l'analyse des EG (réduction de la viscosité et donc de la pression dans le réacteur liés à l'utilisation d'isopropanol comme phase mobile)</li> </ul>

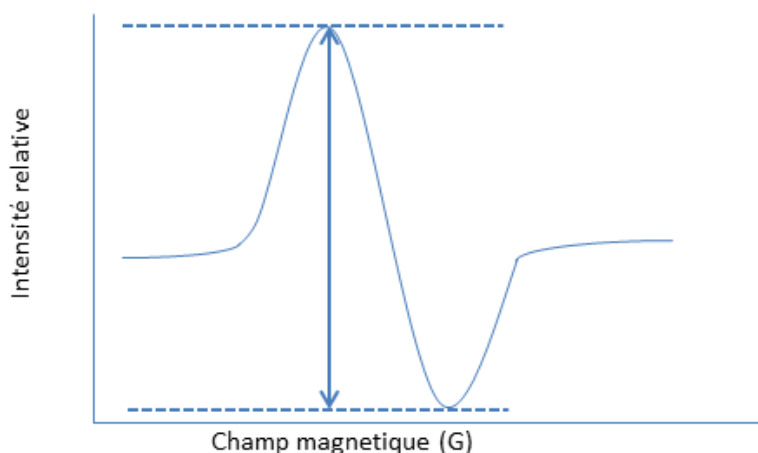
#### 4.2 Essais de couplage HPLC-AOx(UV-RPE)

Pourtant très utilisé comme modèle d'étude du pouvoir anti-radicalaire de par sa grande stabilité et sa détection facilitée par spectrophotométrie du fait de sa couleur, le radical ABTS<sup>•+</sup> n'est pas le plus pertinent en biologie. En effet, il serait préférable d'utiliser les espèces radicalaires réellement responsables des phénomènes oxydatifs délétères pour l'organisme. Cependant, leur grande instabilité mais surtout la difficulté de leur détection est un important obstacle au développement de méthodes analytiques. Des essais de couplage HPLC avec une détection de capacité anti-radicalaire par spectrométrie RPE ont ainsi été

réalisés visant à terme le remplacement du radical ABTS par des radicaux plus pertinents en biologie, comme le radical hydroxyle, ou l'anion superoxyde.

Afin d'étudier la faisabilité de ce couplage, nous avons utilisé le même principe que celui décrit précédemment, à savoir un système de réaction post-colonne basé sur l'utilisation du radical ABTS<sup>•+</sup>. Ainsi, une première détection de l'activité anti-radicalaire des analytes anti-oxydants est réalisée par la mesure de la décoloration du radical par mesure spectrophotométrique à 412 nm. Une seconde détection est ensuite réalisée par mesure spectrométrique de résonance paramagnétique électronique. Pour ce faire, le mélange de la phase mobile avec le réactif ABTS en sortie du 2<sup>nd</sup> détecteur est acheminé au spectromètre RPE, où la mesure spectrale est réalisée en ligne grâce à une cellule plate.

Un scan (centré à 0,353374 T, avec une largeur de champ de 0,0080 T) est réalisé toutes les 0,655 s, puis 3 scans sont cumulés, résultant en un scan final toutes les 1,97 s. L'amplitude du signal est ensuite mesurée pour chaque point de mesure par un processus informatique développé au laboratoire (Figure 4-1).



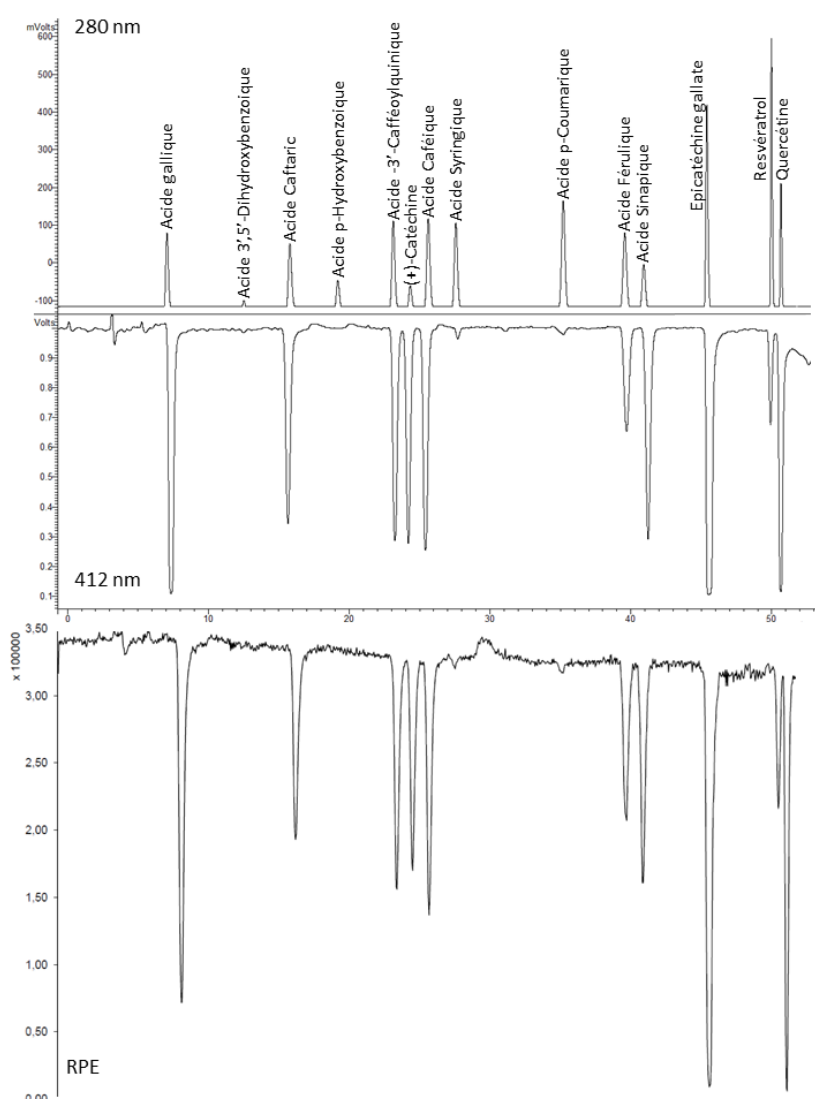
**Figure 4-1 : Mesure de l'amplitude du signal RPE**

Un flux continu composé de la phase mobile mélangé au réactif ABTS<sup>•+</sup> à un ratio de 1/2 avec un débit final de 1,5 mL/min résulte en un signal d'amplitude stable. La réaction entre un composé anti-radicalaire et le radical ABTS<sup>•+</sup>, révélée d'une part par la décoloration de ce dernier détectée à 412 nm, se manifeste également par la diminution de l'amplitude du spectre RPE.

Un mélange équimolaire de 14 composés standards a été utilisé pour évaluer la faisabilité de ce montage. Ce mélange est composé des molécules suivantes à 0,2 mmole/L : l'acide gallique, l'acide 3'5'-dihydroxybenzoïque, l'acide caftarique ; l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide-3'-caféoylquinique, la (+)-catéchine, l'acide caféique, l'acide

syringique, l'acide p-coumarique, l'acide férulique, l'acide sinapique, l'épicatéchine gallate, le resvératrol et la quercétine.

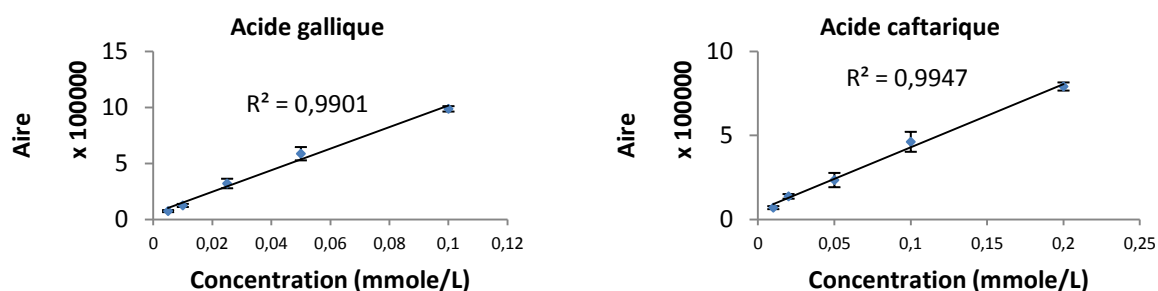
Dans ces conditions expérimentales, l'analyse du mélange de molécules standards a permis de confirmer la faisabilité de couplage (Figure 4-2), et confirme par ailleurs que la décoloration du radical est bien le résultat d'un mécanisme anti-radicalaire et non pas d'un mécanisme modifiant uniquement son absorbance à 412 nm. En effet, les pics négatifs du profil chromatographique à 412, résultant de la décoloration du radical  $ABTS^{+}$ , présentent tous un pic résultant de la diminution de l'amplitude du signal RPE. De plus, l'intensité des pics du chromatogramme RPE est bien corrélée avec celle des pics du chromatogramme à 412 nm. Cependant, le bruit du chromatogramme RPE est très important.



**Figure 4-2 : Profil chromatographique HPLC-UV-AOx(UV+ESR) d'un mélange équimolaire (0,2 mmol/L) de 14 molécules standards**

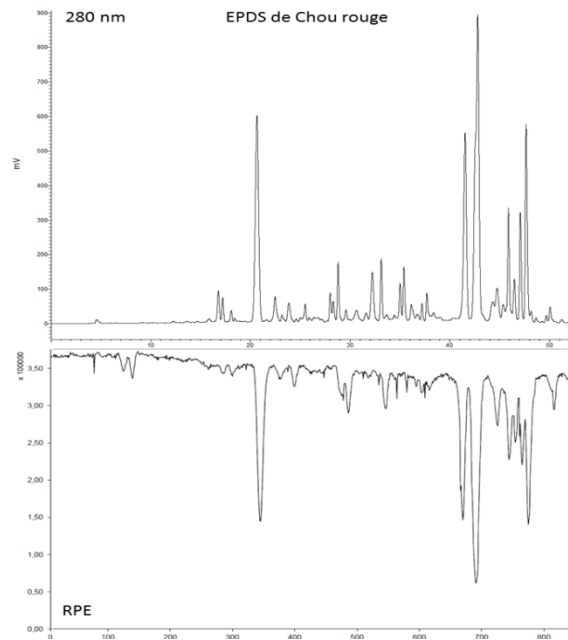
L'analyse de deux composés standards, l'acide gallique et l'acide caftarique, a permis de déterminer la linéarité de la mesure de leur capacité anti-radicalaire, obtenue par intégration des pics du profil chromatographique RPE, respectivement entre 0,05 et 0,1 mmole/L et entre 0,01 et 0,2 mmol/L (Figure 4-3). Cependant, le bruit étant important, la limite de détection (LOD) de leur capacité anti-radicalaire était respectivement de 0,025 et 0,05 mmole/L, et leur limite de quantification (LOQ) était respectivement de 0,05 et 0,1 mmol/L.

L'analyse d'un échantillon complexe, l'extrait polaire désucre de chou rouge, a finalement révélé que le couplage HPLC-RPE résulte en une perte de la résolution chromatographique, vraisemblablement liée à l'ajout de tubulures nécessaire à l'amenée du flux chromatographique vers le résonnateur du spectromètre de RPE et la géométrie de la cellule de mesure utilisée, qui présentait un trop important volume, non pas au niveau de la mesure elle-même, mais au niveau des raccords (Figure 4-4). C'est la première fois qu'un tel couplage chromatographique a été réalisé et a permis la mesure moléculaire quantitative en ligne du spectre RPE d'un mélange complexe.



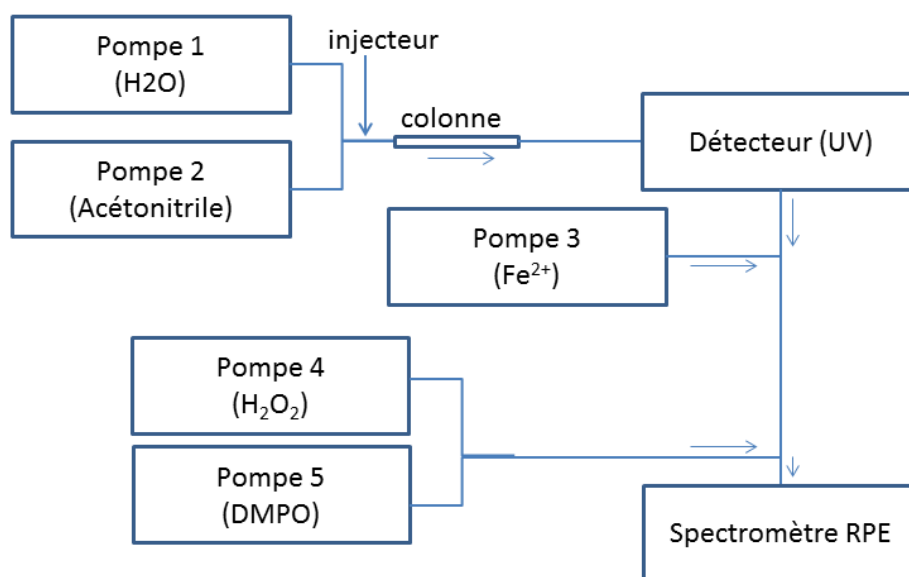
**Figure 4-3 : Gammes étalon de l'activité anti-radicalaire de l'acide gallique et de l'acide caftarique mesuré par HPLC-AOx (RPE)**





**Figure 4-4 : Profil chromatographique HPLC-UV-AOX(ESR) de l'EPDS de chou rouge**

Nous avons alors procédé à des essais préliminaires de génération de radicaux hydroxyles en ligne, par la réaction de Fenton selon le montage présenté en figure 4-5. Une première pompe permet de réaliser le mélange entre la phase mobile et le  $Fe^{2+}$ . Deux autres pompes sont utilisées pour réaliser un mélange extemporané et continu entre le peroxyde d'hydrogène et un spin trap le DMPO (5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxyde). Ce montage a permis l'obtention d'une production de radicaux hydroxyles mesurables par spectrométrie RPE. Les premières expériences réalisées ont été très prometteuses puisque nous avons réussi à générer en ligne des radicaux hydroxyles, à les piéger avec le DMPO et à les détecter en ligne par RPE. Cependant, lors de l'analyse de mélanges complexes il a fallu réaliser des gradients chromatographiques et donc injecter dans le système un modificateur de polarité organique tel que l'acétonitrile. La réaction de Fenton s'est immédiatement arrêtée et un précipité s'est formé, résultant en une disparition du signal RPE.



**Figure 4-5 : Montage du couplage HPLC-AOx(RPE) – réaction de Fenton**

Ces essais préliminaires suggèrent donc la faisabilité d'un couplage HPLC-RPE permettant la détection en ligne de l'activité anti-radicalaire des analytes. Toutefois, avant de pouvoir substituer le radical  $ABTS^{*+}$  par des radicaux biologiquement plus pertinents, d'importantes modifications sont encore nécessaires. Plusieurs axes d'optimisation sont ainsi possible, comme la mise au point de méthodes séparatives n'utilisant pas, ou très peu, de solvants organiques, notamment par la chromatographie haute température (HTLC). Par ailleurs, la modification du mode de génération des ROS peut également être envisagée, par exemple par la dissociation thermique d'initiateurs de ROS, ou l'irradiation UV.

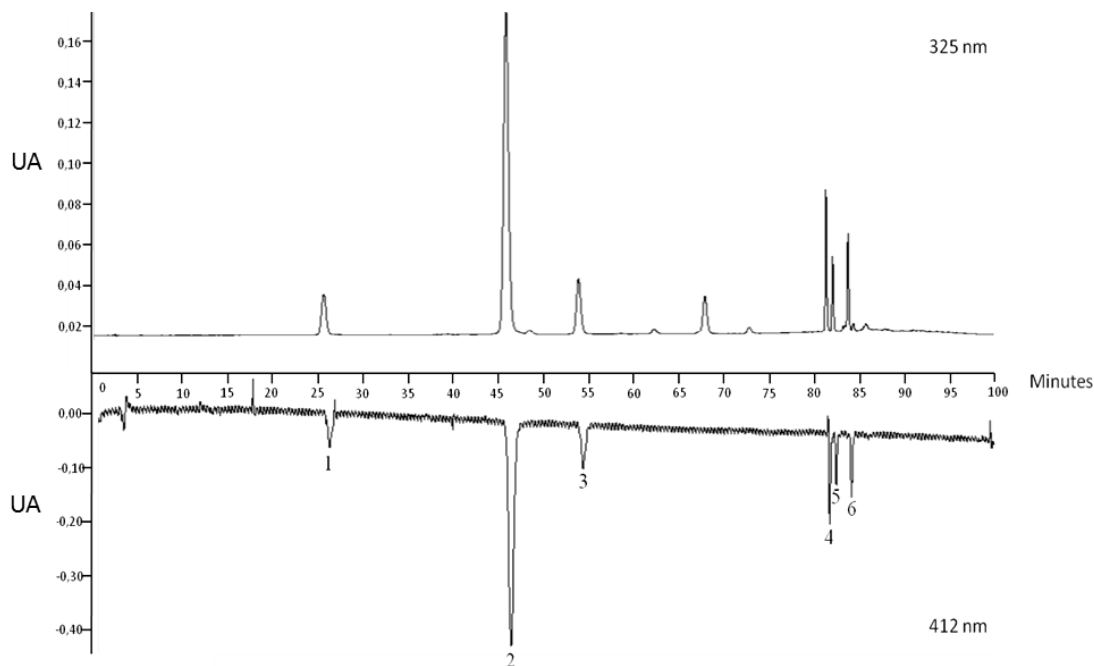
### 4.3 Etude de l'impact du processus de torréfaction sur les anti-oxydants du café

#### - Les anti-oxydants natifs du café :

Le café vert a servi ici de référence pour la détection et l'identification des molécules anti-oxydantes natives du café. Le profil HPLC-AOx du café vert, c'est-à-dire n'ayant subi aucun processus de torréfaction, présente 6 pics à 325 nm avec des correspondances négatives à 412 nm, témoignant de la capacité anti-radicalaire de ces 6 molécules (Figure 4-6). Ces pics sont numérotés de n°1 à 6. Leur capacité anti-radicalaire est proportionnelle à l'aire du pic négatif, et a été exprimée en concentration de trolox donnant une activité anti-radicalaire équivalente. D'autres pics ont pu être détectés par absorbance UV-visible à 325 nm.

Cependant, l'absence de pics négatifs correspondants démontre qu'ils ne sont pas dotés de pouvoir anti-oxydant. Ces 6 composés possèdent tous un spectre UV-visible caractéristique des acides chlorogéniques, à savoir un  $\lambda_{\text{max}}$  entre 325 et 327 nm et un épaulement entre 290 et 300 nm. C'est pourquoi nous avons choisi une longueur d'onde de 325 nm pour détecter la présence des molécules de cette classe dans les extraits de café.

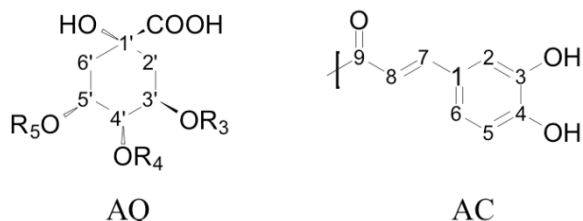
L'identité du pic majoritaire, n°2, a pu être vérifiée par comparaison de son temps de rétention, de son spectre de masse et de ses spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  avec ceux d'un standard commercial de l'acide 3'-O-caféoylquinique (3'-CQA). Les spectres de masse des pics n°1, 3, 4, 5 et 6 suggèrent des structures de type acide caféoylquinique pour les 2 premiers, et de type acide dicaféoylquinique pour les 3 suivants. Ces structures ont pu être confirmées par leur analyse RMN  $^1\text{H}$  démontrant des déplacements chimiques caractéristiques dans la gamme entre 6,2 et 7,7 ppm, et entre 1,9 et 5,4 ppm. Les positions des fonctions caféoyl ont pu être déterminées grâce à leur effet découplant sur le proton correspondant de l'acide quinique (H-3', H-4' ou H-5') (Tolonen, A et al 2002 ; Shang, T.F. et al 2010). Les pics 1, 3, 4, 5 et 6 correspondent ainsi respectivement aux acides 5' et 4'-O-caféoylquiniques, et aux acides 3',4'-3',5'- et 4',5'-O-dicaféoylquiniques (Figure 4-7).



**Figure 4-6 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait de café vert (Extrait dilué 5x)**

Le chromatogramme supérieur est obtenu par la détection post-colonne de l'absorbance à 325 nm. Le chromatogramme inférieur est obtenu par mesure de l'absorbance à 412 nm après réaction post-colonne avec le radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

Pic n°	ID	R3	R4	R5
1	5'-CQA	H	H	AC
2	3'-CQA	AC	H	H
3	4'-CQA	H	AC	H
4	3',4'-DCQA	AC	AC	H
5	3',5'-DCQA	AC	H	AC
6	4',5'-DCQA	H	AC	AC



**Figure 4-7 : Structure chimique des molécules anti-oxydantes du café vert**

Pic n°1: Acide 5'-O-Caféoylquinique (5'-CQA)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD):  $\delta$ : 1,96 (m, 1H, H-2'a);  $\delta$ : 2,12 (m, 1H, H-6'a);  $\delta$ : 2,16 (m, 1H, H-2'e);  $\delta$ : 2,21 (m, 1H, H-6'e);  $\delta$ : 3,65 (dd, 1H,  $J = 8,0; 3,5$ ; H-4');  $\delta$ : 4,15 (td, 1H,  $J = 8,9; 3,5$ ; H-3');  $\delta$ : 5,36 (dd, 1H,  $J = 8,0; 3,7$ ; H-5');  $\delta$ : 6,31 (d, 1H,  $J = 16,0$ ; R<sub>3</sub> H-8);  $\delta$ : 6,77 (d, 1H,  $J = 8,3$ ; R<sub>3</sub> H-5);  $\delta$ : 6,94 (dd, 1H,  $J = 8,3; 2,1$ ; R<sub>3</sub> H-6);  $\delta$ : 7,05 (d, 1H,  $J = 2,1$ ; R<sub>3</sub> H-2);  $\delta$ : 7,59 (d, 1H,  $J = 16,0$ ; R<sub>3</sub> H-7); <sup>13</sup>C NMR (MeOD):  $\delta$ : 35,14 (C-2');  $\delta$ : 40,11 (C-6');  $\delta$ : 66,73 (C-3');  $\delta$ : 71,32 (C-5');  $\delta$ : 73,22 (C-4');  $\delta$ : 113,61 (C-2);  $\delta$ : 114,31 (C-8);  $\delta$ : 115,01 (C-5);  $\delta$ : 121,33 (C-6);  $\delta$ : 145,49 (C-7). HRMS (QToF)  $m/z$ : 377,08325 [M+Na]<sup>+</sup>, masse calculée : 354,09402; C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>.

Pic n°2: Acide 3'-O-Caféoylquinique (3'-CQA)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD):  $\delta$ : 2,07 (m, 2H, H-2'a and H-6'a);  $\delta$ : 2,21 (m, 2H, H-2'e and H-6'e);  $\delta$ : 3,73 (dd, 1H,  $J = 8,4; 3,2$ ; H-4');  $\delta$ : 4,17 (dd, 1H,  $J = 8,1; 3,2$ ; H-5');  $\delta$ : 5,33 (m, 1H,  $J = 8,1$ ; H-3');  $\delta$ : 6,26 (d, 1H,  $J = 15,9$ ; R<sub>1</sub> H-8);  $\delta$ : 6,78 (d, 1H,  $J = 8,2$ ; R<sub>1</sub> H-5);  $\delta$ : 6,95 (dd, 1H,  $J = 8,2; 2,0$ ; R<sub>1</sub> H-6);  $\delta$ : 7,05 (d, 1H,  $J = 2,0$ ; R<sub>1</sub> H-2);  $\delta$ : 7,56 (d, 1H,  $J = 15,9$ ; R<sub>1</sub> H-7). <sup>13</sup>C NMR (MeOD):  $\delta$ : 36,83 (C-2');  $\delta$ : 37,07 (C-6');  $\delta$ : 69,48 (C-5');  $\delta$ : 70,32 (C-3');  $\delta$ : 71,79 (C-4');  $\delta$ : 113,67 (C-2);  $\delta$ : 113,8 (C-8); 114,82 (C-5);  $\delta$ : 121,36 (C-6);  $\delta$ : 145,57 (C-7). HRMS (QToF)  $m/z$ : 377,0846 [M+Na]<sup>+</sup>, masse calculée : 354,09537; C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>.

Pic n°3: Acide 4'-O-Caféoylquinique (4'-CQA)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD):  $\delta$ : 2,03 (m, 2H, H-2'a and H-6'a);  $\delta$ : 2,2 (m, 2H, H-2'e and H-6'e);  $\delta$ : 4,3 (td, 2H,  $J = 6,4; 3,3$ ; H-3'; H-5');  $\delta$ : 4,8 (dd, 1H,  $J = 9,3; 2,8$ ; H-4');  $\delta$ : 6,37 (d, 1H,  $J = 15,9$ ; R<sub>2</sub> H-8);  $\delta$ : 6,78 (d, 1H,  $J = 8,2$ ; R<sub>2</sub> H-5);  $\delta$ : 6,97 (dd, 1H,  $J = 8,2; 1,9$ ; R<sub>2</sub> H-6);  $\delta$ : 7,07 (d, 1H,  $J = 1,9$ ; R<sub>2</sub> H-2);  $\delta$ : 7,64 (d, 1H,  $J = 15,9$ ; R<sub>2</sub> H-7). <sup>13</sup>C NMR (MeOD):  $\delta$ : 36,68 (C-2');  $\delta$ : 40,99 (C-6');  $\delta$ : 63,93 (C-3');  $\delta$ : 68,08 (C-5');  $\delta$ : 77,69 (C-4');  $\delta$ : 113,54 (C-2);  $\delta$ : 113,81 (C-8);  $\delta$ : 114,87 (C-5);  $\delta$ : 121,38 (C-6);  $\delta$ : 145,56 (C-7). HRMS (QToF)  $m/z$ : 377,08454 [M+Na]<sup>+</sup>, masse calculée : 354,09532; C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>.

Pic n°4: Acide 3',4'-O-Dicaféoylquinique (3',4'-DCQA)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD):  $\delta$ : 2,1 (m, 2H, H-2'a and H-6'a);  $\delta$ : 2,2 (m, 2H, H-2'e and H-6'e);  $\delta$ : 4,36 (td, 1H,  $J = 9,3; 3,5$ ; H-4');  $\delta$ : 5,0 (dd, 1H,  $J = 8,4; 3,5$ ; H-3');  $\delta$ : 5,63 (dd, 1H,  $J = 8,4; 3,8$ ; H-5');  $\delta$ : 6,26 (d, 1H,  $J = 16,0$ ; H-8-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 6,28 (d, 1H,  $J = 16,0$ ; H-8-R<sub>3</sub>);  $\delta$ : 6,73 (d, 1H,  $J = 8,1$ ; H-5-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 6,77 (d, 1H,  $J = 8,1$ ; H-5-R<sub>3</sub>);  $\delta$ : 6,87 (dd, 1H,  $J = 8,1; 1,9$ ; H-6-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 6,93 (dd, 1H,  $J = 8,1; 2,1$ ; H-6-R<sub>3</sub>);  $\delta$ : 7,02 (d, 1H,  $J = 1,9$ ; H-2-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 7,04 (d, 1H,  $J = 2,1$ ; H-2-R<sub>3</sub>);  $\delta$ : 7,55 (d, 1H,  $J = 16,0$ ; H-7-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 7,57 (d, 1H,  $J = 16,0$ ; H-7-R<sub>3</sub>). HRMS (QToF)  $m/z$ : 517,13266 [M+H]<sup>+</sup>, masse calculée : 516,12534; C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>. Fragmentation obtenue par AutoMS<sup>2</sup> (Energie de collision: 12,7 eV):  $m/z$  353,08831 [M-163]<sup>-</sup>;  $m/z$  335,07712 [M-181]<sup>-</sup>;  $m/z$  191,0565 [M-325]<sup>-</sup>;  $m/z$  179,03516 [M-337]<sup>-</sup>.

Pic n°5: Acide 3',5'-O-Dicaféoylquinique (3',5'-DCQA)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD):  $\delta$ : 2,23 (m, 2H, H-2'a and H-6'a);  $\delta$ : 2,29 (m, 2H, H-2'e and H-6'e);  $\delta$ : 3,98 (dd, 1H,  $J = 7,4; 3,4$ ; H-4');  $\delta$ : 5,39 (m, 1H,  $J = 7,4$ ; H-3');  $\delta$ : 5,43 (m, 1H,  $J = 3,4$ ; H-5');  $\delta$ : 6,27 (d, 1H,  $J = 16,0$ ; H-8-R<sub>1</sub>);  $\delta$ :

6,36 (d, 1H,  $J = 16,0$ , H-8-R<sub>3</sub>);  $\delta$ : 6,74 (d, 1H,  $J = 8,3$  ; H-5-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 6,79 (d, 1H,  $J = 8,3$  ; H-5-R<sub>3</sub>);  $\delta$ : 6,97 (dd, 1H,  $J = 8,3$  ; 2,1 ; H-6-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 6,98 (dd, 1H,  $J = 8,3$  ; 2,1 ; H-6-R<sub>3</sub>);  $\delta$ : 7,07 (d, 1H,  $J = 2,1$  ; H-2-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 7,08 (d, 1H,  $J = 2,1$  ; H-2-R<sub>3</sub>);  $\delta$ : 7,58 (d, 1H,  $J = 16,0$  ; H-7-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 7,62 (d, 1H,  $J = 16,0$  ; H-7-R<sub>3</sub>). HRMS (QToF)  $m/z$ : 517,13372 [M+H]<sup>+</sup>, masse calculée : 516,1264: C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>. Fragmentation obtenue par AutoMS<sup>2</sup> (Energie de collision: 12,7 eV):  $m/z$  353,0878 [M-163]<sup>-</sup> ;  $m/z$  191,0576 [M-325]<sup>-</sup> ;  $m/z$  179,0368 [M-337]<sup>-</sup> ;  $m/z$  135,0451 [M-381]<sup>-</sup>.

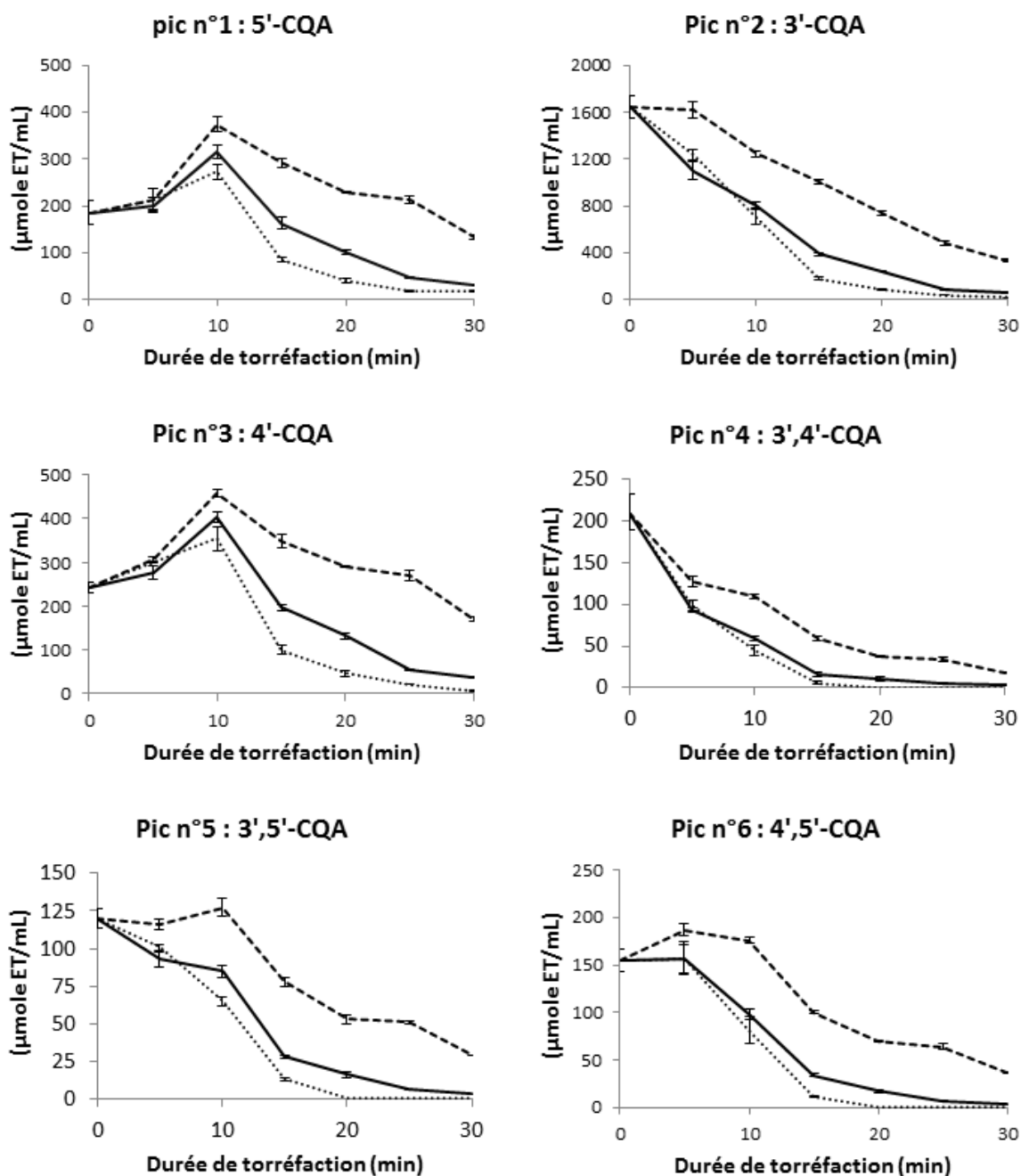
Pic n°6: Acide 4',5'-O-Dicaffeoylquinique (4',5'-DCQA)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD):  $\delta$ : 2,24 (m, 2H, H-2'a and H6'a);  $\delta$ : 2,29 (m, 2H, H-2'e and H-6'e);  $\delta$ : 4,39 (m, 1H,  $J = 2,9$  ; H-5');  $\delta$ : 5,12 (dd, 1H,  $J = 8,6$  ; 2,9 ; H-4');  $\delta$ : 5,64 (td, 1H,  $J = 8,6$  ; 3,2 ; H-3');  $\delta$ : 6,19 (d, 1H,  $J = 16,0$  ; H-8-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 6,28 (d, 1H,  $J = 16,0$  ; H-8-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 6,74 (d, 1H,  $J = 8,2$  ; H-5-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 6,75(d, 1H,  $J = 8,2$  ; H-5-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 6,87 (dd, 1H,  $J = 8,2$  ; 2,2 ; H-6-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 6,92 (dd, 1H,  $J = 8,2$  ; 2,2 ; H-6-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 7,00 (d, 1H,  $J = 2,1$  ; H-2-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 7,02 (d, 1H,  $J = 2,1$  ; H-2-R<sub>2</sub>);  $\delta$ : 7,52 (d, 1H,  $J = 16,0$  ; H-7-R<sub>1</sub>);  $\delta$ : 7,60 (d, 1H,  $J = 16,0$  ; H-7-R<sub>2</sub>). HRMS (QToF)  $m/z$ : 517,13454 [M+H]<sup>+</sup>, masse calculée : 516,12724: C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>. Fragmentation obtenue par AutoMS<sup>2</sup> (Energie de collision: 12,7 eV):  $m/z$  353,08845 [M-163]<sup>-</sup> ;  $m/z$  191,05539 [M-325]<sup>-</sup> ;  $m/z$  179,03294 [M-337]<sup>-</sup> ;  $m/z$  135,04352 [M-381]<sup>-</sup>.

#### - Devenir des anti-oxydants natifs du café au cours de la torréfaction :

C'est par la comparaison des profils anti-oxydants moléculaires des différents cafés torréfiés par rapport à la référence du café vert, que l'influence de ce processus de transformation sur le potentiel anti-oxydant a été étudiée. Deux paramètres entrent en jeu dans la torréfaction : la température et la durée. Le devenir des molécules natives du café au cours de la torréfaction a donc été étudié par la méthode HPLC-AOx, en analysant les extraits de cafés torréfiés pendant 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 minutes, à des températures de 200, 225 ou 235 °C. Comme décrit précédemment, seuls les pics négatifs témoignant de la capacité anti-radicalaire des molécules ont été quantifiés.

La capacité anti-radicalaire liée à 3'-CQA et à 3',4'-DCQA décline tout au long du processus de torréfaction (Figure 4-8). Ainsi, plus la torréfaction est longue ou plus la température de torréfaction est élevée, moins la capacité anti-radicalaire due à ces composés est importante. Les 3',5'-DCQA et 4',5'-DCQA ont un profil très similaire, notamment aux températures élevées. Cependant, c'est seulement au delà de 10 minutes de torréfaction qu'une décroissance de la capacité anti-radicalaire due à ces deux molécules est observée à une température de 200 °C. Etonnamment, les profils d'évolution du 5'-CQA et du 4'-CQA sont très différents. En effet, dans les cafés légèrement torréfiés (< 10 minutes), on observe une augmentation de leur pouvoir anti-radicalaire, passant respectivement de 186 ± 25 µmole ET/L et 242 ± 12 µmole ET/L (café vert) à 375 ± 17 µmole ET/L et 457 ± 8 µmole ET/L (café torréfié 10 minutes à 200°C). Dans un second temps, à partir de 15 minutes de torréfaction, leur capacité anti-radicalaire chute de manière température et durée dépendante. Ainsi, après 30 minutes de torréfaction à 200 °C, ce café n'affiche plus que 134 ± 5 µmole ET/L pour le 5'-CQA et 171 ± 6 µmole ET/L pour le 4'-CQA.



**Figure 4-8 : Evolution de la capacité anti-oxydante du café due aux 6 polyphénols natifs pendant le processus de torréfaction**

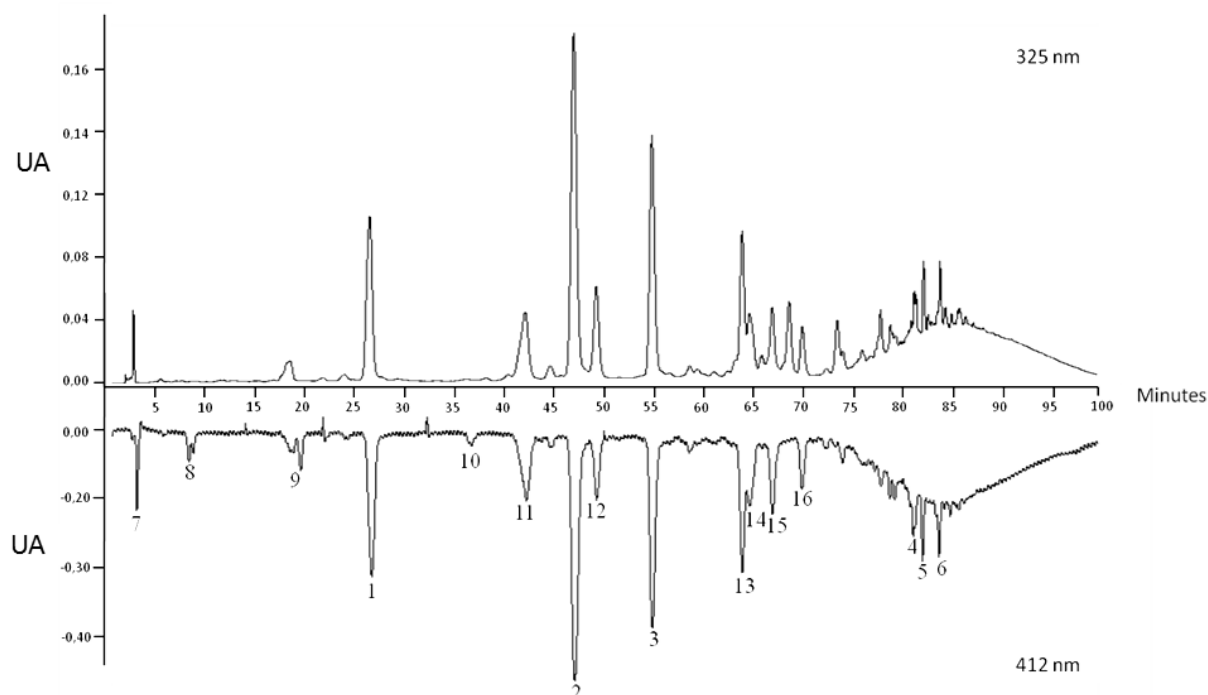
Analyse HPLC-AOx des anti-oxydants natifs du café au cours de la torréfaction. Les extraits de café ont été réalisés et analysés en triplicats. La capacité anti-oxydante des molécules est fonction de l'aire de du pic négatif, et est exprimé en concentration de trolox résultant en une activité anti-radicalaire équivalente (Equivalent Trolox:  $\mu\text{mole ET/L}$  : moyenne  $\pm$  écart-type).

-----200 °C    ————225 °C    .....235 °C

- **Nouveaux composés anti-oxydants issus de la torréfaction du café :**

Ce déclin de l'activité anti-radicalaire des polyphénols natifs au cours de la torréfaction, vraisemblablement lié à leur dégradation, s'accompagne également de

l'apparition de molécules néoformées, dont certaines présentent une capacité anti-radicalaire. Ainsi, on observe jusqu'à 10 nouvelles molécules actives, dont l'activité anti-radicalaire a pu être quantifiée, dans les cafés torréfiés, appelées pics n°7 à 16 (Figure 4-9). Nous avons pu observer également que plus la température de torréfaction est élevée, plus l'apparition de ces nouvelles molécules est précoce. C'est à partir de 10 minutes de torréfaction à 235 °C que la plupart de ces molécules apparaissent dans les chromatogrammes.



**Figure 4-9 : Chromatogramme HPLC-AOx d'un extrait de café torréfié à 225 °C pendant 25 minutes (extrait concentré 4x)**

Le chromatogramme supérieur est obtenu par la détection post-colonne de l'absorbance à 325 nm. Le chromatogramme inférieur est obtenu par mesure de l'absorbance à 412 nm après réaction post-colonne avec le radical ABTS<sup>•+</sup>.

Les analyses par spectrométrie de masse (HRMS et MS<sup>2</sup>) et RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C Heteronuclear Single Quantum Coherence, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C Heteronuclear Multiple Bond Coherence) après purification des molécules par la collecte des pics chromatographiques a permis l'identification de 4 composés néoformés n°13 à 16. Il s'agit respectivement du 5'-O-caféoyl quinolactone, de l'acide 3'-O-féruoylquinique, de l'acide 4'-O-féruoylquinique et du 4'-O-caféoyl quinolactone (Figure 4-10). Les pics n° 11 et 12 présentent encore des ions moléculaires à m/z 353 [M-H]<sup>-</sup> et m/z 367 [M-H]<sup>-</sup> suggérant d'autres structures de type acide caféoylquinique et féruoylquinique. Cependant, ces structures n'ont pu être confirmées par analyse RMN de par une trop faible quantité collectée et un degré de pureté insuffisant.

Pic n°13: 5'-O-Caféoyl-quinolactone (5'-CQL)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD): δ: 2,05 (m, 1H, H-2'a); δ: 2,15 (m, 1H, H-6'a); δ: 2,33 (m, 1H, H-2'e); δ: 2,56 (m, 1H, H-6'e); δ: 4,29 (t, 1H, *J* = 4,9 ; H-4'); δ: 4,74 (t, 1H, *J* = 4,9 ; H-3'); δ: 4,91 (m, 1H, H-5'); δ: 6,3 (d, 1H, *J* = 16,0 ; H-8); δ: 6,78 (d, 1H, *J* = 8,3 ; H-5); δ: 6,96 (dd, 1H, *J* = 8,3 ; 2,1 ; H-6); δ: 7,05 (d, 1H, *J* = 2,1 ; H-2); δ: 7,62 (d, 1H, *J* = 16,0 ; H-7). <sup>13</sup>C NMR (MeOD) : δ: 37,1 (C-2'); δ: 37,9 (C-6'); δ: 65,0 (C-3'); δ: 70,3 (C-5'); δ: 73,2 (C-1'); δ: 77,8 (C-4'); δ: 114,8 (C-8); δ: 115,4 (C-2); δ: 116,7 (C-5); δ: 123,2 (C-6); δ: 147,7 (C-7); δ: 168,2 (C-9); 178,6 (C-1-C=O). HRMS (QToF) *m/z*: 359,07479 [M+Na]<sup>+</sup>, masse calculée : 336,08557: C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>. Fragmentation obtenue par AutoMS<sup>2</sup> (Energie de collision: 10,3 eV): *m/z* 179,03476 [M-157]<sup>+</sup>; *m/z* 161,02345 [M-175]<sup>+</sup>; *m/z* 135,0371 [M-201]<sup>+</sup>; *m/z* 163,03925 [M-173]<sup>+</sup>.

Pic n°14: Acide 3'-O-Féruoylquinique (3'-FQA)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD): δ: 2,0 (m, 2H, H-2'a; H-2'e); δ: 2,17 (m, 2H, H-6'a; H-6'e); δ: 3,73 (dd, 1H, *J* = 8,6 ; 4,5 ; H-4'); δ: 3,89 (s, 3H, 3-OCH<sub>3</sub>); δ: 4,17 (m, 1H, *J* = 2,8 ; H-5'); δ: 5,34 (dt, 1H, *J* = 8,6 ; 2,8 ; H-3'); δ: 6,35 (d, 1H, *J* = 16,0 ; H-8); δ: 6,81 (d, 1H, *J* = 8,2 ; H-5); δ: 7,08 (dd, 1H, *J* = 8,2 ; 1,8 ; H-6); δ: 7,19 (d, 1H, *J* = 1,8 ; H-2); δ: 7,62 (d, 1H, *J* = 16,0 ; H-7). <sup>13</sup>C NMR (MeOD) : δ: 38,4 (C-2'); δ: 38,9 (C-6'); δ: 56,7 (C-3-OCH<sub>3</sub>); δ: 71,4 (C-5'); δ: 72,2 (C-3'); δ: 73,6 (C-4'); δ: 76,3 (C-1'); δ: 112,2 (C-2); δ: 115,8 (C-8); δ: 116,7 (C-5); δ: 124,3 (C-6); δ: 127,9 (C-1); δ: 147,1 (C-7); δ: 168,8 (C-9); δ: 177,3 (C-1-COOH). HRMS (QToF) *m/z*: 391,1003 [M+Na]<sup>+</sup>, masse calculée : 368,11107: C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>. Fragmentation obtenue par AutoMS<sup>2</sup> (Energie de collision: 10,5 eV): *m/z* 191,05438 [M-177]<sup>+</sup>; *m/z* 173,04387 [M-195]<sup>+</sup>; *m/z* 177,05519 [M-191]<sup>+</sup>.

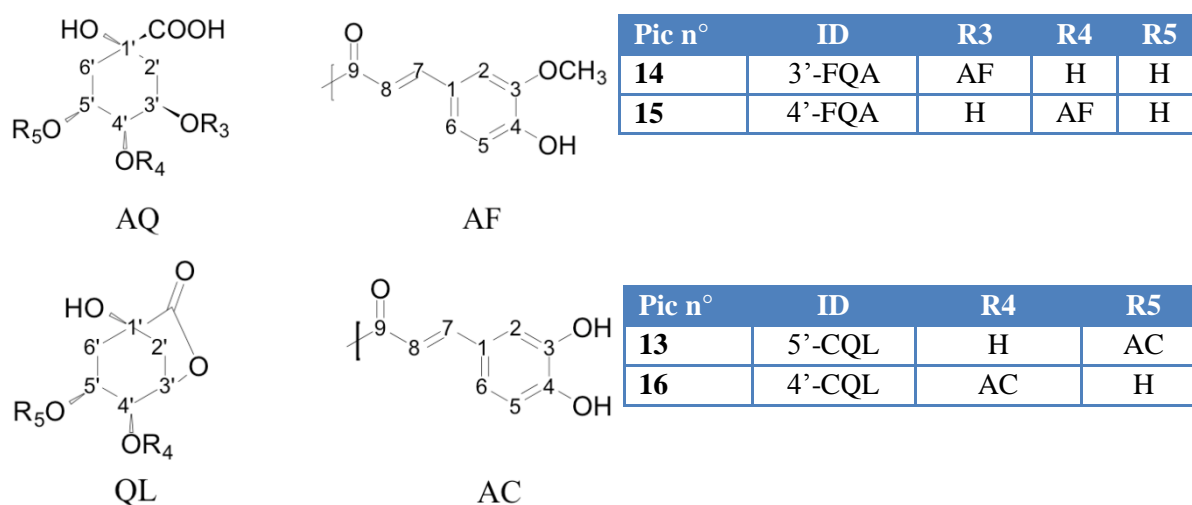
Pic n°15: Acide 4'-O-Féruoylquinique (4'-FQA)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD): δ: 2,05 (m, 2H, H-2'a; H-2'e); δ: 2,2 (m, 2H, H-6'a; H-6'e); δ: 3,89 (s, 3H, H-3-OCH<sub>3</sub>); δ: 4,30 (m, 1H, *J* = 3,5 ; H-3' and H-5'); δ: 4,8 (dd, 1H, *J* = 9,4 ; 3,5 ; H-4'); δ: 6,26 (d, 1H, *J* = 15,9 ; H-8); δ: 6,82 (d, 1H, *J* = 8,1 ; H-5); δ: 7,10 (dd, 1H, *J* = 8,1 ; 2,1 ; H-6); δ: 7,21 (d, 1H, *J* = 2,1 ; H-2); δ: 7,71 (d, 1H, *J* = 15,9 ; H-7). <sup>13</sup>C NMR (MeOD): δ: 38,7 (C-2'); δ: 42,9 (C-6'); δ: 56,8 (C-3-OCH<sub>3</sub>); δ: 65,9 (C-5'); δ: 69,9 (C-3') δ: 79,5 (C-4'); δ: 79,6 (C-1'); δ: 112,1 (C-2); δ: 115,9 (C-8); δ: 116,6 (C-5); δ: 124,2 (C-6); δ: 147,2 (C-7); δ: 169,1 (C-9). HRMS (QToF) *m/z*: 391,09983 [M+H]<sup>+</sup>, masse calculée : 368,11061: C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>. Fragmentation obtenue par AutoMS<sup>2</sup> (Energie de collision: 10,5 eV): *m/z* 177,05488 [M-191]<sup>+</sup>.

Pic n°16: 4'-O-Caféoyl-quinolactone (4'-CQL)

<sup>1</sup>H RMN (MeOD): δ: 1,97 (m, 1H, H-2'a); δ: 2,16 (m, 1H, H-6'a); δ: 2,36 (m, 1H, H-2'e); δ: 2,4 (m, 1H, H-6'e); δ: 3,97 (m, 1H, *J* = 11,6 ; 6,7 ; 4,7 ; H-5'); δ: 4,87 (t, 1H, *J* = 3,8 ; H-4'); δ: 4,91 (t, 1H, *J* = 4,8 ; H-3'); δ: 6,36 (d, 1H, *J* = 16,0 ; H-8); δ: 6,79 (d, 1H, *J* = 8,2 ; H-5); δ: 6,99 (dd, 1H, *J* = 8,2 ; 2,1 ; H-6); δ: 7,08 (d, 1H, *J* = 2,1 ; H-2); δ: 7,64 (d, 1H, *J* = 16,0 ; H-7). <sup>13</sup>C NMR (MeOD) : δ: 38,8 (C-2'); δ: 40,6 (C-6'); δ: 66,3 (C-5'); δ: 68,7 (C-4'); δ: 73,3 (C-1'); δ: 75,3 (C-3'); δ: 114,6 (C-8); δ: 115,4 (C-2); δ: 116,7 (C-5); δ: 123,3 (C-6); δ: 148,1 (C-7); δ: 168,2 (C-9). HRMS (QToF) *m/z*: 337,09286 [M+H]<sup>+</sup>, masse calculée : 336,08559: C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>. Fragmentation obtenue par AutoMS<sup>2</sup> (Energie de collision: 10,0 eV): *m/z* 179,03503 [M-157]<sup>+</sup>; *m/z* 161,02100 [M-175]<sup>+</sup>; *m/z* 135,8926 [M-201]<sup>+</sup>.

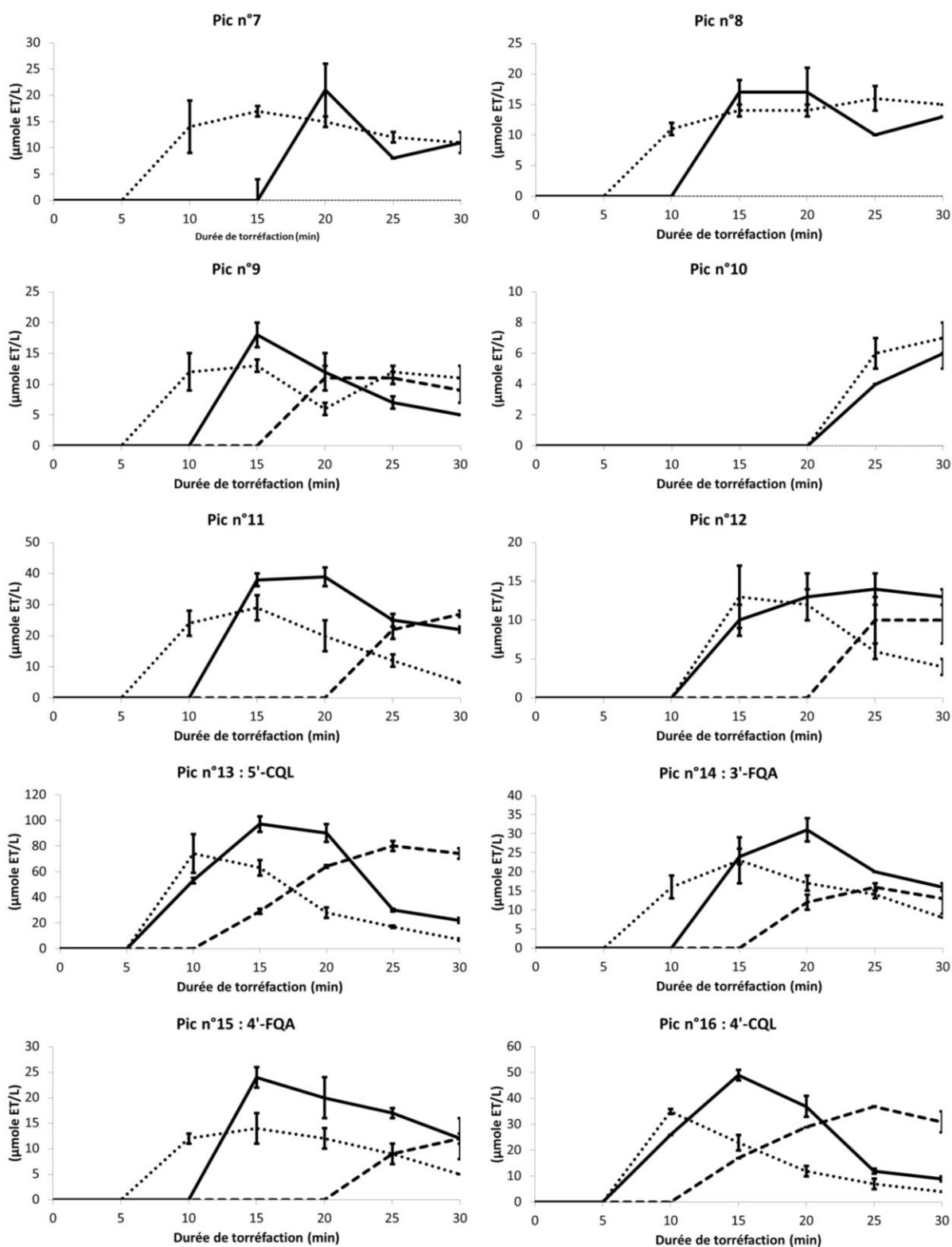




**Figure 4-10 : Structure chimique de plusieurs composés néoformés pendant la torréfaction**

(AQ : Acide Quinique ; AF : Acide Férulique ; AC : Acide Cafféique ; QL : Quinolactone)

La formation des nouvelles molécules anti-oxydantes au cours de la torréfaction suit le même schéma général, quelque soit la température. En effet, après leur apparition, un niveau maximum d'activité anti-radicalaire (équivalent trolox) est atteint, qui décroît ensuite avec la prolongation du processus de transformation. Les 4 composés identifiés (5'-CQL, 3'-FQA, 4'-FQA et 4'-CQL), présentent des valeurs d'activité anti-radicalaires nulles dans le café vert, qui augmentent respectivement jusqu'à  $97 \pm 6$   $\mu\text{mole ET/L}$ ,  $524 \pm 2$   $\mu\text{mole ET/L}$ ,  $24 \pm 2$   $\mu\text{mole ET/L}$  et  $49 \pm 5$   $\mu\text{mole ET/L}$  dans un café modérément torréfié (15 minutes à 225 °C), avant de décroître à  $22 \pm 2$   $\mu\text{mole ET/L}$ ,  $16 \pm 1$   $\mu\text{mole ET/L}$ ,  $12 \pm 1$   $\mu\text{mole ET/L}$  et  $9 \pm 1$   $\mu\text{mole ET/L}$  dans un café intensément torréfié (30 minutes à 225 °C). Toutefois, plus la température est élevée, plus ce processus est accéléré (Figure 4-11).



**Figure 4-11 : Evolution du profil anti-oxydant dû aux molécules néoformées pendant la torréfaction**

Analyse HPLC-AOx des anti-oxydants du café produits au cours de la torréfaction. Les extraits de café ont été réalisés et analysés en triplicats. La capacité anti-oxydante des molécules est fonction de l'aire de du pic négatif, et est exprimé en concentration de trolox résultant en une activité anti-radicalaire équivalente (Equivalent Trolox :  $\mu\text{mole ET/L}$  : moyenne  $\pm$  écart-type).

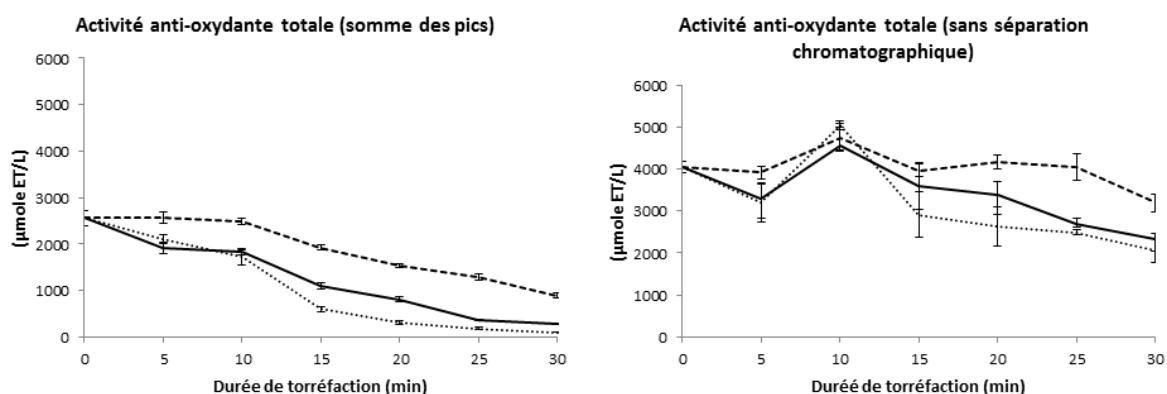
-----200 °C    ————225 °C    .....235 °C

L'évaluation de l'activité anti-oxydante totale des extraits méthanoliques de café a été réalisée par deux méthodes. D'une part, nous avons additionné les activités individuelles décrites précédemment pour chaque extrait. D'autre part, nous avons mesuré cette activité au moyen du même système réactionnel sans séparation chromatographique au préalable (Figure 4-12). Ceci permet de réaliser la mesure du pouvoir anti-oxydant total des extraits de café dans les mêmes conditions réactionnelles que précédemment, c'est-à-dire du milieu réactionnel, de la durée de la réaction et du mode de détection.

Par la méthode d'addition des pics, nous observons une chute progressive du pouvoir anti-oxydant total en fonction de la durée et de la température de torréfaction. Ainsi, les valeurs d'activité anti-radicalaire des extraits de café décroissent à partir de  $2562 \pm 169$   $\mu\text{mole ET/L}$  dans le café vert, jusqu'à  $894 \pm 44$ ,  $279 \pm 16$  et  $106 \pm 12$   $\mu\text{mole ET/L}$  dans les cafés torréfiés pendant 30 minutes respectivement à 200, 225 et 235 °C.

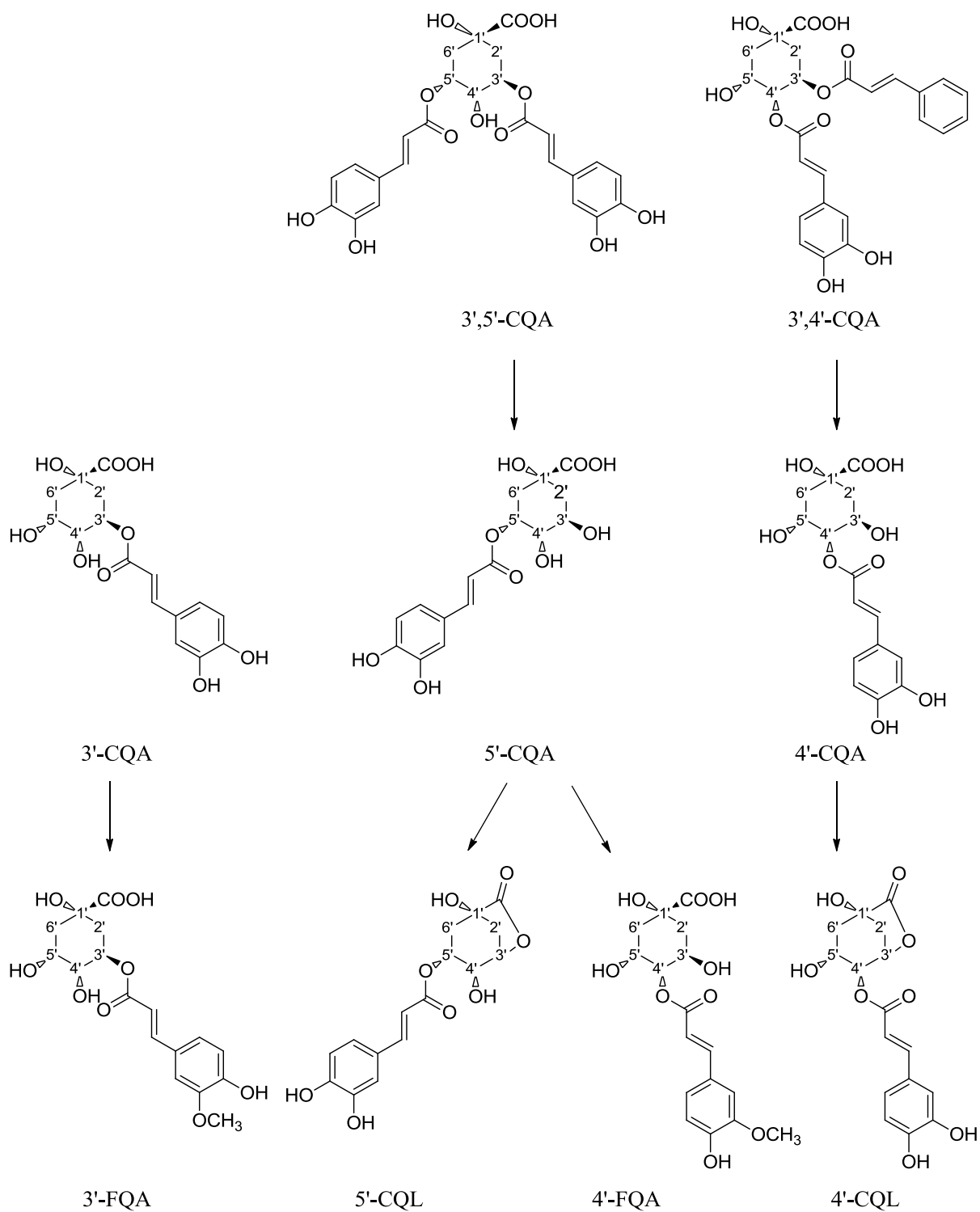
Par la méthode sans séparation, la valeur de la capacité anti-radicalaire du café vert est plus élevée :  $4043 \pm 133$   $\mu\text{M}$ , ce qui représente une augmentation de 57 % par rapport à la méthode d'addition des pics. Un déclin du pouvoir anti-radicalaire est ensuite observé dans les cafés torréfiés à 225 et 235 °C à partir de 15 minutes et jusqu'à 30 minutes. Pour une torréfaction à 200 °C, cette décroissance n'apparaît qu'au delà de 25 minutes. Les valeurs des activités anti-radicalaires finales obtenues dans ces cafés torréfiés pendant 30 minutes sont très nettement supérieures à celles décrites plus haut. En effet, pour des torréfactions respectivement à 200 °C, 225 °C et 235 °C, celles-ci représentent 1847 %, 732 % et 257 % des valeurs obtenues par la méthode d'addition des pics.

**Figure 4-12 : Evolution du pouvoir anti-oxydant total au cours du processus de torréfaction – comparaison de deux méthodes**



Analyse par HPLC-AOx de la capacité anti-oxydante totale du café au cours de la torréfaction. Les extraits de café ont été réalisés et analysés en triplicats. La capacité anti-oxydante totale a été évaluée par addition des pics négatifs (chromatogramme de gauche), et par la méthode en ligne sans séparation chromatographique. Les résultats sont exprimés en concentration de trolox résultant en une activité anti-radicalaire équivalente (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity : TEAC en  $\mu\text{mole/L}$  : moyenne  $\pm$  écart-type).

-----200 °C ————225 °C .....235 °C



**Figure 4-13 : Hypothèse des mécanismes réactionnels provoqués par le processus de torréfaction**

(Seules les molécules identifiées ont été présentées)

**L'étude de l'impact du processus de torréfaction sur les anti-oxydants du café a permis la mise en application d'une méthode analytique adaptée à l'étude individuelle des molécules anti-radicalaires.** En effet, le modèle du café a été utilisé dans cette étude pour tester l'applicabilité de la technique HPLC-AOx après la mise au point des paramètres de réaction post-colonne.

**La torréfaction du café provoque une diminution du pouvoir anti-oxydant total du café au travers de la dégradation des polyphénols natifs. Cette perte en capacité anti-oxydante est toutefois faiblement atténuée par la néoformation entre autres de dérivés polyphénoliques eux-mêmes anti-radicalaires.** Six composés natifs sont ainsi à l'origine du pouvoir anti-oxydant dans le café non-transformé. Ceux-ci subissent des réactions non enzymatiques pendant la torréfaction. Les résultats suggèrent une néoformation des 5'-CQA et 4'-CQA étant donné l'augmentation de leurs valeurs de TEAC dès la première phase du processus.

La néoformation des 5'-CQA et 4'-CQA implique que les autres molécules natives, dont les valeurs TEAC mesurées diminuent tout au long du processus, subissent une dégradation. Il s'agit vraisemblablement des acides dicaféoylquiniques, qui perdent un acide cafféique par un phénomène d'hydrolyse. Ces composés néoformés sont alors eux-mêmes, tout comme les autres molécules natives, soumis à diverses réactions dont la déshydratation ou la méthylation, générant ainsi les caféoylquinolactones, les acides féruloylquiniques ou d'autres composés non identifiés (Figure 4-13). Les molécules néoformées identifiées comme les 4'- et 5'-CQL ou les 3'- et 4'-FQA ont par ailleurs déjà été décrites comme produits issus de la torréfaction du café (Farah et al., 2005). Stalmach et al. (2006), décrit les FQA à la fois dans le café vert et dans le café torréfié de par leurs pics positifs à 325 nm. Cependant, contrairement à nos résultats, aucune activité anti-radicalaire n'est mesurée pour ces composés. Ceci suggère une plus grande sensibilité de la méthode HPLC-AOx que nous décrivons dans cette étude, probablement à travers la détection de la décoloration du radical à 412 nm plutôt qu'à 720 nm, ou encore par l'utilisation d'une concentration plus faible du réactif ABTS<sup>•+</sup>.

Ainsi, les résultats suggèrent que l'ensemble des molécules anti-oxydantes détectées par la méthode HPLC-AOx dans les extraits méthanoliques de café sont des dérivés polyphénoliques plutôt que des produits de la réaction de Maillard. Il semble que la néoformation de ces molécules actives ne compense pas complètement la perte en termes de pouvoir anti-oxydant total suite à la dégradation des molécules natives pendant le processus de transformation, quelque soit la méthode de torréfaction utilisée, contrairement à ce que

décrivent d'autres études (del Castillo, Ames et Gordon, 2002; Stalmach et al., 2006). Ces différences observées sont vraisemblablement dues à l'utilisation d'une méthode TEAC globale sujette à des interférences dans la première étude, et une méthode HPLC couplé à une détection anti-oxydante trop peu sensible dans la seconde. Par ailleurs, ces études ont été réalisées sur la boisson directement, contrairement à notre étude portant uniquement sur les molécules les plus polaires retrouvées dans l'extrait méthanolique.

Toutefois, plus la température de torréfaction est réduite, plus l'activité anti-oxydante restante est élevée. En effet, la capacité anti-oxydante mesurée après 30 minutes de torréfaction à 200 °C est supérieure de 200 % par rapport à celle mesurée dans un café torréfié à 235 °C pendant 20 minutes, tout en aboutissant aux mêmes caractéristiques organoleptiques. L'écart obtenu entre les deux méthodes d'évaluation du pouvoir anti-oxydant total de l'extrait peut s'expliquer par d'éventuels effets synergiques possibles lorsqu'aucune séparation des molécules n'est réalisée. Par ailleurs, certains composés ont pu être irréversiblement retenus sur la colonne chromatographique, résultant en une sous-estimation du pouvoir anti-oxydant total.

A l'issue de cette étude, nous disposons d'une méthode permettant l'analyse moléculaire de la capacité anti-oxydante d'échantillons complexes, dont l'applicabilité a été démontrée. Les paramètres du système post-réactionnel mis au point et utilisés lors de cette étude ont servi de point de départ pour l'adaptation de cette technique analytique à l'étude du pouvoir anti-oxydant d'une sélection de fruits et légumes, dans le cadre du projet EVA.

## 4.4 Résultats du projet EVA

Le potentiel anti-oxydant des fruits et légumes sélectionnés dans cette étude a été étudié par 3 approches successives qui nous ont progressivement permis de classer et de sélectionner les meilleurs aliments candidats. Ainsi, une première approche a consisté en l'évaluation de la capacité anti-radicalaire du point de vue chimique de divers extraits des fruits et légumes. Puis, la capacité anti-oxydante d'une première sélection d'extraits a été étudiée sur un modèle cellulaire. Enfin, les deux meilleurs candidats ont été testés sur un modèle animal *in vivo*.

### 4.4.1 Etude de la chimie anti-oxydante des aliments

#### 4.4.1.1 Rendements de lyophilisation/extractions

Les rendements de lyophilisation et d'extraction sont présentés dans le tableau 4-3. Les quantités de matières sèches des différents fruits et légumes étudiés varient entre 3,9 (courgette) et 18,3 % (cerise). Ces valeurs donnent une première indication de la teneur en sucres de ces aliments. Généralement, plus la quantité de matière sèche est importante, plus la teneur en sucres est importante. Les lyophilisats ont été extraits successivement au pentane, puis au dichlorométhane et enfin au méthanol, donnant ainsi respectivement les extraits gras (EG), les extraits apolaires dégraissés (EADG) et les extraits polaires (EP). Ces derniers ont encore été désuqués par une extraction en phase solide : extrait polaire désuqué (EPDS). L'épinard présente la teneur maximale en extrait gras, avec 258,5 mg d'EG/100 g MF (Matière Fraîche). Les autres fruits et légumes présentent des teneurs en EG significativement plus faibles, comprises entre 120,7 et 15,4 mg d'EG/100 g MF, correspondant respectivement à la carotte et la fraise (var. Salsa). La courgette est de loin le plus riche en EADG avec 928,3 mg/100 g MF, suivie par l'épinard avec une teneur près de 4 fois plus faible. La cerise (var. Folfer) est le plus pauvre en EADG (27,5 mg/100 g MF). En ce qui concerne les EPDS, le chou rouge est le plus riche avec 420,8 mg d'EPDS/100 g MF, suivie par le coing et la cerise. La fraise (var. Salsa), l'asperge et surtout la courgette présentent les teneurs en EPDS les plus faibles.

**Tableau 4-3 : Rendements de lyophilisation et d'extraction**

	variété	MF kg	MS g	% MS	g sucres/100 g MF	mg EG/100 g MF	mg EADG/100 g MF	mg EPDS/100 g MF
<b>Cerise</b>	Régina	4600	844	18,3	13,0	18,8	39,4	179,5
<b>Cerise</b>	Folfer	4260	628	14,7	10,7	30,0	27,5	64,7
<b>Fraise</b>	Florence	4014	381	9,5	5,0	18,0	61,9	43,9
<b>Fraise</b>	Salsa	4009	426	10,6	6,0	15,4	36,5	19,7
<b>Asperge</b>	Andreas	8080	596	7,4	2,7	80,0	103,1	14,3
<b>Tomate</b>	Cindel	6530	418	6,4	3,5	42,9	53,0	59,0
<b>Coing</b>	Commun	6741	1057	15,7	8,9	62,0	101,7	240,9
<b>Courgette</b>		5879	232	3,9	1,9	52,1	928,3	5,8
<b>Chou rouge</b>	Lectro	4307	471	10,9	5,3	27,6	115,6	420,8
<b>Carottes</b>	Bolero	5985	774	12,9	4,4	120,7	94,0	71,9
<b>Céleri-rave</b>	Mentor	5822	554	9,5	2,5	91,8	93,3	91,2
<b>Epinards</b>		1557	117	7,5	0,5	258,5	248,9	132,4
<b>Radis noir</b>		6166	371	6,0	6,0	27,2	29,6	79,5
<b>Oignons</b>		6230	686	11,0	3,6	41,0	82,1	103,4

(MF : Matière fraîche ; MS : Matière sèche ; EG : extrait gras ; EADG : extrait apolaire dégraissé ; EPDS : extrait polaire désucré)

#### 4.4.1.2 Potentiel anti-oxydant global des extraits de fruits et légumes

Afin de pouvoir réaliser une comparaison rapide des aliments, une première évaluation de leur potentiel anti-oxydant, plus précisément de leur capacité anti-radicalaire, est réalisée en micro-plaques. Le pouvoir anti-radicalaire de tous les extraits obtenus a ainsi été évalué par les méthodes TEAC et ORAC, respectivement basées sur des mécanismes de transfert d'électrons et de transfert de protons. Une gamme d'étalonnage de trolox linéaire a été obtenue pour la méthode TEAC entre 10 et 200  $\mu\text{mol/L}$  ( $r^2 \geq 0,99$ ). La méthode ORAC utilise également le Trolox comme référence, pour lequel une gamme d'étalonnage linéaire est obtenue entre 0 et 400  $\mu\text{mol/L}$  ( $r^2 \geq 0,99$ ).

##### 4.4.1.2.1 Les extraits gras

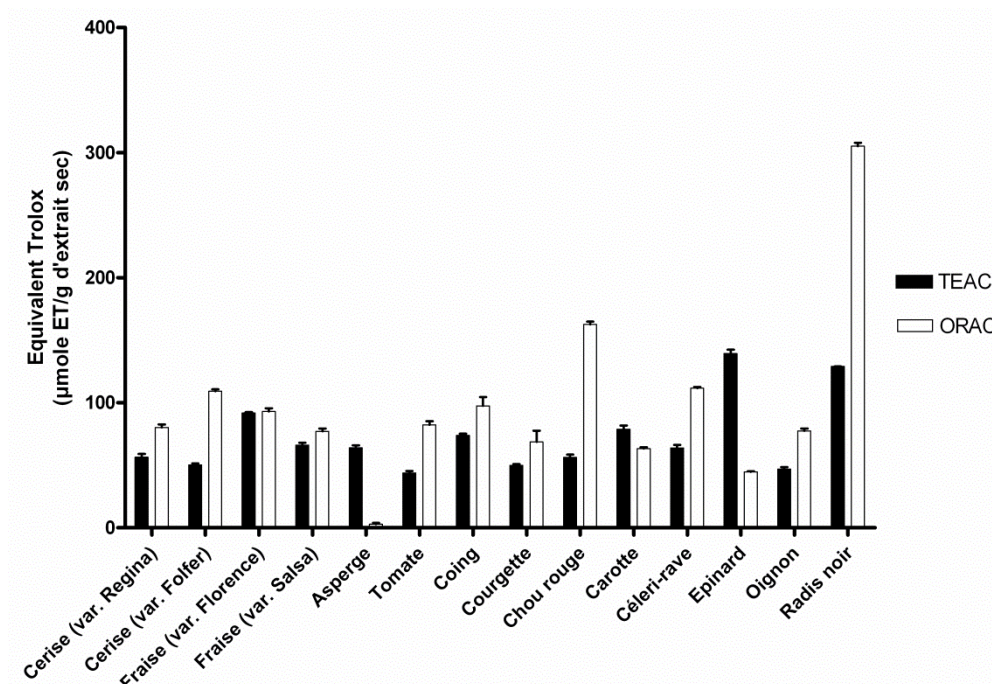
Parmi les 14 extraits étudiés par la méthode TEAC, 12 présentent une activité anti-radicalaire comprise entre  $44 \pm 3$  et  $92 \pm 1$   $\mu\text{mole ET/g EG}$ . Seuls, l'épinard et le radis noir ont démontré un potentiel plus fort, avec respectivement  $139 \pm 6$  et  $129 \pm 1$   $\mu\text{mole ET/g EG}$  (Figure 4-14).

Parmi ces mêmes extraits étudiés par la méthode ORAC, 11 possèdent des capacités anti-oxydantes, présentant des valeurs mesurées comprises entre  $45 \pm 1$  et  $111 \pm 2$   $\mu\text{mole}$



ET/g EG, correspondant respectivement à l'épinard et au céleri-rave. D'une part, l'EG d'asperge se détache de ce groupe par un potentiel anti-radicalaire quasiment nul ( $3 \pm 2$   $\mu$ mole ET/g EG). D'autre part, les EG de chou rouge et du radis noir ont sensiblement le plus fort pouvoir anti-radicalaire (respectivement  $163 \pm 4$  et  $305 \pm 5$   $\mu$ mole ET/g EG).

Une faible corrélation entre les résultats obtenus par les méthodes TEAC et ORAC est observée lors de l'analyse des EG. Or, les écarts entre les résultats obtenus pour les EG de nombreux fruits ou légumes par ces 2 méthodes sont très faibles, suggérant ainsi soit des mécanismes anti-radicalaires à la fois de type transfert d' $e^-$  que de type transfert de proton pour les molécules impliquées. Soit, ces extraits renferment autant de composés du 1<sup>er</sup> type de réactivité que de composés dotés du 2<sup>nd</sup>. Cependant, les EG de chou rouge et de radis noir démontrent des capacités anti-radicalaires nettement supérieures lorsqu'évaluées par la méthode ORAC alors qu'un phénomène inverse est observé pour l'EG d'asperge ou d'épinards. Les mécanismes réactionnels mis en jeu par ces deux méthodes n'étant pas les mêmes, il peut s'agir d'extraits composés de molécules ayant une réactivité préférentielle par un mécanisme soit de type transfert de protons (cerise, chou rouge, radis noir), soit de type transfert d'électrons (asperge, épinard).

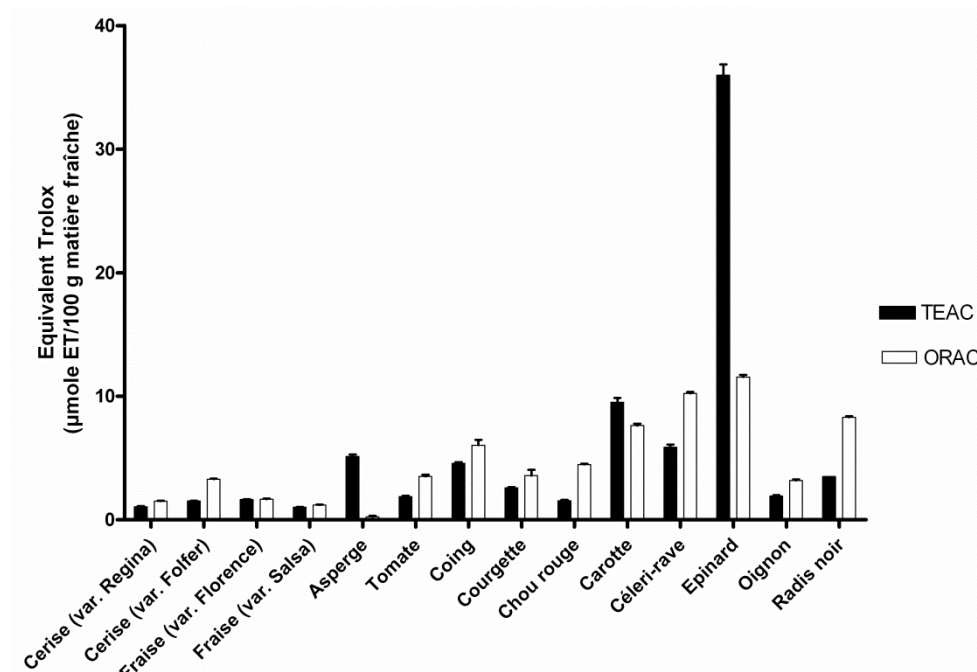


**Figure 4-14 : Capacité anti-oxydante des extraits gras de fruits et légumes**

Les échantillons ont été analysés en triplicat. Les résultats sont exprimés en quantité de trolox équivalent à la capacité anti-oxydante d'un g d'EG (moyenne  $\pm$  écart-type) (corrélation TEAC vs. ORAC :  $r = 0,348$  ;  $p > 0,05$ ).

Lorsque l'on rapporte ces résultats décrits plus haut aux rendements d'extraction, c'est-à-dire exprimés en  $\mu$ mole de ET pour 100 g de matière fraîche, tous les EG présentent

des valeurs inférieures à 40  $\mu\text{mole ET}/100\text{ g MF}$  (Figure 4-15). L'activité anti-oxydante des aliments a souvent été exprimée par rapport à la matière sèche. Cependant, de plus en plus d'études la rapportent par rapport à une portion définie de matière fraîche, ce qui est plus représentatif pour le consommateur. Compte-tenu du rendement d'extraction important pour l'épinard, ce dernier présente le plus fort potentiel anti-radicalaire parmi les EG.

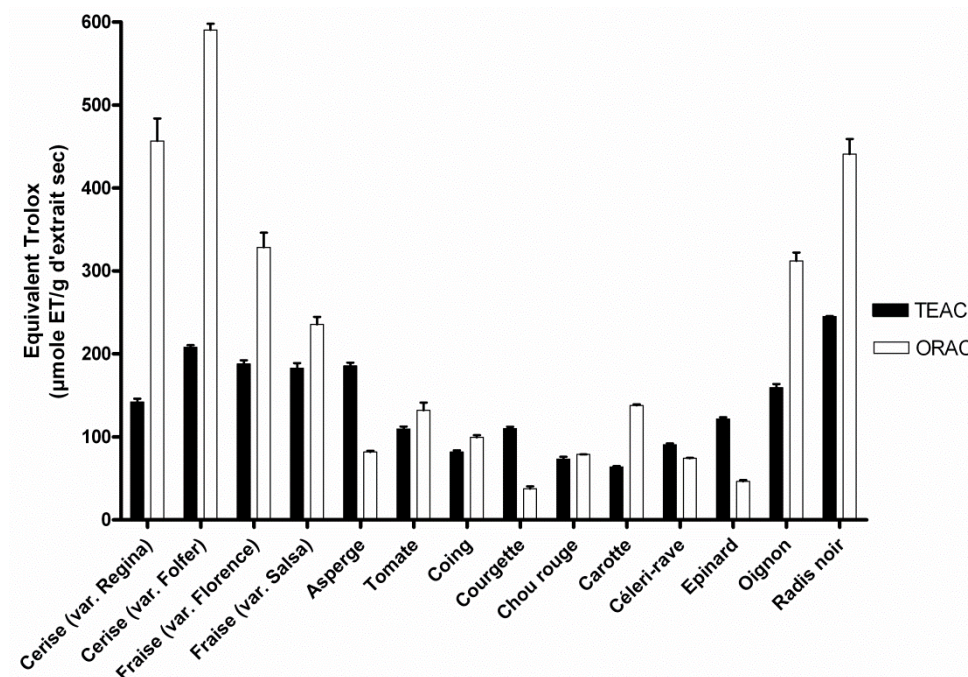


**Figure 4-15 : Capacité anti-oxydante due à l'extrait gras d'une portion de 100 g de fruits ou de légumes**

Les échantillons ont été analysés en triplicat. Les résultats sont exprimés en quantité de trolox équivalent à la capacité anti-oxydante correspondant à 100 g de matière fraîche (moyenne  $\pm$  écart-type).

#### 4.4.1.2.2 Les extraits apolaires dégraissés (EADG)

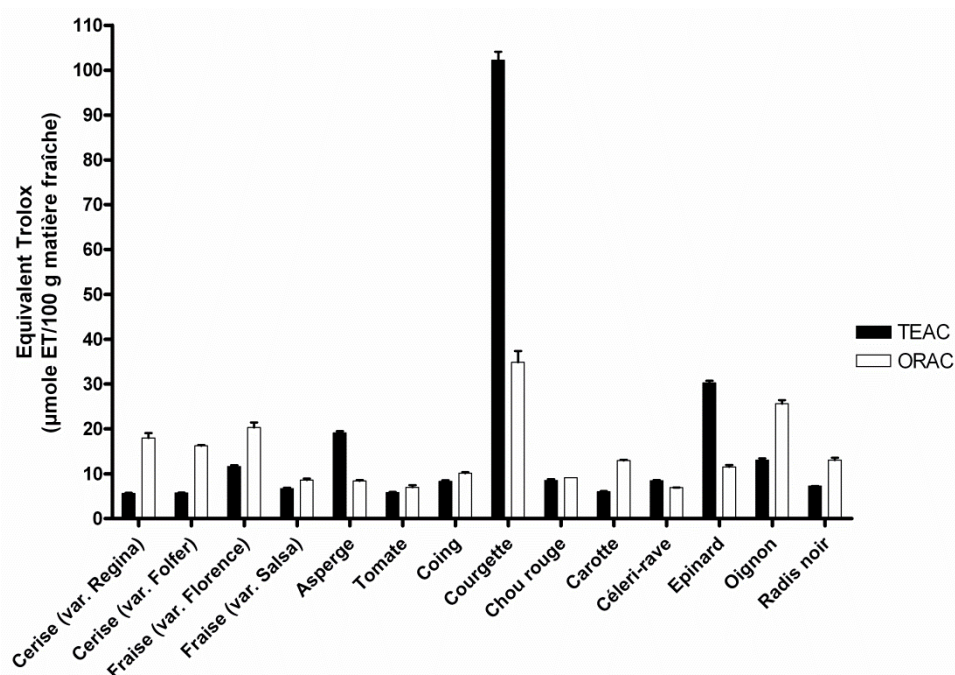
L'activité anti-radicalaire des EADG mesurée par la méthode TEAC est comprise entre  $64 \pm 2$  et  $246 \pm 1$   $\mu\text{mole ET}/\text{g EADG}$ , respectivement pour la carotte et le radis noir (Figure 4-16). La méthode ORAC démontre des valeurs plus disparates, avec un minimum à  $38 \pm 4$   $\mu\text{mole ET}/\text{g EADG}$  pour la courgette, et un maximum à  $591 \pm 13$   $\mu\text{mole ET}/\text{g EADG}$  pour la cerise (var. Folfer). Les résultats obtenus par TEAC et ORAC pour plusieurs échantillons, comme la tomate, le coing, le chou rouge, ou encore le céleri-rave sont très proches. Cependant, dans le cas notamment des deux variétés de cerise, de l'oignon et du radis noir, ces valeurs présentent un écart important. Les mécanismes réactionnels des molécules présentes dans ces EADG peuvent donc différer, et semblent agir de façon préférentielle par transfert de protons (cerise, fraise, carotte, radis noir, oignon), ou par transfert d' $e^-$  (asperge, courgette, épinard).



**Figure 4-16 : Capacité anti-oxydante des extraits apolaires dégraissés des fruits et légumes**

Les échantillons ont été analysés en triplicat. Les résultats sont exprimés en quantité de trolox équivalent à la capacité anti-oxydante d'un g d'extrait sec (moyenne  $\pm$  écart-type) (corrélation TEAC vs. ORAC :  $r = 0,705$  ;  $p < 0,005$ ).

Lorsque l'on considère une portion de 100 g de fruits ou légumes frais, la courgette démontre le potentiel anti-radicalaire lié à son EADG le plus élevé, quelque soit la méthode d'évaluation (Figure 4-17). L'épinard et l'oignon arrivent en seconde position, respectivement selon le dosage TEAC et ORAC. Les 11 autres fruits et légumes sont globalement équivalents en termes de potentiel anti-oxydant impliquant cette catégorie de molécules apolaires non grasses.



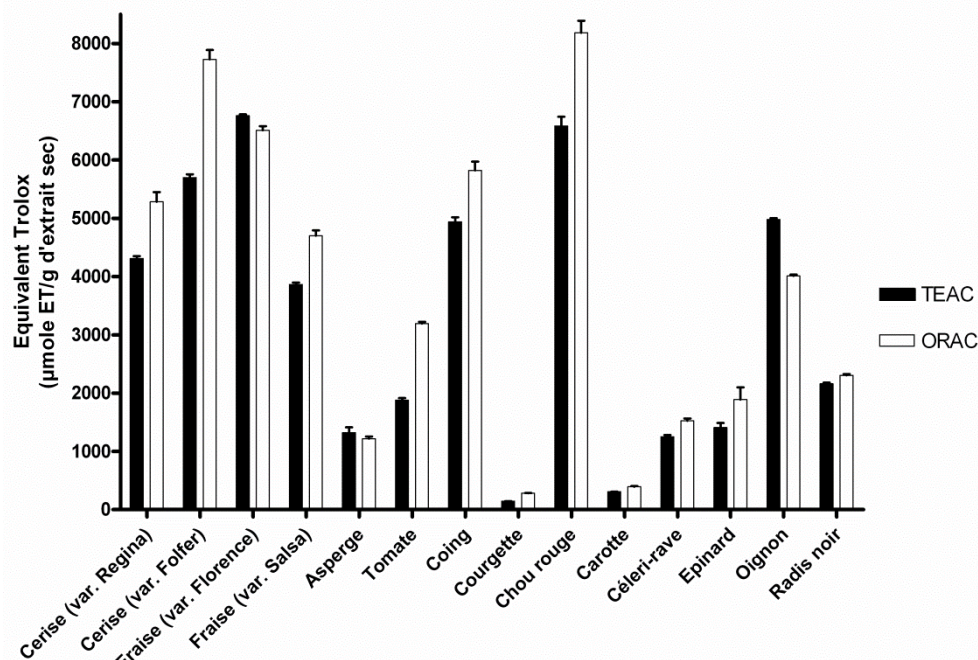
**Figure 4-17 : Capacité anti-oxydante due à l'extrait apolaire dégraissé d'une portion de 100 g de fruits ou de légumes**

Les échantillons ont été analysés en triplicat. Les résultats sont exprimés en quantité de trolox équivalent à la capacité anti-oxydante correspondant à 100 g de matière fraîche (moyenne  $\pm$  écart-type).

#### 4.4.1.2.3 Les extraits polaires désués

Les EPDS démontrent d'une part une forte corrélation entre les valeurs obtenues par TEAC ou ORAC (Figure 4-18). D'autre part, une importante diversité des potentiels anti-radicalaires est obtenue pour les différents fruits et légumes. Les EPDS démontrant les plus fortes activités anti-radicalaires mesurées par TEAC sont la fraise (var. Florence), le chou rouge, et la cerise (var. Folfer) avec respectivement  $6759 \pm 45$  ;  $6583 \pm 273$  et  $5698 \pm 102$   $\mu\text{mole ET/ g EPDS}$ . Les valeurs ORAC classent les mêmes extraits en tête de liste dans l'ordre suivant chou rouge > cerise (var. Folfer) > fraise (var. Florence) ; avec respectivement :  $8187 \pm 350$  ;  $7727 \pm 282$  et  $6511 \pm 123$   $\mu\text{mole ET/ g EPDS}$ . A ces EPDS à fort potentiel anti-oxydant peuvent encore être ajoutés ceux du coing, de l'oignon, de la cerise (var. Regina) et de la fraise (var. Salsa). Les EPDS de l'asperge, de la tomate, du céleri-rave, de l'épinard et du radis noir peuvent être rassemblés en tant que groupe à potentiel anti-oxydant intermédiaire, avec des valeurs ORAC comprises entre  $1218 \pm 62$  et  $3195 \pm 49$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ , et des valeurs TEAC comprises entre  $1251 \pm 50$  et  $2161 \pm 28$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ . Enfin, les EPDS de courgette et de carotte sont les moins actifs.



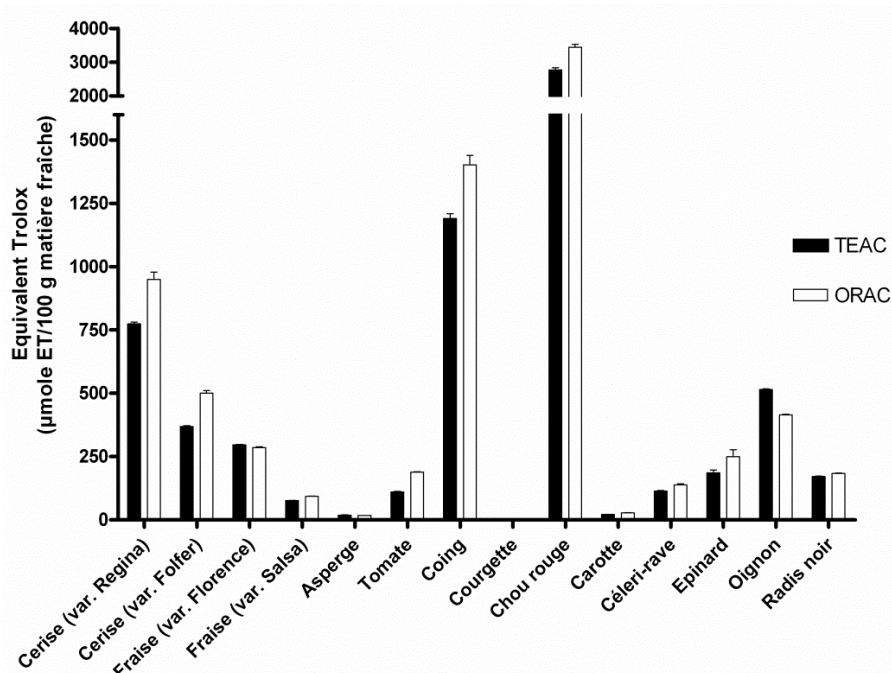


**Figure 4-18 : Activité anti-oxydante des extraits polaires désués des fruits et légumes**

Les échantillons ont été analysés en triplicat. Les résultats sont exprimés en quantité de trolox équivalent à la capacité anti-oxydante d'un g d'extrait sec (moyenne  $\pm$  écart-type) (corrélation TEAC vs. ORAC :  $r = 0,957$  ;  $p < 0,005$ ).

Une portion de 100 g de chou rouge frais offre le plus important pouvoir anti-radicalaire parmi cette sélection de fruits et légumes (Figure 4-19). Celui-ci est suivi par le coing et la cerise (var. Regina). Ces 3 aliments présentent en effet de fortes teneurs en EPDS, dont un pouvoir anti-radicalaire important exprimé en  $\mu$ mole ET/g EPDS a été démontré. La fraise (var. Folfer) au contraire associe une faible teneur en EPDS à un pouvoir anti-radicalaire considérable (Figure 4-18). Il en résulte un potentiel anti-radicalaire global lié aux composés polaires très réduit (Figure 4-19). Enfin, la courgette présente à la fois une teneur très réduite en EPDS, et une très faible activité anti-radicalaire de cet extrait.

L'importante disparité des rendements d'extraction des EPDS des fruits et légumes résulte en une dominance encore plus marquée du chou rouge et du coing comme aliments anti-oxydants.



**Figure 4-19 : Capacité anti-oxydante due à l'extrait polaire désucre d'une portion de 100 g de fruits ou de légumes**

Les échantillons ont été analysés en triplicat. Les résultats sont exprimés en quantité de trolox équivalent à la capacité anti-oxydante correspondant à 100 g de matière fraîche (moyenne  $\pm$  écart-type).

#### 4.4.1.2.4 Discussion

La comparaison des figures 4-15, 4-17 et 4-19 démontre que la capacité anti-oxydante des fruits et légumes provient essentiellement des molécules de caractère polaire.

Les capacités anti-oxydantes évaluées par la méthode ORAC étant généralement plus élevées pour un même échantillon par rapport à celles obtenues par la méthode TEAC, le pouvoir donneur de protons des molécules présentes serait plus important que leur pouvoir donneur d'électron. Les molécules anti-oxydantes naturelles retrouvées dans l'alimentation n'exerceraient pas leur action anti-radicalaire de la même manière. Leopoldini et al. (2004) ont notamment suggéré que le pouvoir anti-oxydant de composés comme l'acide caféique, l'épicatéchine ou l'acide gallique se traduisant préférentiellement par un mécanisme de transfert de protons. Au contraire, dans le cas du kaempferol ou le resvératrol, l'action serait préférentiellement liée à des transferts d'électrons. Ainsi, les écarts observés peuvent résulter de la différence des principes réactionnels sur lesquels ces méthodes reposent. Cependant, la méthode ORAC, au travers de la mesure l'AUC, intègre à la fois la durée de l'inhibition de l'oxydation de la sonde induit par les anti-oxydants présents, mais également son degré d'inhibition. Or, la méthode TEAC, étant une méthode de lecture en point final, elle ne tient pas compte des différences de vitesse des réactions anti-radicalaires que peuvent exercer

différentes molécules. Une étude comparative entre la méthode ORAC et TEAC sur une large sélection de polyphénols a notamment démontré que les valeurs d'activité anti-radicalaire exprimées en équivalent trolox étaient supérieures lorsqu'évaluées par la méthode ORAC pour la grande majorité des molécules (Tabart et al., 2009).

Néanmoins, la forte corrélation des résultats obtenus par ces deux méthodes pour les EPDS résulte à un classement très similaire de l'ensemble des fruits et légumes étudiés en fonction de leur potentiel anti-oxydant.

Lorsque l'on considère une portion de 100 g de fruits ou des légumes frais, on observe que seule la courgette présente une capacité anti-oxydante de l'EADG supérieure à celui de l'EG et de l'EPDS uniquement quelque soit la technique d'évaluation utilisée. Le pouvoir anti-oxydant de tous les autres aliments étudiés peut être donc être réduit à celui correspondant à son EPDS.

Les résultats concernant les EPDS ont donc été pris en compte afin de réaliser un premier classement des fruits et légumes. Ainsi, à l'issue de cette première phase d'étude, les aliments étudiés possèdent un potentiel anti-oxydant du plus au moins fort selon l'ordre suivant :

**Chou rouge > coing > cerise (var. Regina) > oignon/cerise (var. Folfer) > fraise (var. Florence) > épinard > radis noir/tomate/céleri-rave > fraise (var. Salsa) > carotte > asperge > courgette.**

**Une incertitude persiste quand à la pertinence et la fiabilité des résultats obtenus pour les EG et EADG.** En effet, des critiques peuvent être apportées à ces résultats étant donné le caractère apolaire des composés présents dans les EG ou EADG. Le milieu réactionnel peut par exemple influencer les résultats obtenus. Les faibles capacités piégeuses de radicaux mesurées pour ces extraits peuvent avoir été sous-estimées due à une possible incompatibilité avec le milieu réactionnel, pouvant donner lieu par exemple à des interactions de type hydrophobes entre molécules bloquant leurs sites actifs. Diverses méthodes adaptées à l'étude du pouvoir anti-oxydant des molécules liposolubles préconisent l'utilisation de  $\beta$ -cyclodextrines méthylées aléatoirement, afin de solubiliser ces composés en milieu aqueux (Huang et al., 2002). Cependant, il s'agit généralement de molécules pures et non d'extraits complexes. En effet, les essais de solubilisation des EG et EADG des fruits et légumes dans ce type de milieu n'ont pas abouti (données non présentées). De plus, une faible répétabilité inter-manipulation a pu être observée pour le dosage de l'activité anti-radicalaire des EG et des EADG.

La réduction de la capacité anti-oxydante totale des fruits et légumes à celle des EPDS semble donc une approximation acceptable. Dans une autre étude mettant en œuvre une méthode ORAC adaptée aux échantillons liposolubles, il a été montré pour une sélection de 28 aliments, que la part de l'activité anti-radicalaire totale due aux molécules liposolubles est généralement minoritaire, inférieure à 10 % pour 21 aliments de cette sélection, et ne dépasse pas 28 % pour les 7 autres (Wu, Gu, et al., 2004). Il semble ainsi probable que la possible sous-estimation du rôle anti-oxydant des fractions liposolubles au sein des fruits et légumes dans le projet EVA ne doit donc pas influencer de façon importante leur classement final.



### 4.4.1.3 Evaluation du pouvoir anti-radicalaire des fruits et légumes au niveau moléculaire

Les méthodes séparatives compatibles avec le système de réaction post-colonne permettant la détection du pouvoir anti-radicalaire ont pu être mises au point seulement pour les EPDS et les EG. Les EADG ne seront donc pas abordés dans cette partie.

#### 4.4.1.3.1 EPDS

##### 4.4.1.3.1.1 Mise au point de la méthode séparative

Plusieurs phases stationnaires ont été testées afin de réaliser la séparation des molécules d'intérêt des EPDS des fruits et légumes. L'EPDS de cerise a servi de modèle pour la mise au point de la méthode séparative.

Pour chaque phase stationnaire testée, diverses conditions de gradients de phases mobiles ont été évaluées. Seuls les chromatogrammes obtenus par la méthode permettant la meilleure séparation avec la meilleure résolution sont présentés.

Phases stationnaire testées :

- C18 sunfire Waters, 250 x 4,6 mm, 5 µm

Phase mobile : A : H<sub>2</sub>O/acide formique (99,9/0,1) ; B : ACN

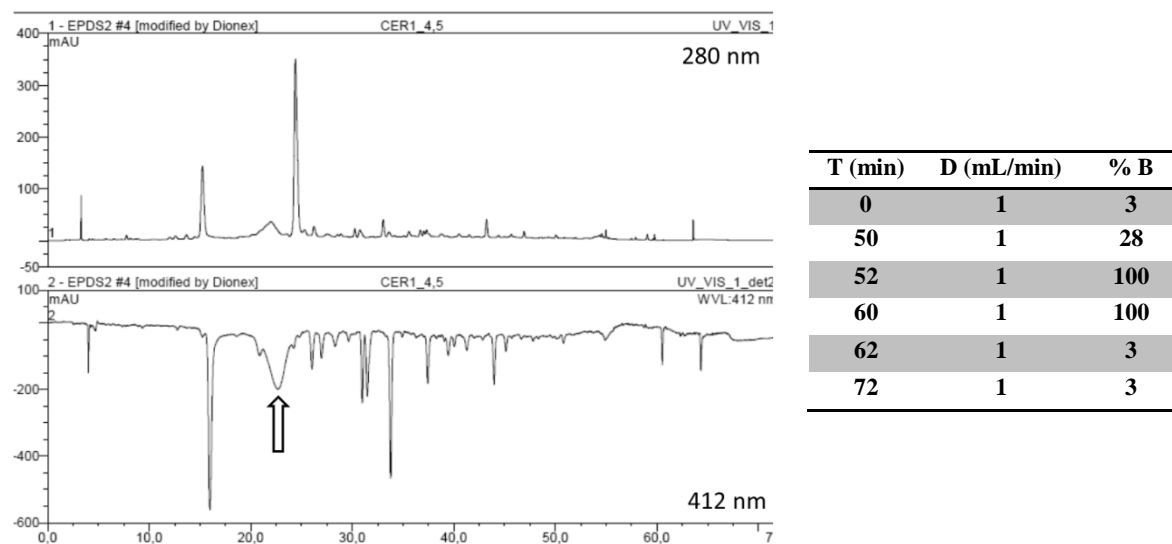
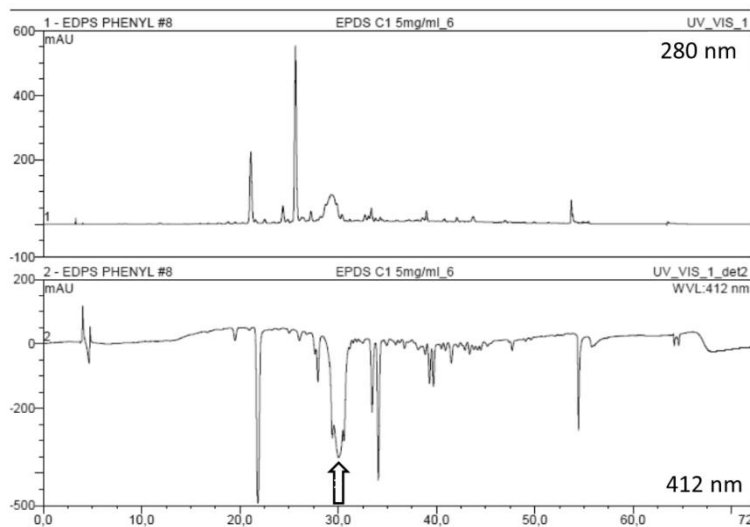


Figure 4-20 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18 (0,1 % acide formique) - (EPDS cerise)

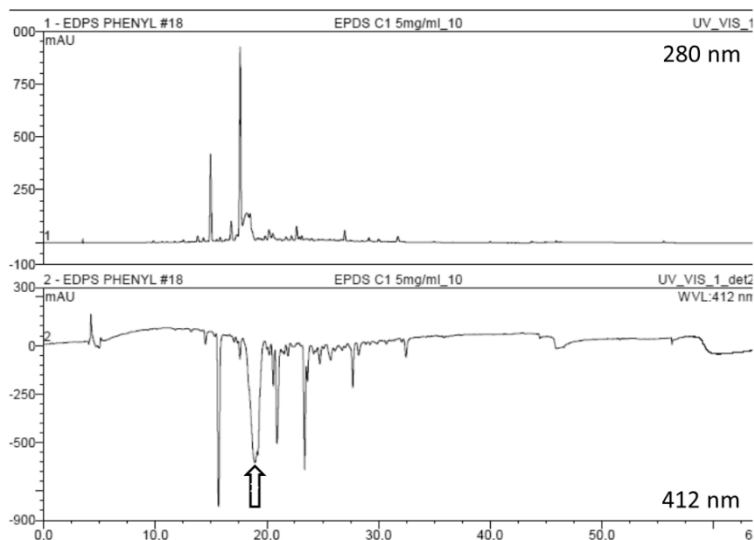
- Zorbax eclipse XDB-phenyl, 250 x4,6 mm, 5 µm  
Phase mobile : A : H<sub>2</sub>O/acide formique (99,9/0,1); B : ACN



T (min)	D (mL/min)	% B
0	1	3
8	1	3
50	1	28
52	1	100
60	1	100
62	1	3
72	1	3

**Figure 4-21 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase XDB-phenyl (0,1 % acide formique) - (EPDS cerise)**

- C18-PFP ACE, 250 x 4,6 mm, 5 µm  
Phase mobile : A : H<sub>2</sub>O/acide formique (99,9/0,1) ; B : ACN

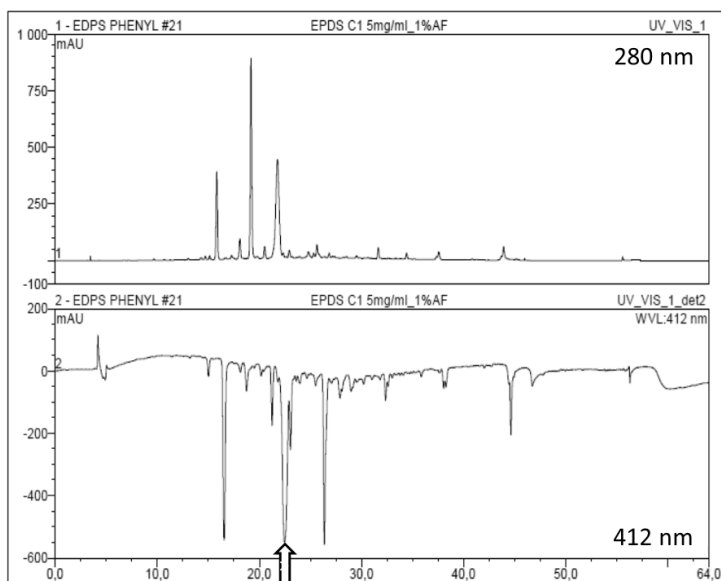


T (min)	D (mL/min)	% B
0	1	3
40	1	35
42	1	100
52	1	100
54	1	3
64	1	3

**Figure 4-22 Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18-PFP (0,1 % acide formique) – (EPDS cerise)**

Effet de la modification de la phase mobile par acidification :

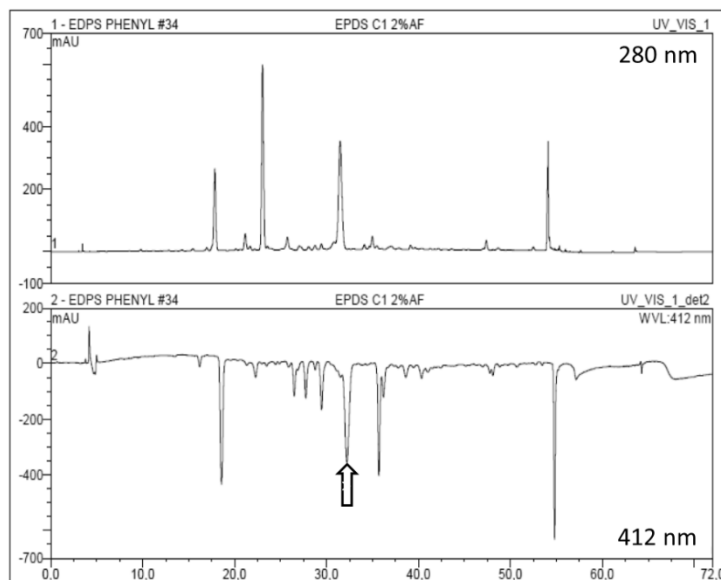
1. Phase mobile : A : H<sub>2</sub>O/acide formique (99/1) ; B : ACN



T (min)	D (mL/min)	% B
0	1	3
40	1	28
42	1	100
52	1	100
54	1	3
64	1	3

Figure 4-23 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18-PFP (1 % acide formique) - (EPDS cerise)

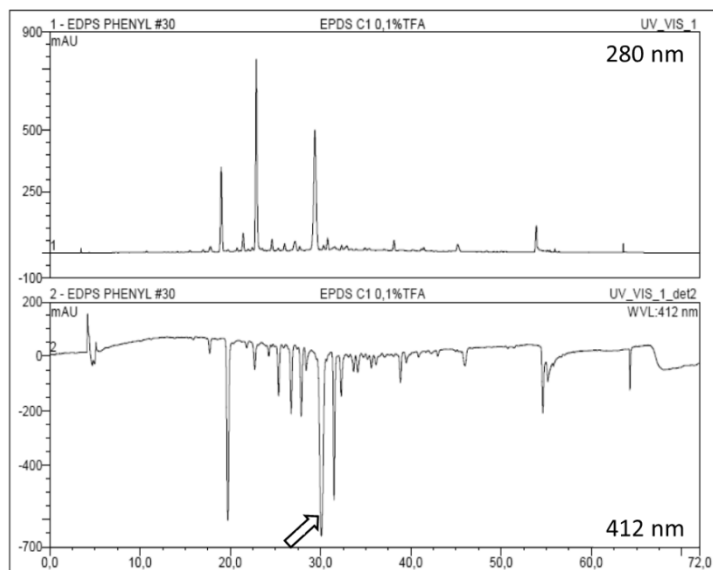
2. Phase mobile : A : H<sub>2</sub>O/acide formique (98/2) ; B : ACN



T (min)	D (mL/min)	% B
0	1	8
15	1	8
50	1	30
55	1	100
60	1	100
62	1	8
72	1	8

Figure 4-24 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18-PFP – (2% acide formique) - (EPDS cerise)

3. Phase mobile : A : H<sub>2</sub>O/acide trifluoroacétique (99,9/0,1)B : ACN



T (min)	D (mL/min)	% B
0	1	3
40	1	28
42	1	100
52	1	100
54	1	3
64	1	3

**Figure 4-25 : Profil chromatographique HPLC-AOx – phase C18-PFP (0,1 % acide trifluoroacétique) - (EPDS cerise)**

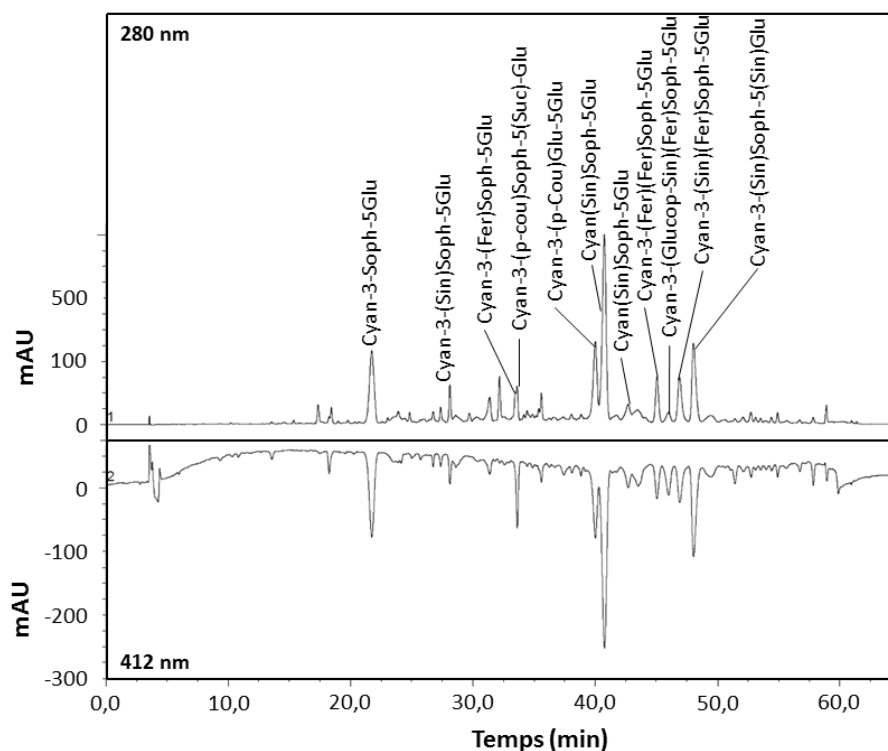
Les 3 phases stationnaires testées (C18, phényl et C18-PFP), ont toutes démontrées une bonne capacité de rétention vis-à-vis des analytes contenus dans l'EPDS de la cerise qui nous a servi de modèle pour la mise au point de la méthode analytique (Figures 4-20 ; 4-21 ; 4-22). Les profils chromatographiques ainsi obtenus au moyen des phases C18-PFP et phényl présentaient des similitudes en termes d'ordre d'élution des pics. La phase C18 classique démontrait un ordre d'élution différent, avec un pic à fort pouvoir anti-oxydant dont l'élution est très étendue (sur plusieurs minutes). Cet effet semble significativement réduit sur les deux autres phases. De plus, la phase C18-PFP semble permettre une meilleure résolution chromatographique. Celle-ci a donc fait l'objet d'essais supplémentaires par modification de la phase mobile par l'acidification.

L'augmentation du pourcentage à 1 % en acide formique dans la phase mobile a permis d'affiner significativement ce pic majoritaire très mal résolu lors des essais précédents (Figure 4-23). A 2 % d'acide formique, la résolution des pics semble être encore améliorée, mais au détriment de la finesse des pics (Figure 4-24). Le remplacement de l'agent acidifiant par l'acide trifluoroacétique a enfin permis l'obtention d'une séparation suffisamment résolutive (Figure 4-25). Cette méthode a donc été sélectionnée pour l'application à l'ensemble des EPDS étudiés après une dernière modification mineure du gradient de solvants.

#### 4.4.1.3.1.2 Analyse de composés anti-oxydants des EPDS des fruits et légumes

Les chromatogrammes présentés dans cette partie se décomposent en 2 parties : le profil supérieur est obtenu par mesure de l'absorbance à 280 nm. Les polyphénols sont généralement majoritaires dans ce type d'extraits, et sachant qu'un grand nombre d'entre eux absorbent la lumière UV à 280 nm, cette longueur d'onde a été choisie pour illustrer les profils chromatographiques des EPDS des fruits et légumes. Le profil inférieur est obtenu par la mesure de l'absorbance à 412 nm après réaction post-colonne mettant en évidence la capacité anti-radicalaire. Les concertations des différents extraits analysés par la méthode HPLC-AOx ne sont pas les mêmes. En effet, il a fallu ajuster les concertations pour chaque échantillon afin de la situer dans un intervalle ne résultant pas en une décoloration complète du réactif ABTS<sup>•+</sup>, tout en permettant la détection du plus grand nombre de molécules actives. Ainsi, les chromatogrammes présentés dans cette partie ne sont pas directement comparables.

L'analyse par HPLC-AOx de l'EPDS de chou rouge démontre une composition très riche en molécules dotées de capacités anti-radicalaires. Le profil à 280 nm et le profil post-réactionnel à 412 nm de cet extrait présentent un certain degré de symétrie (Figure 4-26). Ceci suggère que la grande majorité des molécules détectées à 280 nm sont dotés de capacités anti-radicalaires. Jusqu'à 15 composés différents ont été détectés comme anti-oxydants, c'est-à-dire dont la capacité anti-oxydante est quantifiable par cette technique. De nombreux pics négatifs supplémentaires de faible intensité, témoignent encore d'une grande diversité de la nature des composés actifs dans le chou rouge. Toutefois, ceux-ci ont été ignorés étant donné leur implication réduite de l'activité anti-oxydante totale.



**Figure 4-26 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de chou rouge**

Quatre pics, aux temps de rétention  $T_r = 21,73$  ;  $40,01$  ;  $40,75$  et  $48,03$  min présentent respectivement des capacités anti-radicalaires de  $30,41 \pm 0,40$  ;  $19,97 \pm 0,71$  ;  $58,04 \pm 1,77$  et  $26,40 \pm 2,46$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$  (Tableau 4-4). Ensemble, ces composés partagent plus de 67 % du potentiel anti-oxydant global de l'EPDS de chou rouge. Ces quatre molécules, tout comme 7 autres, ont été identifiées comme des dérivés cyanidiques de par leur spectre UV-visible associé à un fragment commun obtenu par spectrométrie de masse  $MS^2$  en mode positif à  $[M-X]^+$   $m/z$  287, ion caractéristique de cette structure. Il s'agit donc de molécules d'une base commune qui se différencient par leurs glycosylations et acylations suggérés par leurs schémas de fragmentation. Le premier pic ( $T_r = 21,73$ ), a été identifié en tant que cyanidine-3-sophoroside-5-glucoside, de par 3 pertes successives de 162 Da, correspondant à des glucoses :  $[M]^+$   $m/z$  773  $\rightarrow$   $[M-Glc]^+$   $m/z$  611;  $[M-2Glc]^+$   $m/z$  449 ;  $[M-3Glc]^+$   $m/z$  287. Le composé majoritaire en termes de capacités anti-radicalaires ( $T_r = 40,75$  min), a été identifié comme étant un isomère de cyanidine-sinapoyl-sophoroside-glucoside. En effet, son spectre de masse révèle un ion moléculaire à  $[M]^+$   $m/z$  979, ainsi que des fragments suggérant la perte successive de 2 glucoses (-162 Da) et d'un sinapoyl-glucoside (-368 Da) (Figure 4-27). Cependant, la position exacte des acylations et glycosylations n'a pas pu être vérifiée par spectrométrie de masse. Il ne s'agit donc que de structures hypothétiques s'appuyant

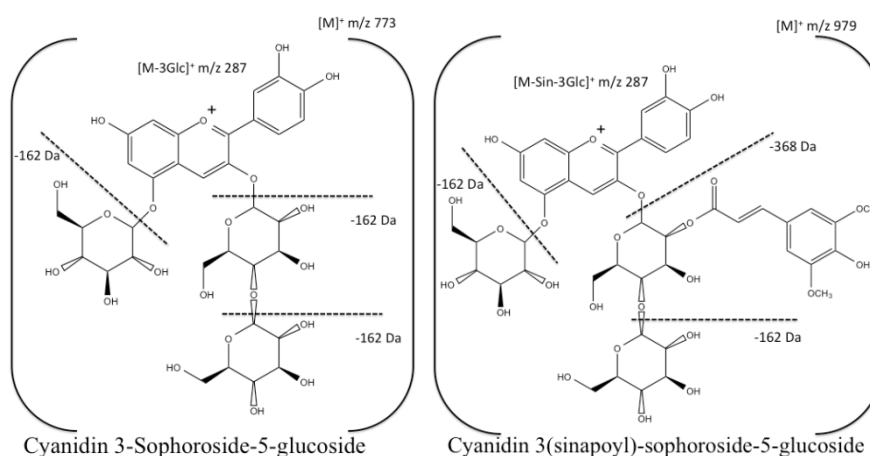
notamment sur des structures chimiques et des spectres de masse décrits dans la littérature (Arapitsas, Sjöberg et Turner, 2008).

Cette composition hautement variée en molécules actives fait de cet extrait un candidat intéressant en termes de prévention vis-à-vis du stress oxydant. En effet, l'activité anti-radicalaire totale, obtenue par addition des valeurs d'équivalence trolox mesurées pour les principales molécules actives, est de  $200,30 \pm 10,77$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ .

**Tableau 4-4 : Composés anti-oxydants du chou rouge**

Tr (min)	( $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ ) $\pm$ SD	% total AOx	$\lambda_{\text{max}}$	[M] <sup>+</sup> m/z	MS <sup>2</sup> (+)	ID	ref
18,32	3,38 $\pm$ 0,48	2	325	-	-	-	-
21,73	30,41 $\pm$ 0,40	15	278/513	773	[773]→611/ 449/287	Cyan-3-Soph-5-Glu	(Arapitsas, Sjöberg et Turner, 2008)
28,12	4,87 $\pm$ 0,10	2	281/335/528	979	[979]→817/449/287	Cyan-(Sin)Soph-Glu	"
31,50	3,71 $\pm$ 0,12	2	281/528	-	-	-	-
33,47	10,38 * $\pm$ 0,16	5	328	949	[949]→787/449/287	Cyan-3-(Fer)Soph-5-Glu	(Arapitsas, Sjöberg et Turner, 2008)
33,63			330	1019	[1019]→287	Cyan-3-(p-Cou)Soph-5(Suc)-Glu	"
40,01	19,97 $\pm$ 0,71	10	281/313/522	919	[919]→757/449/287	Cyan-3-(p-Cou)Glu-5-Glu	"
40,75	58,04 $\pm$ 1,77	29	281/329/522	979	[979]→817/449/287	Cyan-(Sin)Soph-Glu	"
42,69	6,44 $\pm$ 0,62	3	281/329/525	979	[979]→287	Cyan-(Sin)Soph-Glu	"
45,06	9,79 $\pm$ 1,81	5	296/320/535	1125	[1125]→1125/963/449/287	Cyan-3-(Fer)(Fer)Soph-5-Glu	"
45,99	9,46 $\pm$ 0,19	5	299/331/535	1317	[1317]→1171 / 949 / 771	Cyan-3-(Glucop-Sin)(Fer)Soph-5-Glu	"
46,89	10,85 $\pm$ 1,19	5	295/330/534	1155	[1155]→993/449/287	Cyan-3-(Sin)(Fer)Soph-5-Glu	"
48,03	26,40 $\pm$ 2,46	13	299/332/535	1185	[1185]→287	Cyan-3-(Sin)Soph-5-(Sin)Glu	"
51,39	3,33 $\pm$ 0,85	2	330/550	-	-	-	-
57,89	3,28 $\pm$ 0,03	2	239/327	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>200,30 <math>\pm</math> 10,77</b>						

(\*pics négatifs non résolus ; Cyan : cyanidine ; Soph : Sophorose ; Glu : Glucoside ; Fer : Férulique ; Sin : Sinapoyl ; Cou : Coumaroyl ; Suc : Succinoyl)



**Figure 4-27 : Exemple de schéma de fragmentation des anti-oxydants polyphénoliques du chou rouge**

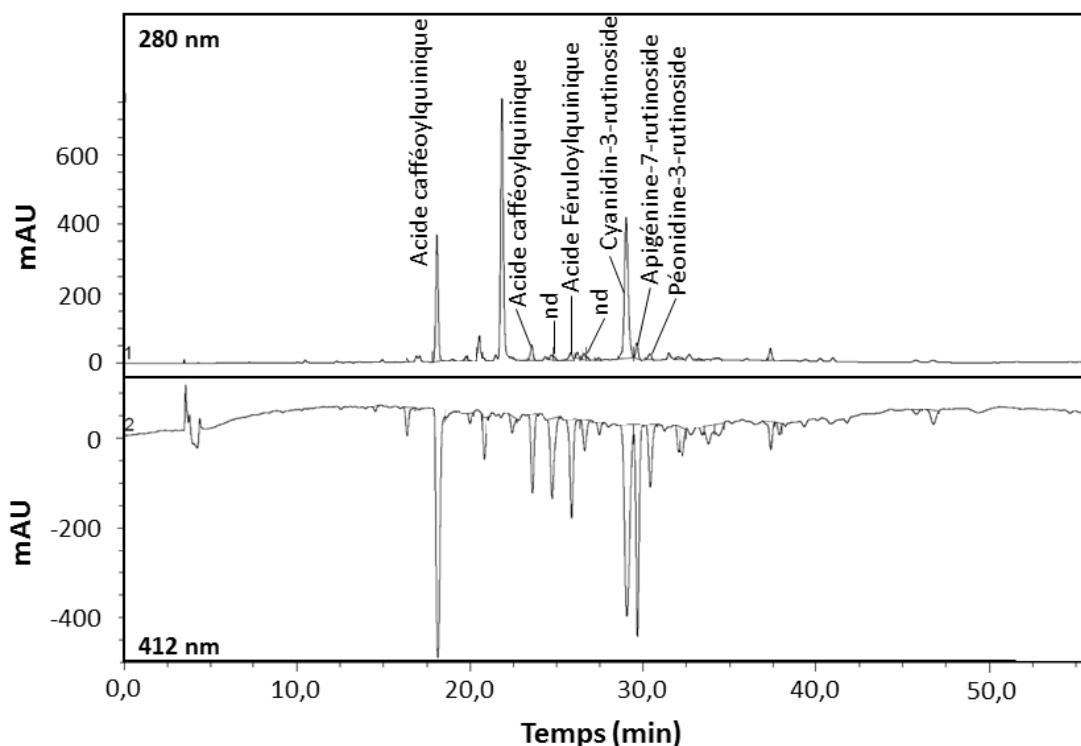
L'analyse HPLC-AOx de la cerise (var. Regina) démontre également une diversité de molécules anti-radicalaires (Figure 4-28). Parmi les pics positifs détectés à 280 nm, 13 possèdent des pics négatifs correspondants quantifiables. Trois molécules actives majoritaires se distinguent (Tr = 18,26 ; 29,04 et 29,67 min), totalisant ensemble plus de 60 % de l'activité piégeuse de radicaux libres de cet échantillon, avec respectivement  $57,67 \pm 0,48$  ;  $60,37 \pm 0,67$  et  $40,33 \pm 0,13$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$  (Tableau 4-5). Les analyses en spectrométrie de masse suggèrent qu'il s'agit premièrement d'un acide caféoylquinique, de par un ion moléculaire de  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z 355, et une fragmentation donnant des ions à  $[\text{M}+\text{H}-192]^+$  m/z 163 ;  $[\text{M}+\text{H}-210]^+$  m/z 145 et  $[\text{M}+\text{H}-220]^+$  m/z 135, caractéristiques d'une telle structure. Les 2 composés suivants correspondent vraisemblablement à la cyanidine-3-rutinoside (une anthocyane) et l'apigénine-7-rutinoside (une flavone), de par leurs ions moléculaires respectifs de  $[\text{M}]^+$  m/z 595 et  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z 579 perdant chacun successivement un rhamnose (-146 Da) et un glucose (-162 Da) suite à leur fragmentation par collision avec l'argon, donnant les ions correspondant à la cyanidine  $[\text{M}]^+$  m/z 287 et l'apigénine  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z 271.

Par ailleurs, un troisième dérivé cyanidique, la péonidine-3-rutinoside ( $[\text{M}]^+$  m/z 609) participe également au potentiel anti-oxydant total de l'EPDS de cerise avec  $13,68 \pm 0,06$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ . Ce composé, tout comme l'apigénine-3-rutinoside, n'est révélé par absorbance UV à 280 nm que par un pic de faible intensité. Or, leurs importants pics négatifs démontrent leurs capacités anti-radicalaires considérables révélant leur réelle importance dans cet extrait. Ces molécules auraient donc pu être ignorées par simple analyse HPLC-UV classique. On peut noter encore que le pic le plus intense à 280 nm élué à 21,8 min ne participe nullement au potentiel anti-oxydant de cet extrait. Celui-ci a donc été ignoré, alors qu'il aurait été pris en compte lors d'une analyse chromatographique classique.

Enfin, 2 autres pics correspondant à des acides phénoliques, un acide caféoylquinique (CQA) (Tr = 23,68 min) et un acide féruloylquinique (FQA) (Tr = 26,29 min), jouent également un rôle anti-oxydant au sein des molécules polaires de la cerise représentant respectivement 6 et 8 % de l'activité anti-radicalaire totale de l'extrait.

En résumé, le potentiel anti-oxydant important conféré par les molécules polaires de la cerise, est lié premièrement à la présence de 3 dérivés d'anthocyanes comptant pour 43 % de l'activité totale, et deuxièmement à la présence de 3 acides phénoliques comptant pour 36 %.





**Figure 4-28 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de cerise (var. Regina)**

**Tableau 4-5 : Composés anti-oxydants de la cerise (var. Regina)**

Tr (min)	( $\mu$ mole ET/g EPDS) $\pm$ SD	% total AOx	$\lambda_{max}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> (+)	ID	ref
16,41	4,91 $\pm$ 0,07	2	315	-	-	-	-	-
18,26	57,67 $\pm$ 0,48	22	325	355	353/707	[355] $\rightarrow$ 163/145/135	CQA	(Chaovanalikit et Wrolstad, 2004; Moraes et al., 2009)
20,73	6,79 $\pm$ 1,44	3	280	-	-	-	-	-
23,68	15,06 $\pm$ 0,65	6	326	355	353/707	[355] $\rightarrow$ 163/145/135	CQA	(Chaovanalikit et Wrolstad, 2004; Moraes et al., 2009)
25,88	18,85 $\pm$ 0,04	7	280	387	-	[387] $\rightarrow$ 225/207/309/149/151	nd	-
26,29	20,50 $\pm$ 0,23	8	308	369	-	[369] $\rightarrow$ 177/145/149	FQA	(Chaovanalikit et Wrolstad, 2004)
26,61	6,34 $\pm$ 0,21	2	343	-	-	-	nd	-
29,04	60,37 $\pm$ 0,67	23	281/518	595 [M] <sup>+</sup>	593[707/1187]	[595] $\rightarrow$ 449/287/433	Cyanidine-3-rutinoside	(Chaovanalikit, Thompson et Wrolstad, 2004)
29,67	40,33 $\pm$ 0,13	15	279	579	451	[579] $\rightarrow$ 433/271	Apigénine-7-rutinoside	(Ma et al., 2001)
30,41	13,68 $\pm$ 0,06	5	279	609	579/403	[609] $\rightarrow$ 436/301	Peonidine-3-rutinoside	(Chaovanalikit, Thompson et Wrolstad, 2004)
32,24	5,58 $\pm$ 0,35	2	-	-	-	-	nd	-
33,79	5,60 $\pm$ 0,80	2	-	-	-	-	-	-
37,42	5,62 $\pm$ 0,04	2	279	867	865	[867] $\rightarrow$ 577/271	nd	-
<b>Total</b>	<b>261,3 <math>\pm</math> 5,17</b>							

(CQA : Acide Cafféoylquinique ; FQA : Acide Féruloylquinique)

Le profil HPLC-AOx de la seconde variété de cerise étudiée (var. Folfer) est très similaire à celui décrit plus haut pour la variété Regina. En effet, de nombreux pics présentent les mêmes temps de rétention que ceux observés précédemment. Les mêmes hypothèses structurales chimiques ont donc été attribuées aux pics de cet extrait présentant des temps de rétention identiques. La capacité anti-oxydante totale de l'EPDS de la variété Folfer, évalué par la méthode d'addition des pics, est similaire à celle obtenue pour la variété Regina avec  $245,32 \pm 5,35$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ .

L'EPDS de l'oignon ne présente que 4 pics négatifs, témoin d'autant de molécules anti-oxydantes différentes (Figure 4-29). Parmi celles-ci, 3 sont détectées dans des proportions quantifiables. Il s'agit des pics élués à 29,68 ; 49,80 et 53,40 min avec des capacités anti-radicalaires respectives de  $4,71 \pm 0,04$  ;  $170,97 \pm 3,57$  et  $18,49 \pm 0,18$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$  (Tableau 4-6). Au sein de cet extrait, une seule molécule totalise ainsi plus de 88 % de l'activité totale. Les spectres de masse indiquent des structures de dérivés quercétiniques pour les 2 premiers pics. Il s'agit vraisemblablement respectivement de la quercétine-3,7-diglucoside [M-H]<sup>-</sup> m/z 625, MS<sup>2</sup>(-) m/z 463 et 301, et de la quercétine-3-glucoside [M-H]<sup>-</sup> m/z 463, MS<sup>2</sup>(-) m/z 301. Le dernier pic, élué à 53,40 min, produit un ion moléculaire en mode négatif de [M-H]<sup>-</sup> m/z 477, et se fragmente en donnant [M-162]<sup>-</sup> m/z 315 et [M-178]<sup>-</sup> m/z 299. Ces informations suggèrent une structure d'isorhamnétine-3-glucoside pour ce composé. Enfin, le pic le plus important détecté à 280 nm Tr = 31,73 min ne présente aucune correspondance dans le profil à 412 nm après réaction post-colonne. Toutefois, son spectre de masse et son schéma de fragmentation ([M-H]<sup>-</sup> m/z 625 ; MS<sup>2</sup>(-) m/z 463 et 301) sont identiques à celui de la quercétine-3-glucoside, composé détecté comme anti-radicalaire. Ces 2 composés diffèrent donc vraisemblablement par la position d'une de leurs glycosylations. Il est probable que dans le cas du composé détecté comme non anti-oxydant, le cycle B soit glycosylé, rendant cette molécule incapable de neutraliser les radicaux, ou en tout cas réduisant sa cinétique. La structure la plus plausible pour ce composé est ainsi la quercétine-3,4'-diglucoside (Figure 4-30). Cette hypothèse soutient donc toute l'importance du cycle B des composés phénoliques dans les mécanismes anti-radicalaires.

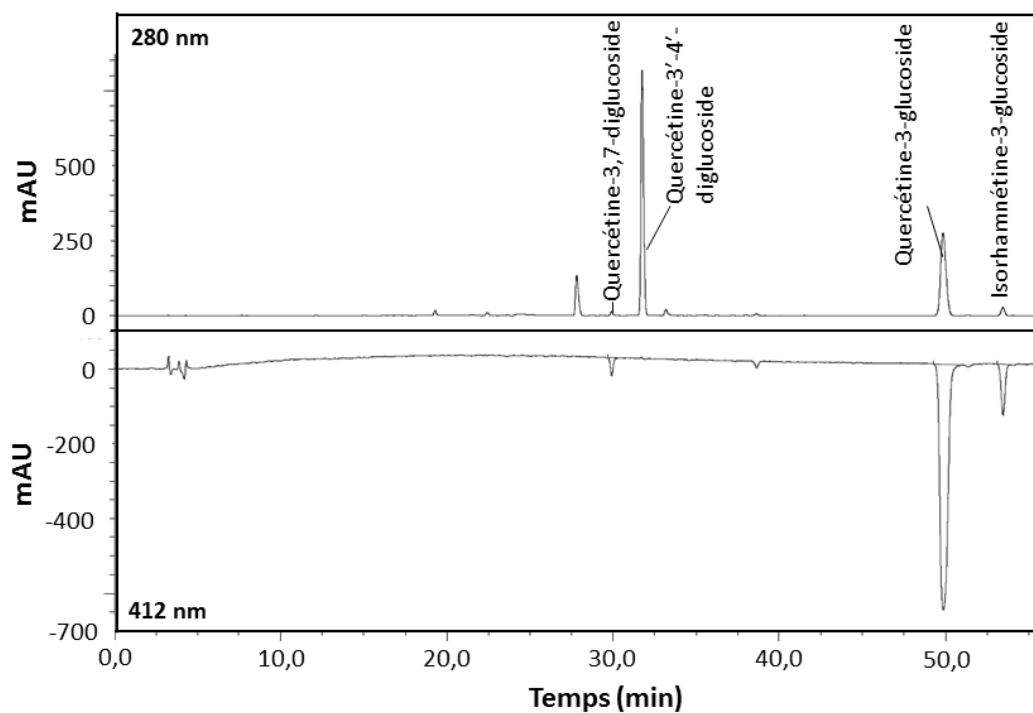
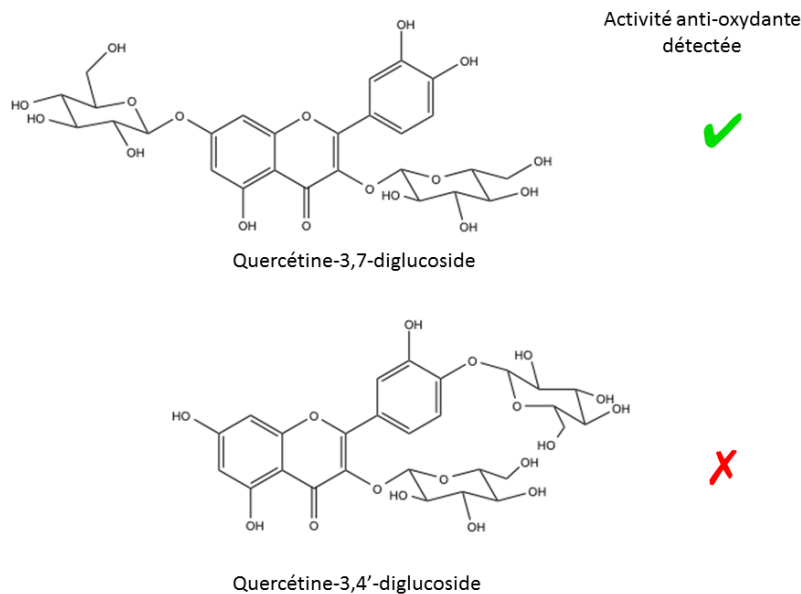


Figure 4-29 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucré d'oignon

Tableau 4-6 : Composés anti-oxydants de l'EPDS d'oignon

Tr (min)	( $\mu$ mole ET/g EPDS) $\pm$ SD	% total AOx	$\lambda_{max}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> (-)	ID	ref
29,68	4,71 $\pm$ 0,04	2	253/365		625	[625] $\rightarrow$ 625/463/301	Quercetine-3,7-diglucoside	(Andlauer, Martena et Fürst, 1999; Kramer et al., 2003)
31,73	nd $\pm$ nd	0	265/344	627/465/303	625 ; 739 [M-H+TFA]	[625] $\rightarrow$ 625/463/301	Quercetine-3,4-diglucoside	"
49,80	170,97 $\pm$ 3,57	88	253/365	465	463 [927]	[463] $\rightarrow$ 463/301/179/151	Quercetine-3-glucoside	"
53,40	18,49 $\pm$ 0,18	10	253/366	479	477	[477] $\rightarrow$ 315/299	Isorhamnétine-3-glucoside	"
<b>Total</b>	<b>194,17 <math>\pm</math> 3,79</b>							



**Figure 4-30 : Hypothèses structurales de deux polyphénols de l'oignon – et capacité anti-radicalaire**

Le coing contient 2 molécules principales conférant un important potentiel anti-oxydant à son extrait polaire désucre mis en évidence par son analyse par HPLC-AOx (Figure 4-31). Plusieurs autres pics négatifs révèlent la présence d'autres molécules chimiquement actives en tant que neutraliseurs d'espèces radicalaires. Cependant, leurs teneurs, ou leurs cinétiques réactionnelles rendent ces composés minoritaires lorsque l'on considère l'activité totale de l'extrait dans sa globalité. En effet, les pics élués à 18,32 et 24,09 min sont respectivement évalués à hauteur de  $86,76 \pm 2,97$  et  $85,22 \pm 2,76$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ , pour une capacité anti-oxydante totale de  $218,84 \pm 7,35$   $\mu\text{mole/g EPDS}$  (Tableau 4-7). Leur analyse par spectrométrie de masse démontre des ions majoritaires de  $[\text{M-H}]^-$   $m/z$  353 (ou  $[2\text{M-H}]^-$   $m/z$  707 pour le second composé) en mode négatif. Leur fragmentation donne naissance aux ions  $\text{MS}^2(-)$  typiques des acides chlorogéniques :  $m/z$  191 ; 179 et 135. Il s'agit donc de deux acides caféoylquiniques. Cependant, le pic élué à 18,32 min démontre également un ion  $[\text{M-H}]^-$  à  $m/z$  715, donnant par fragmentation notamment des ions  $\text{MS}^2$  à  $m/z$  553 et 391. Ces résultats peuvent indiquer la présence d'une structure de type acide dicaféoyl-disuccinoylquinique (Jaiswal et Kuhnert, 2011) et suggèrent ainsi la coélution d'un acide caféoylquinique et d'un acide dicaféoyl-disuccinoylquinique à 18,32 min. Toutefois, l'acide caféoylquinique semble largement majoritaire, étant donné l'importante proportion de l'ion moléculaire à  $m/z$  353 par rapport à celui à  $m/z$  715 (Figure 4-32). De plus, les données de la littérature décrivent les acides caféoylquiniques comme les principaux polyphénols du coing (Silva et al., 2002).

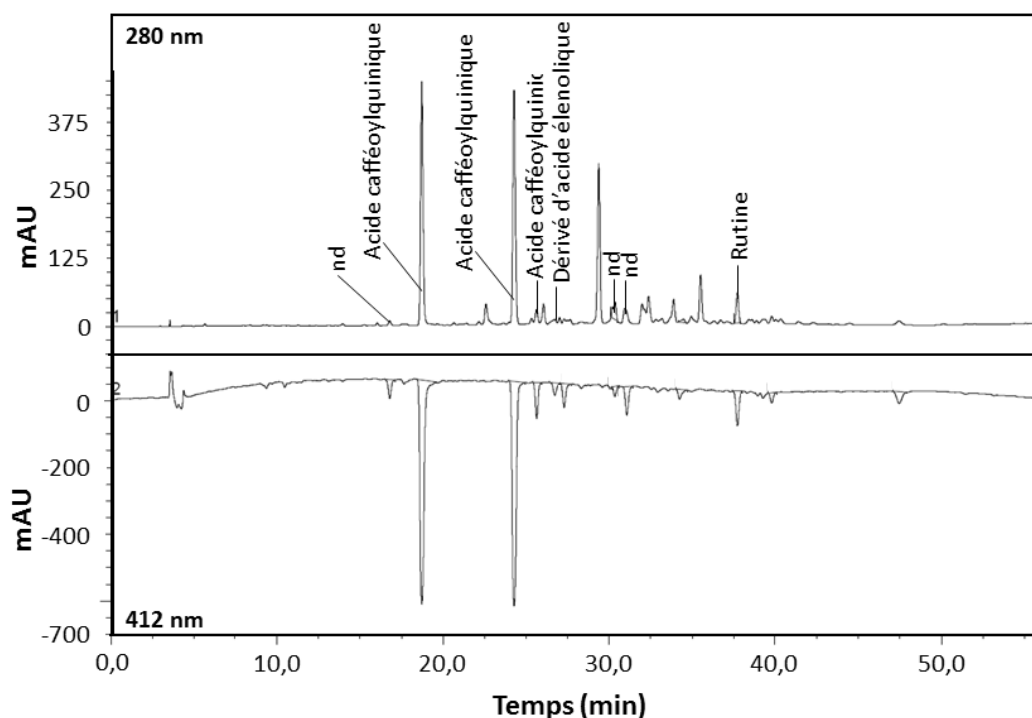
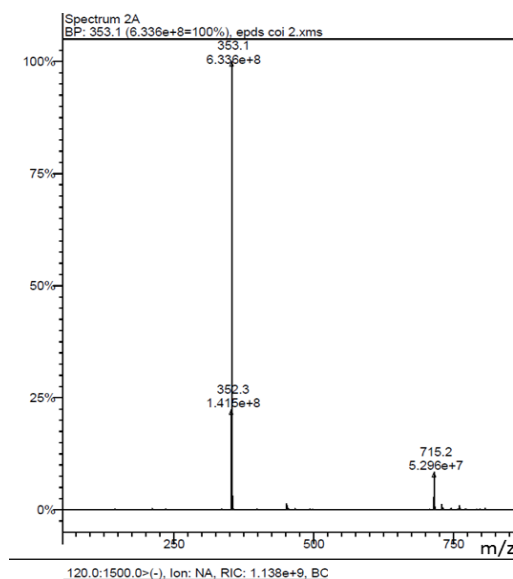


Figure 4-31 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de coing

Tableau 4-7 : Composés anti-oxydants de l'EPDS de coing

Tr (min)	( $\mu$ mole ET/g EPDS) $\pm$ SD	% total AOx	$\lambda_{max}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> (-)	ID	ref
16,41	5,44 $\pm$ 0,11	2	-	-	-	-	nd	-
18,32	86,76 $\pm$ 2,97	40	325	377	353 715	[353] $\rightarrow$ 353/191/179/135 [715] $\rightarrow$ 715/553/391/361/155	CQA DCdiSuccQA	(Chaovanalikit et Wrolstad, 2004; Moraes et al., 2009; Silva et al., 2002)
24,09	85,22 $\pm$ 2,76	39	326	731/551/377/355	353 707[2M-H] <sup>-</sup>	[353] $\rightarrow$ 353/191 ; [707] $\rightarrow$ 707/353/191	CQA	"
25,88	9,47 $\pm$ 0,11	4	325		353	[353] $\rightarrow$ 353/191/179/135	CQA	"
26,62	4,06 $\pm$ 0,16	2	275	517	565/539	[565] $\rightarrow$ 565/403/223/179/119	Dérivé d'acide énelique	(Eyles et al., 2007)
27,09	7,11 $\pm$ 0,11	3	322	559	581	[581] $\rightarrow$ 581/535/179	nd	-
30,41	2,76 $\pm$ 0,18	1	242/278	355	377/367	[377] $\rightarrow$ 377/331/161/119	nd	-
31,50	8,36 $\pm$ 0,32	4	326	369	391	[391] $\rightarrow$ 391/345/207/183/121	nd	-
37,91	9,66 $\pm$ 0,63	4	256/354	633/465/303	609	[609] $\rightarrow$ 609/301	Rutine	(Silva et al., 2002)
<b>Total</b>	<b>218,84 <math>\pm</math> 7,35</b>							

(DCdiSuccQA : Acide dicaféoyl-disuccinoylquinique ; CQA : Acide Caféoylquinique)



**Figure 4-32 : Spectre de masse du pic élué à 24,1 min (ESI mode (-) ; EPDS de coing)**

L'extrait polaire désucre de tomate renferme au moins 10 molécules anti-radicalaires d'après le profil HPLC-AOx obtenu (Figure 4-33). Un composé majeur se détache de ce profil à 17,63 min, représentant 42 % de la capacité anti-oxydante totale de l'extrait avec  $42,18 \pm 0,75$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$  (Tableau 4-8). Il s'agit d'un dérivé glucoside de l'acide coumarique, mis en évidence par un ion moléculaire de  $[\text{M-H}]^-$  m/z 325, perdant son glucoside après fragmentation par le gaz de collision générant un ion  $[\text{M-H-162}]^-$  m/z 163. Des adduits sont également observés comme deux acides coumarique-glucoside avec  $[\text{2M-H}]^-$  m/z 651, ou encore un adduit d'acide formique donnant  $[\text{M+acide formique-H}]^-$  m/z 371. Par ailleurs, deux composés identifiés comme des isomères de l'acide caféoylquinique, présentent respectivement une capacité anti-radicalaire de  $23,88 \pm 0,37$  et  $9,85 \pm 0,12$   $\mu\text{mole ET/g EPDS}$  (24 % et 10 % de l'activité anti-oxydante totale de l'extrait). Enfin, deux dérivés de l'acide caféique et deux dérivés quercétiniques participent encore au renforcement du caractère anti-oxydant de cet extrait de tomate.

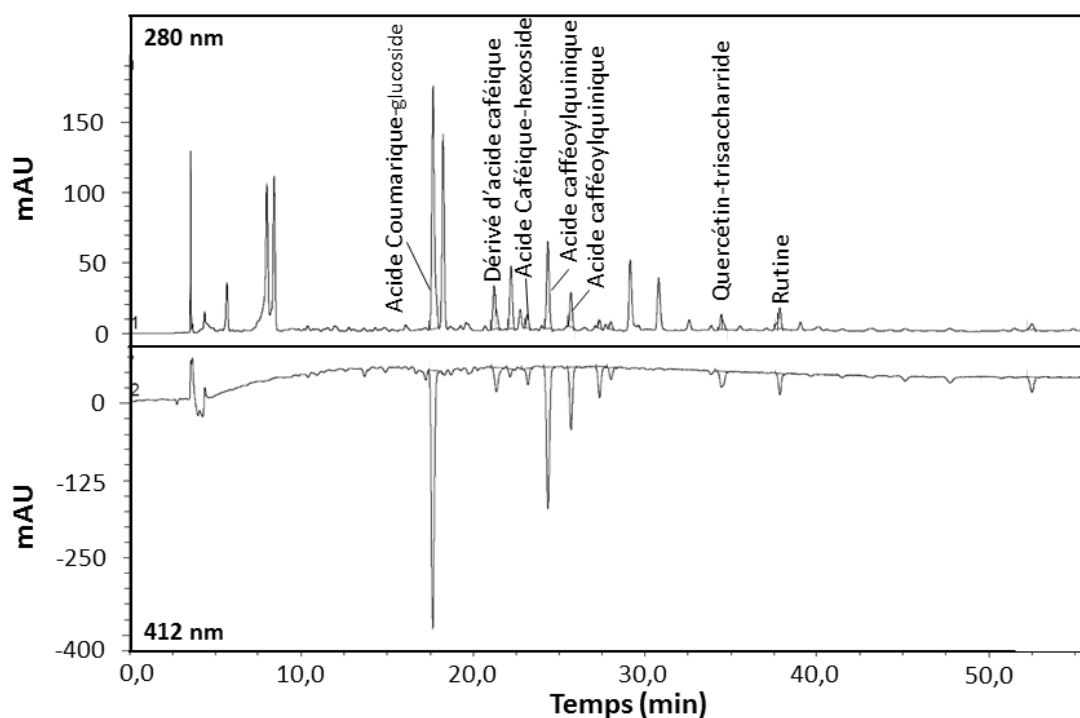


Figure 4-33 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de tomate

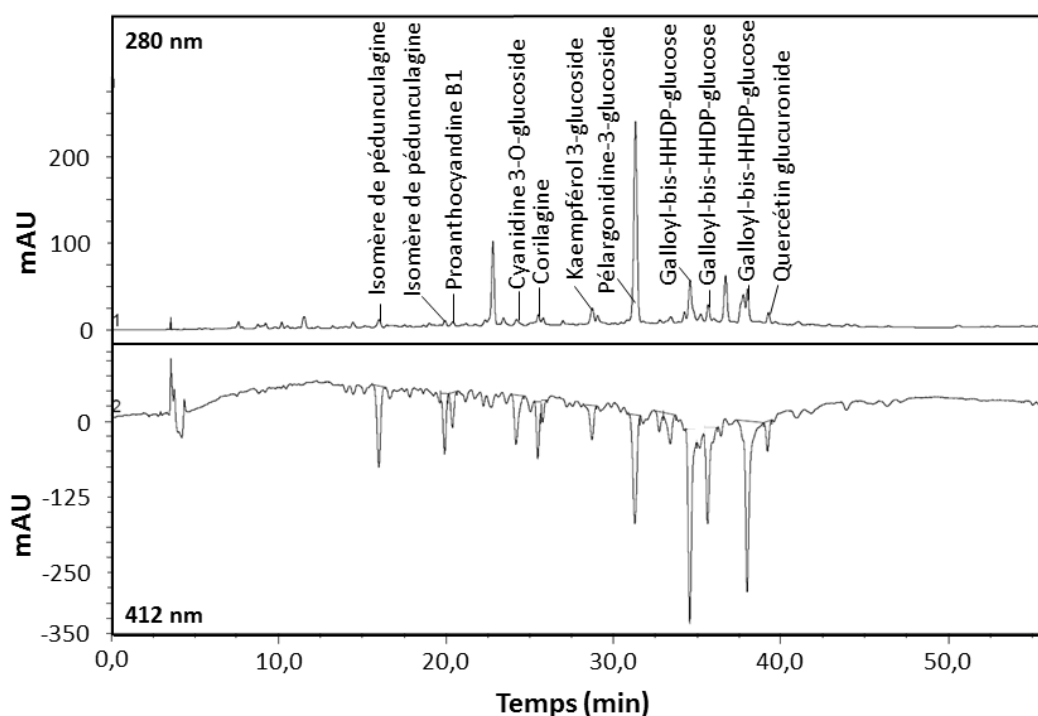
Tableau 4-8 : Composés anti-oxydants de l'EPDS de tomate

Tr (min)	( $\mu$ mole ET/g EPDS) $\pm$ SD	% total AOx	$\lambda$ .max	[M+H] <sup>+</sup> m/z	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS2 (-)	ID	ref
17,63	42,18 $\pm$ 0,75	42	295	349	371 ; 651	[371] $\rightarrow$ 371/325/163/119 ; [651] $\rightarrow$ 651/489/325/163/119	Acide coumarique-hexoside (adduit d'acide formique)	(Anttonen et Karjalainen, 2006)
21,33	5,44 $\pm$ 0,08	5	290/315	435	457	[457] $\rightarrow$ 457/411/248/161/101	Dérivé d'acide caféique	(Gouveia et Castilho, 2011)
22,49	1,47 $\pm$ 0,18	1	282	344 [707,0]	651/371	[371] $\rightarrow$ 371/325/209/163/119; [651] $\rightarrow$ 651/325/163/119	nd	
23,65	2,56 $\pm$ 0,23	3	314	365	341	[341] $\rightarrow$ 341/179/135	Acide caféique-hexoside	(Anttonen et Karjalainen, 2006; Vallverdú-Queralt et al., 2011)
24,09	23,88 $\pm$ 0,37	24	296/326	355	707/353	[353] $\rightarrow$ 353/191 ; [707] $\rightarrow$ 707/353/191	CQA	(Vallverdú-Queralt et al., 2011)
25,88	9,85 $\pm$ 0,12	10	296/326	763/547/355	707/353	[353] $\rightarrow$ 353/191/173/135 ; [707] $\rightarrow$ 707/353/179/173	CQA	(Vallverdú-Queralt et al., 2011)
27,09	4,99 $\pm$ 0,10	5	300/317	377	353	[353] $\rightarrow$ 353/191	nd	
34,42	4,01 $\pm$ 0,22	4	299/323	436	412/293		nd	
37,91	3,25 $\pm$ 0,15	3	257/353	743/611/465/303	741	[741] $\rightarrow$ 300	Quercétine-pentose-deoxyhexose-hexose	(Gouveia et Castilho, 2011)
52,76	3,23 $\pm$ 0,13	3	256/354	611/465/303	609	[609] $\rightarrow$ 609/301/187	Rutine	(Vallverdú-Queralt et al., 2011)
<b>Total</b>	<b>100,86 <math>\pm</math> 2,33</b>							

(CQA : Acide Caféoylquinique)

Les deux variétés de fraise possèdent des profils HPLC-AOx très similaires pour leurs EPDS, suggérant une composition chimique très proche (Figure 4-34). Les concentrations des molécules anti-oxydantes semblent toutefois plus importantes dans l'EPDS de la variété Florence, étant donné sa capacité anti-oxydante totale ( $212,87 \pm 11,35 \mu$ mole ET/g EPDS :

Tableau 4-9) plus de deux fois supérieure à celle de la variété Salsa ( $88,25 \pm 8,52 \mu\text{mole ET/g EPDS}$ ). Treize molécules présentes à des concentrations permettant une capacité anti-radicalaire significative sont observées dans l'extrait de la variété Florence. Parmi celles-ci, 3 composés rendent compte de 49 % de la capacité anti-radicalaire totale avec respectivement :  $41,15 \pm 0,86$  ;  $22,55 \pm 0,38$  et  $41,45 \pm 4,14 \mu\text{mole ET/g EPDS}$ . Ces 3 composés ont été identifiés comme des isomères de galloyl-bis-(hexahydroxydiphénol)-glucosides, de par un ion moléculaire de  $[M-H]^-$   $m/z$  935, et une fragmentation identique donnant les ions  $MS^2(-)$   $m/z$  633 et 301. Par ailleurs, deux anthocyanes élués à 24,09 (un dérivé cyanidinique) et 31,50 min (un dérivé pélargonidique) participent également au potentiel anti-oxydant avec  $12,51 \pm 0,18$  et  $26,24 \pm 0,65 \mu\text{mole ET/g EPDS}$ . Trois ellagitannins, à savoir deux isomères de la pédunculagine et la corilagine, combinent ensemble encore 18% de l'activité totale de l'extrait. Enfin, le kaempférol-glucoside et la quercétine-glucuronide, deux flavonols, démontrent encore de faibles capacités anti-oxydantes.



**Figure 4-34 : Chromatogramme HPLC-AOx de l'extrait polaire désucre de fraise (var. Florence)**



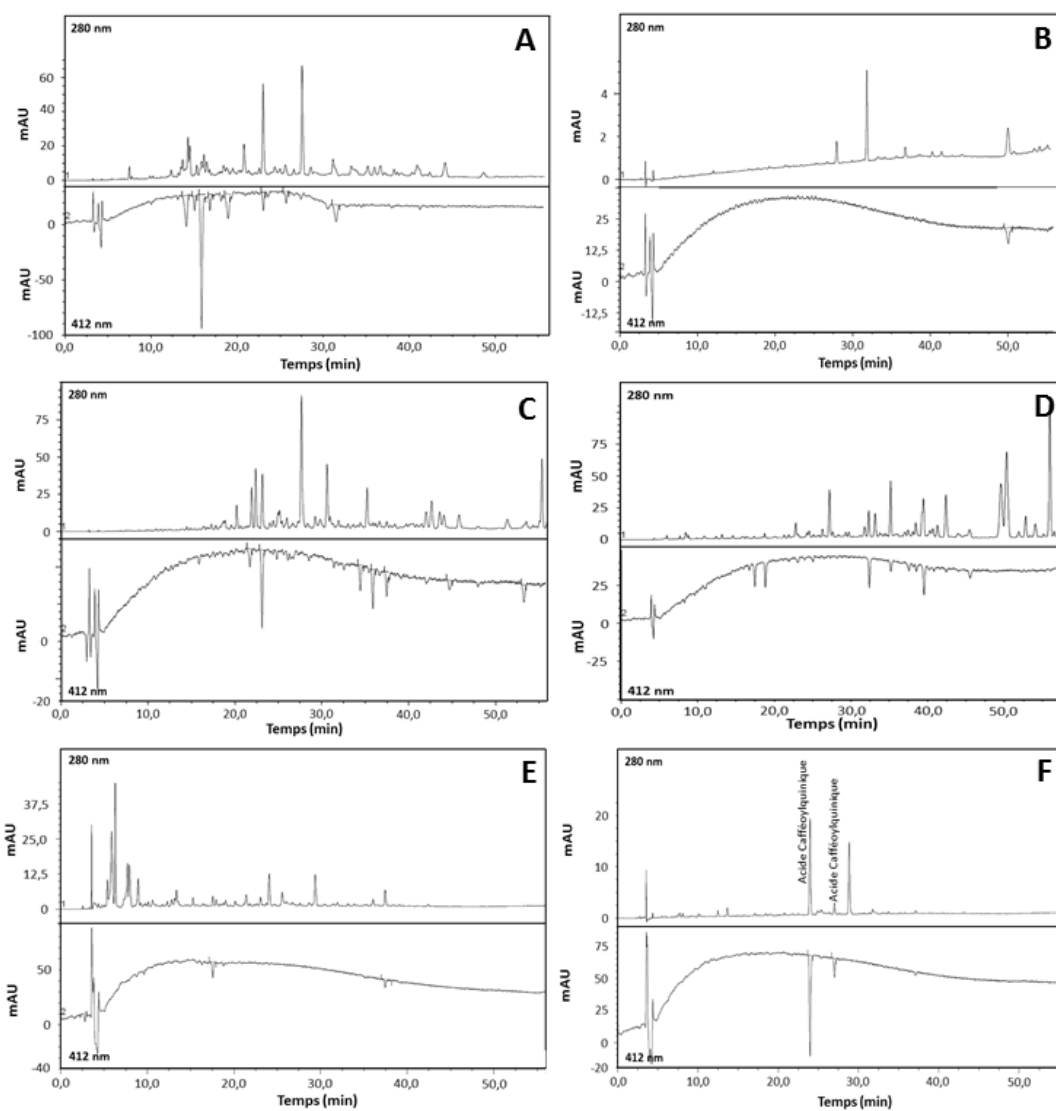
**Tableau 4-9 : Composés anti-oxydants de l'EPDS de fraise (var. Florence)**

Tr (min)	( $\mu$ mole ET/g EPDS) $\pm$ SD	% total AOx	$\lambda_{max}$	[M+H] <sup>+</sup> m/z	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> (-)	ID	ref
15,80	17,99 $\pm$ 0,35	8	229	802/767	783	[783] $\rightarrow$ 783 / 481 / 301 / 274	isomère de pedunculagine	(Hager et al., 2008)
20,07	11,80 $\pm$ 1,36	6	245		783	[783] $\rightarrow$ 783 / 481 / 301 / 249	isomère de pedunculagine	(Hager et al., 2008)
20,73	6,76 $\pm$ 0,33	3	200/279	579/433	577 [M-H+TFA] <sup>-</sup>	[577] $\rightarrow$ 577/425/287/289/407/451 [691] $\rightarrow$ 691/577/425/406/289/450/125	Procyanidine B1 (EC-4,8-C)	(Aaby, Ekeberg et Skrede, 2007)
24,09	12,51 $\pm$ 0,18	6	279		561 [M-H+TFA] <sup>-</sup>	[561] $\rightarrow$ 447/399[M-162+TFA] <sup>-</sup> /311/300/175	Cyan-3-O-glucoside	(Aaby, Ekeberg et Skrede, 2007; Buendía et al., 2010)
25,88	9,52 $\pm$ 0,10	4	275	465	633	[633] $\rightarrow$ 633/301/463/331/275	Corilagine	(He et Xia, 2008)
28,70	3,14 $\pm$ 0,18	1	280/515	449	561 [M-H+TFA] <sup>-</sup> [479 / 447]	[561] $\rightarrow$ 561/447/285	Kaempférol 3-glucoside	(Aaby, Ekeberg et Skrede, 2007)
30,41	6,98 $\pm$ 1,02	3	274	-	-	-	-	-
31,50	26,24 $\pm$ 0,65	12	278/501	433	545 [M-H+TFA] <sup>-</sup> [431 / 449]	[545] $\rightarrow$ 545/431/269/113	Pélargonidine 3-glucoside	(Aaby, Ekeberg et Skrede, 2007)
34,42	7,34 $\pm$ 1,69	3	275	-	-	-	-	-
35,10	41,15 $\pm$ 0,86	19	224/270		935/447	[935] $\rightarrow$ 935/633/301	Galloyl-bis-HHDP-glucose	(Aaby, Ekeberg et Skrede, 2007; Seeram et al., 2006)
37,91	22,55 $\pm$ 0,38	11	226/276		935	[935] $\rightarrow$ 935/633/301	Galloyl-bis-HHDP-glucose	(Aaby, Ekeberg et Skrede, 2007; Seeram et al., 2006)
38,78	41,45 $\pm$ 4,14	19	277		935	[935] $\rightarrow$ 935/633/301	Galloyl-bis-HHDP-glucose	(Aaby, Ekeberg et Skrede, 2007; Seeram et al., 2006)
39,25	5,44 $\pm$ 0,11	3	256/355	479	477	[477] $\rightarrow$ 477/301/255/175	Quercetine glucuronide	(Aaby, Ekeberg et Skrede, 2007; Seeram et al., 2006)
<b>Total</b>	<b>212,87 <math>\pm</math> 11,35</b>							

L'ensemble des EPDS du radis noir de la courgette, du céleri-rave, de l'épinard, de l'asperge et de la carotte ne démontrent que peu d'intérêt lorsqu'analysés par HPLC-AOx (Figure 4-35). En effet, ces échantillons rendent compte respectivement d'activités anti-oxydantes totales de  $29,21 \pm 1,19$  ;  $1,19 \pm 0,03$  ;  $6,91 \pm 0,36$  ;  $7,80 \pm 0,63$  ;  $1,50 \pm 0,19$  et  $7,22 \pm 0,13$   $\mu$ mole ET/g EPDS (Tableau 4-10 et 4-11). Les extraits de radis noir, de céleri-rave et d'épinard présentent toutefois plus 6 molécules actives, mais leurs teneurs sont très réduites. Enfin, l'EPDS de carotte ne présente que deux molécules participant à une activité anti-oxydante très réduite, et ont pu être identifiées comme deux isomères de l'acide caféoylquinique (Tableau 4-10).

**Tableau 4-10 : Composés anti-oxydants de l'EPDS de carotte**

Tr (min)	( $\mu$ mole TE/g EPDS) $\pm$ SD	% total AOx	$\lambda_{max}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> (-)	ID	ref
24,09	6,10 $\pm$ 0,05	84	326	355	353,0 707,0 [2M-H] <sup>-</sup>	[353] $\rightarrow$ 353 / 191	CQA	(Alasalvar et al., 2001)
27,09	1,12 $\pm$ 0,08	16	317	345	353	[353] $\rightarrow$ 353 / 191	CQA	(Alasalvar et al., 2001)
<b>Total</b>	<b>7,22 <math>\pm</math> 0,13</b>							



**Figure 4-35 : Chromatogrammes HPLC-AOx des extraits polaires désués du radis noir, de la courgette, du céleri-rave, de l'épinard et de l'asperge (A : radis noir ; B : courgette ; C : céleri-rave ; D : épinard ; E : asperge ; F : carotte)**

**Tableau 4-11 : Capacité anti-radicalaire des molécules présentes au sein des extraits polaires désués du radis noir, de la courgette, du céleri-rave, de l'épinard et de l'asperge**

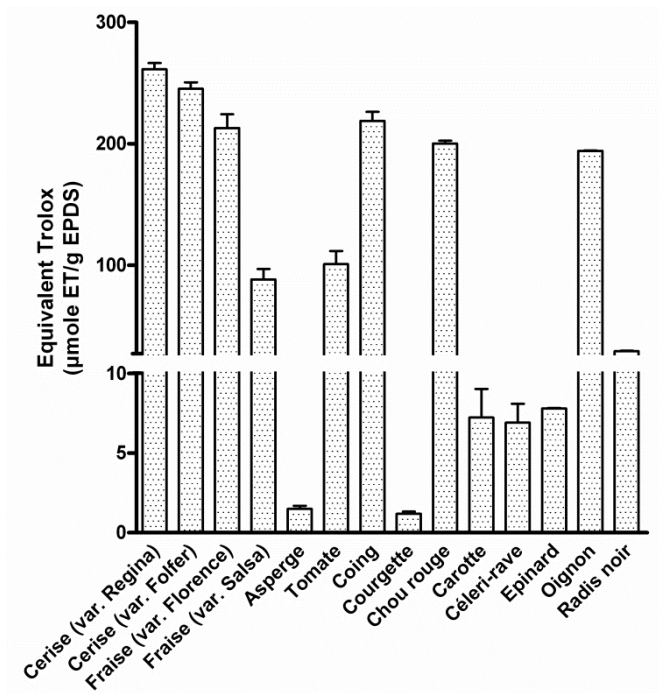
Radis noir		Courgette		Céleri-rave		Epinard		Asperge	
Tr (min)	( $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ ) $\pm$ SD	Tr (min)	( $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ ) $\pm$ SD	Tr (min)	( $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ ) $\pm$ SD	Tr (min)	( $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ ) $\pm$ SD	Tr (min)	( $\mu\text{mole ET/g EPDS}$ ) $\pm$ SD
14,56	<b>4,65</b> $\pm$ <b>0,10</b>	49,80	<b>1,19</b> $\pm$ <b>0,03</b>	21,90	<b>0,59</b> $\pm$ <b>0,05</b>	17,44	<b>1,36</b> $\pm$ <b>0,08</b>	18,32	<b>1,06</b> $\pm$ <b>0,11</b>
15,49	<b>1,29</b> $\pm$ <b>0,12</b>			23,65	<b>2,31</b> $\pm$ <b>0,03</b>	18,80	<b>1,47</b> $\pm$ <b>0,05</b>	37,42	<b>0,44</b> $\pm$ <b>0,08</b>
15,80	<b>13,32</b> $\pm$ <b>0,28</b>			34,42	<b>0,80</b> $\pm$ <b>0,01</b>	32,38	<b>1,81</b> $\pm$ <b>0,01</b>		
16,94	<b>1,39</b> $\pm$ <b>0,06</b>			35,88	<b>1,29</b> $\pm$ <b>0,08</b>	35,16	<b>0,68</b> $\pm$ <b>0,07</b>		
19,55	<b>3,46</b> $\pm$ <b>0,29</b>			37,42	<b>0,84</b> $\pm$ <b>0,09</b>	39,51	<b>2,02</b> $\pm$ <b>0,02</b>		
23,65	<b>1,50</b> $\pm$ <b>0,10</b>			44,63	<b>0,38</b> $\pm$ <b>0,07</b>	45,50	<b>0,46</b> $\pm$ <b>0,41</b>		
25,88	<b>1,09</b> $\pm$ <b>0,07</b>			53,40	<b>0,70</b> $\pm$ <b>0,04</b>				
31,50	<b>2,51</b> $\pm$ <b>0,18</b>								
<b>Total</b>	<b>29,21</b> $\pm$ <b>1,19</b>	<b>Total</b>	<b>1,19</b> $\pm$ <b>0,03</b>	<b>Total</b>	<b>6,91</b> $\pm$ <b>0,36</b>	<b>Total</b>	<b>7,80</b> $\pm$ <b>0,63</b>	<b>Total</b>	<b>1,50</b> $\pm$ <b>0,19</b>

Une forte corrélation est observée entre les résultats décrits précédemment (ORAC et TEAC) et ceux obtenus par HPLC-AOx (Figure 4-36), et ce malgré un écart très important entre les valeurs absolues de capacité anti-radicalaires exprimées en équivalent trolox obtenues lors de ces 2 types d'approches.

En tenant compte des rendements d'extraction (Figure 4-37) nous pouvons établir le classement suivant des fruits et légumes étudiés du plus au moins fort anti-oxydant :

**Chou rouge > Coing > Cerise (var. Regina) > Oignon > Cerise (var. Folfer) > Fraise (var. Florence) > Tomate > Radis noir > Fraise (var. Salsa) > Epinard > Céleri-rave > Carotte > Asperge > Courgette**

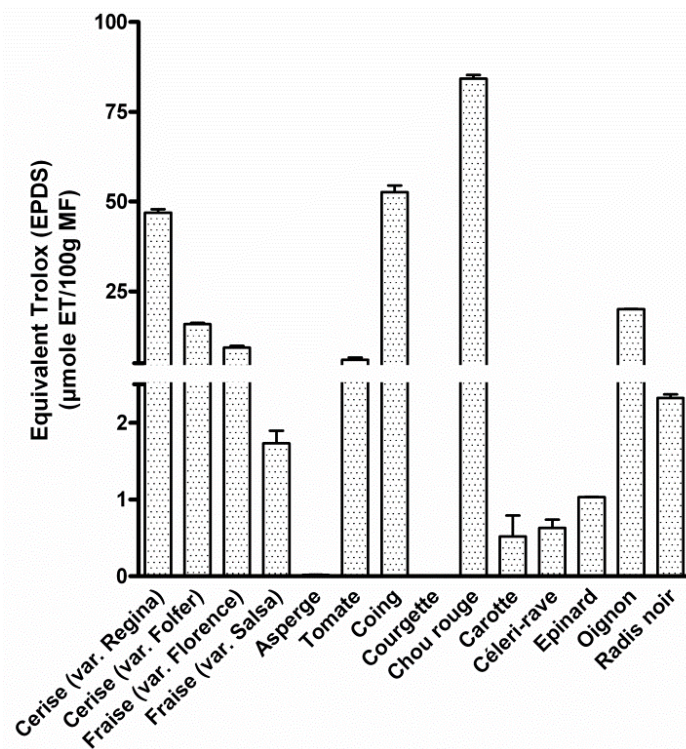
Ce classement est ainsi très similaire à celui établi précédemment grâce aux méthodes TEAC et ORAC.



**Figure 4-36 : Activité anti-oxydante totale des extraits polaires désuérés des fruits et légumes calculée par addition des activités individuelles des molécules évaluée par HPLC-AOx**

Corrélation HPLC-AOx vs TEAC :  $r = 0,897$  ( $p < 0,05$ )

Corrélation HPLC-AOx vs ORAC :  $r = 0,900$  ( $p < 0,05$ )

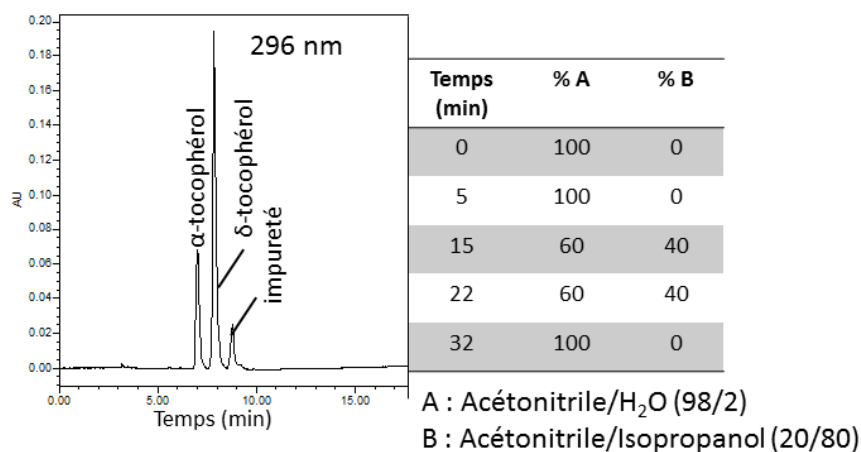


**Figure 4-37 : Activité anti-oxydante totale due aux extraits polaires désuérés pour une portion de 100 g de fruit ou de légume calculée par addition des activités individuelles des molécules évaluée par HPLC-AOx**

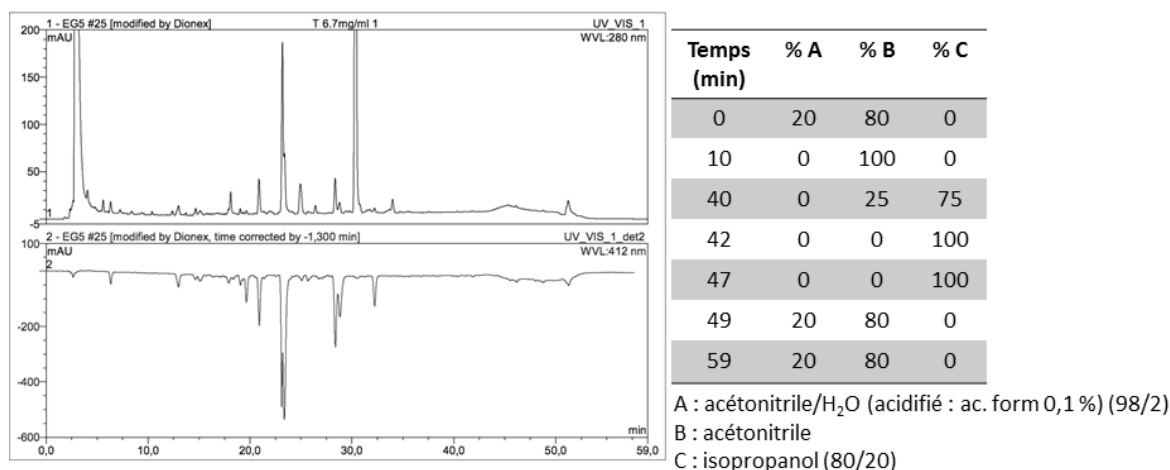
#### 4.4.1.3.2 Extraits gras (EG)

##### 4.4.1.3.2.1 Adaptation de la méthode HPLC-AOx aux EG

Plusieurs phases stationnaires ont été testées en vue de séparer les composés des EG des fruits et légumes. Une phase stationnaire Hypercarb (250 x 3 mm, 3 $\mu$ m, Thermo scientific), et une phase amine (NH<sub>2</sub>) n'ont pas permis de retenir suffisamment les analytes de ces EG (données non montrées). Une méthode analytique permettant la séparation de deux formes de tocophérols ( $\alpha$  et  $\delta$ ) (Figure 4-38) sur une phase stationnaire C18 (C18-EC-Nucelodur HTec ; 250 x 4,6 mm ; 3  $\mu$ m ; Macherey-Nagel), et une phase mobile composée d'acétonitrile, d'eau et d'isopropanol, a alors été adaptée pour l'étude des EG de fruits et légumes, utilisant l'EG de tomate comme référence. La meilleure résolution chromatographique a été obtenue dans les conditions analytiques présentées dans la figure 4-39. Cependant, la méthode chromatographique nécessitant l'isopropanol, un solvant organique très visqueux, les pressions générées dans la boucle de réaction étaient trop importantes. Celle-ci a donc été remplacée par une boucle de réaction d'un matériau plus résistant que le PTFE utilisé jusqu'à présent (TEFZEL). De plus, la boucle de réaction a été placée dans un four à colonne thermostatée à 50 °C, réduisant la viscosité du solvant, et ainsi les pressions générées.



**Figure 4-38 : Méthode séparative de deux tocophérols**



**Figure 4-39 : Profil chromatographique de l'EG de tomate (phase C18)**

#### 4.4.1.3.2.2 Analyse des composés anti-oxydants des extraits gras des fruits et légumes

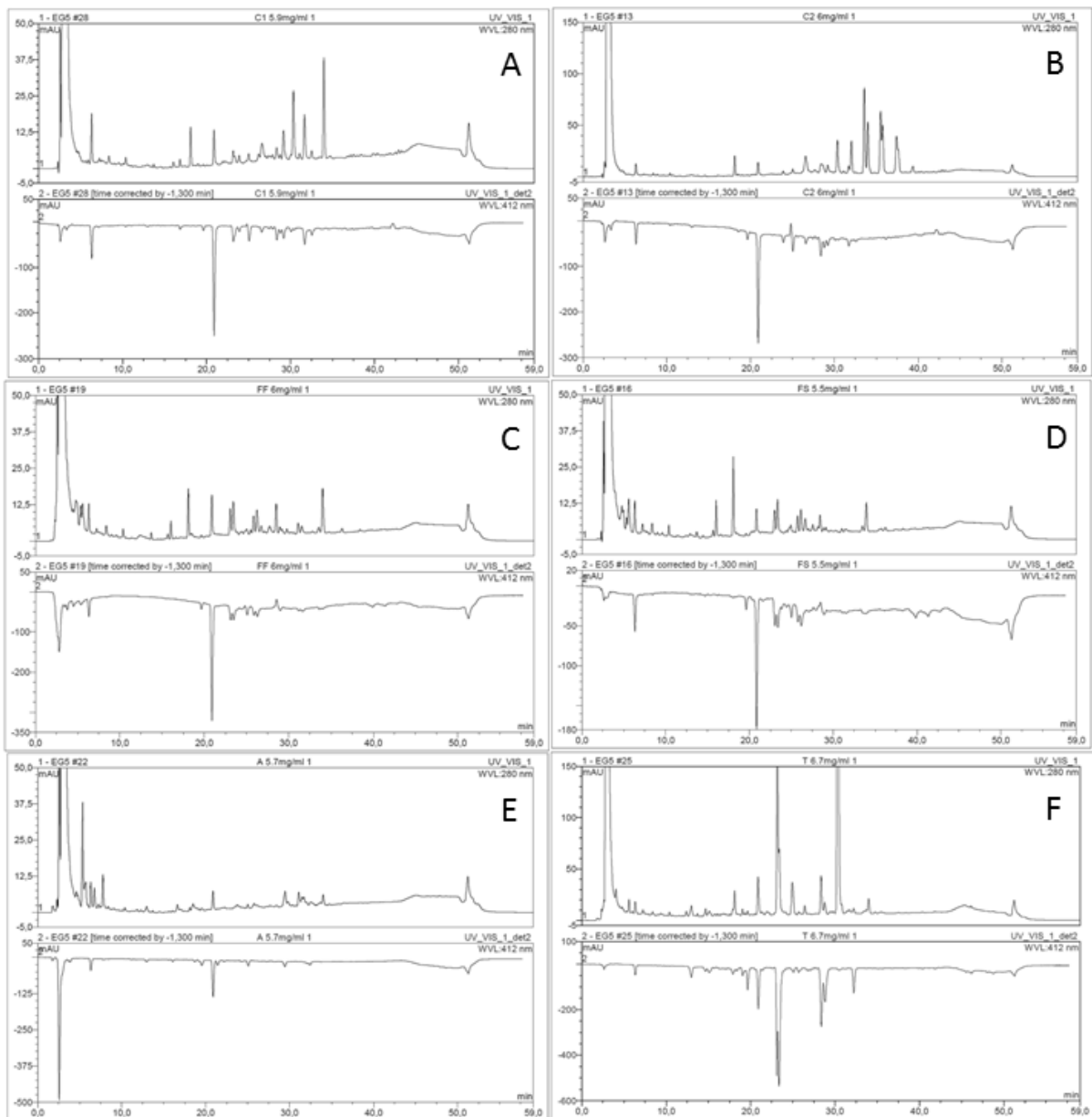
Par souci d'uniformité et parce qu'à 280 nm, le plus grand nombre de pics a été détecté, l'ensemble des profils chromatographiques positifs sont présentés à cette longueur d'onde. De plus, certains composés ne présentent aucune ou une absorbance très faible dans l'UV-visible. L'analyse HPLC-AOx des extraits gras démontre premièrement une composition très variée en molécules liposolubles dans les fruits et légumes étant donné la différence de leurs profils UV à 280 nm. Les profils anti-oxydants révélés à 412 nm sont également très différents d'un échantillon à l'autre (Figure 4-40 ; 4-41 ; 4-42). Toutefois, un pic négatif important élué à 20,9 min rendant compte d'une capacité anti-oxydante importante, est observé dans la plupart des EG étudiés (Tableau 4-12). La mesure de la capacité anti-oxydante de ce composé est comprise entre  $1,5 \pm 0,01$   $\mu$ mole ET/g EPDS dans le cas de l'oignon, et  $23,4 \pm 0,8$   $\mu$ mole ET/g EPDS dans le cas du coing. Il s'agit d'une forme de la vitamine E, identifiée comme étant l' $\alpha$ -tocophérol par comparaison de son spectre d'absorbance et son temps de rétention avec ceux d'un standard chimique.

Dans les EG de cerise ou de fraise, l' $\alpha$ -tocophérol ressort presque comme l'unique composé anti-oxydant. Dans d'autres échantillons, comme la tomate, un pic négatif largement majoritaire élué à 23,6 min présente une activité anti-oxydante équivalente à  $24,5 \pm 0,5$   $\mu$ mole ET/g EG. Ce composé a pu être identifié comme étant le lycopène par comparaison avec un standard commercial. Par ailleurs, l'extrait gras de coing démontre la plus grande diversité avec plus de 26 molécules anti-oxydantes. Parmi ces composés, la vitamine E est toutefois l'anti-oxydant majoritaire avec  $23,4 \pm 0,8$   $\mu$ mole ET/g EG, suivie par un composé non identifié, élué à 16,9 min avec  $23,1 \pm 0,3$   $\mu$ mole ET/g EG. L'extrait gras de carotte a également permis d'identifier au moins six molécules, en plus de la vitamine E, jouant un rôle

anti-radicalaire important avec  $12,9 \pm 0,2$  ;  $15,9 \pm 0,1$  ;  $12,9 \pm 0,2$  ;  $8,2 \pm 0,2$  ;  $11,2 \pm 0,1$  et  $9,8 \pm 0,1$   $\mu\text{mole ET/g EG}$ . Enfin, l'EG d'épinard présente un massif de plusieurs pics négatifs très importants (entre 22 et 28 min) dont les valeurs de capacité anti-oxydantes sont comprises entre  $9,3 \pm 1,4$  et  $66,4 \pm 6,8$   $\mu\text{mole ET/g EG}$ . Les structures moléculaires des composés anti-radicalaires des EG des fruits et légumes n'ont pas pu être déterminées car la quantité des composés collectés était faible tout comme leur degré de pureté.

L'épinard est donc composé d'EG ayant la capacité anti-oxydante totale la plus élevée :  $285,87 \pm 16,78$   $\mu\text{mole ET/g EG}$  (Figure 4-43). Les EG peuvent être classés dans l'ordre suivant : l'épinard ( $285,87 \pm 16,78$ ) ; le coing ( $117,03 \pm 4,29$ ) ; la carotte ( $95,97 \pm 2,02$ ) ; la tomate ( $75,53 \pm 1,72$ ), la courgette ( $57,66 \pm 0,95$ ) ; la fraise (var. Florence) ( $33,47 \pm 2,05$ ) ; l'asperge ( $32,36 \pm 0,41$ ) ; le radis noir ( $30,40 \pm 1,43$ ) ; le céleri-rave ( $24,45 \pm 0,53$ ) ; la cerise (var. Regina) ( $23,06 \pm 1,02$ ) ; le chou rouge ( $22,14 \pm 0,84$ ) ; la cerise (var. Folfer) ( $21,60 \pm 1,25$ ) ; la fraise (var. Salsa) ( $16,87 \pm 1,06$ ) et l'oignon ( $10,26 \pm 0,83$ ) (Figure 4-36).

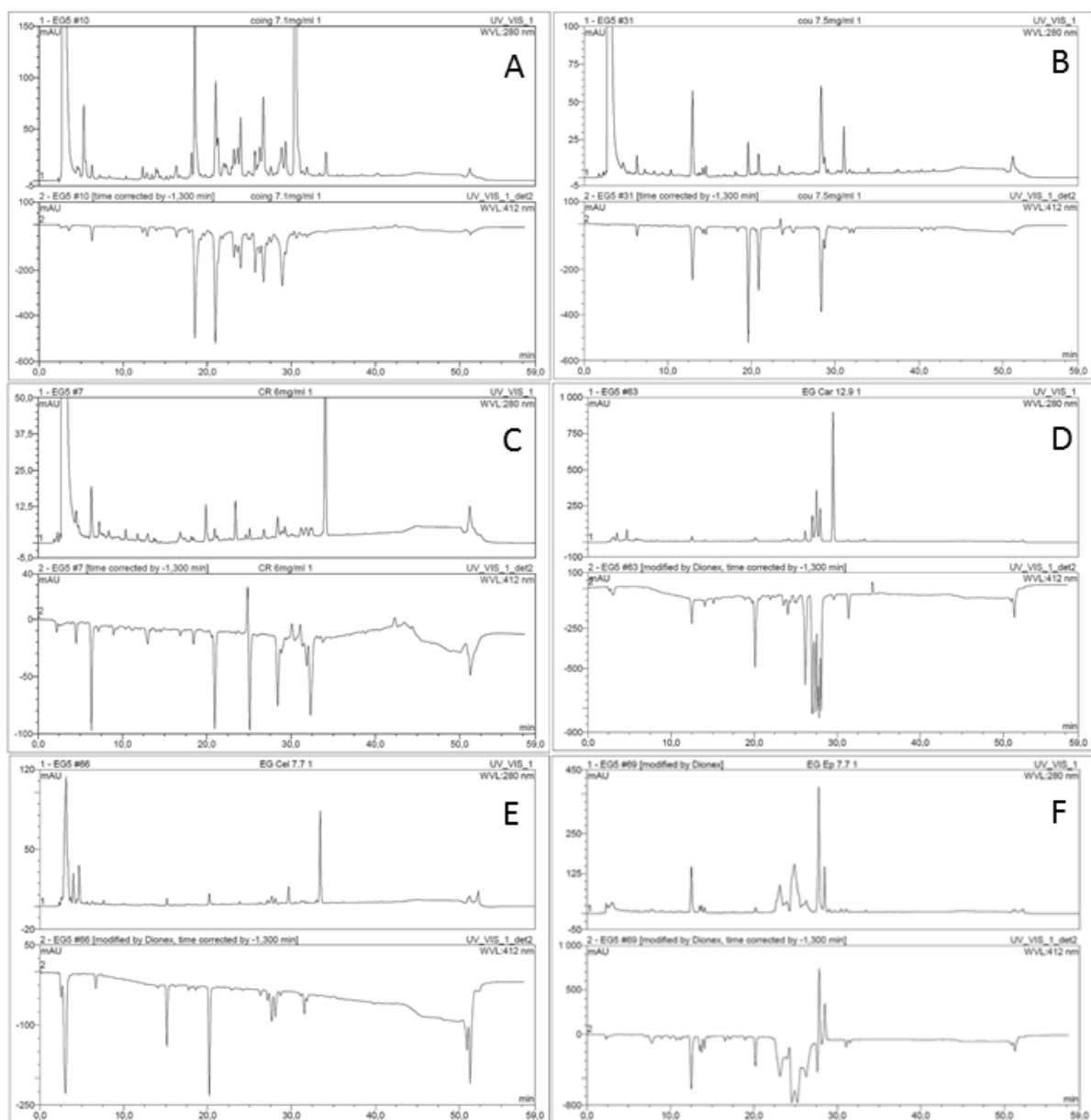
Cependant, si l'on considère une portion de 100 g de matière fraîche de fruit ou de légume, seul l'épinard présente un potentiel anti-oxydant intéressant de par son EG ( $73,90 \pm 4,34$   $\mu\text{mole ET/100 g MF}$ ) (Figure 4-44). La capacité anti-radicalaire due à l'EG des autres aliments est très inférieure (comprise entre  $0,26 \pm 0,02$  et  $11,58 \pm 0,24$   $\mu\text{mole ET/100 g MF}$ ).



**Figure 4-40 : Chromatogrammes HPLC-AOx des extraits gras de cerise (var Regina et Folfer), de fraise (var. Florence et Salsa), d'asperge et de tomate**

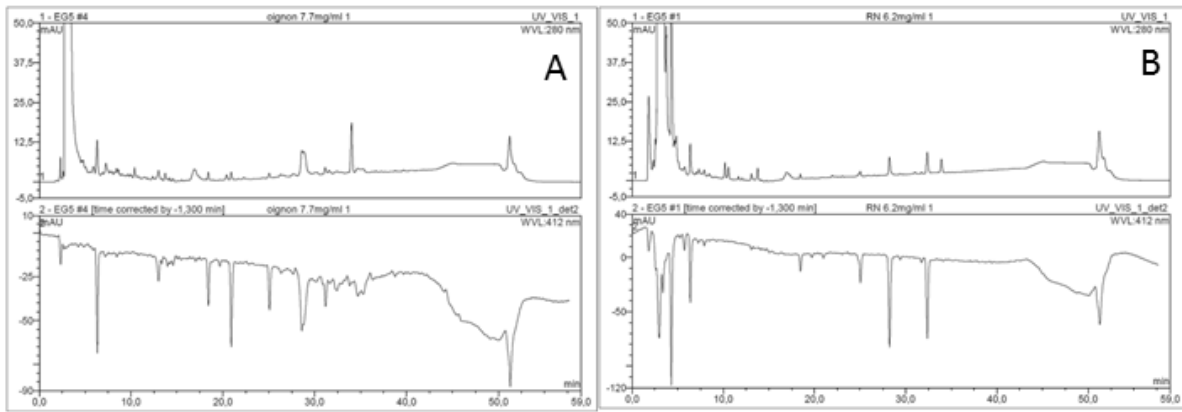
(A : cerise var. Regina ; B : cerise var. Folfer ; C : fraise var. Florence ; D : fraise var. Salsa ; E : asperge ; F : tomate)





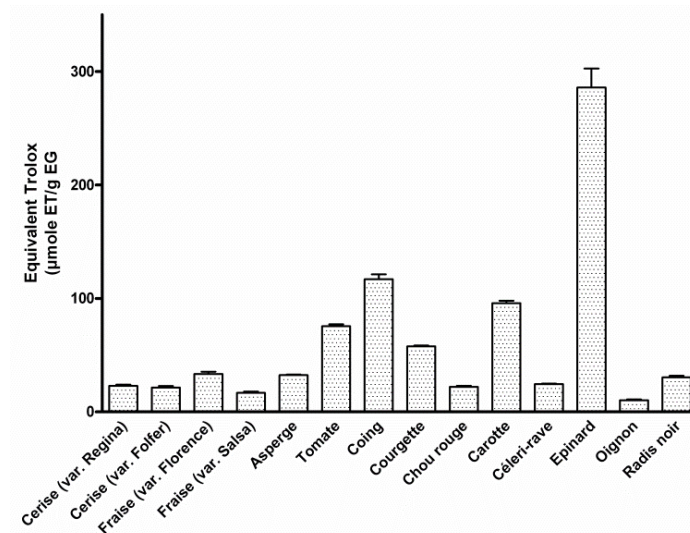
**Figure 4-41 : Chromatogrammes HPLC-AOx des extraits gras de coing, de courgette, de chou rouge, de carotte, de céleri-rave et d'épinard**

(A : coing ; B : courgette ; C : chou rouge ; D : carotte ; E : céleri-rave ; F : épinard)

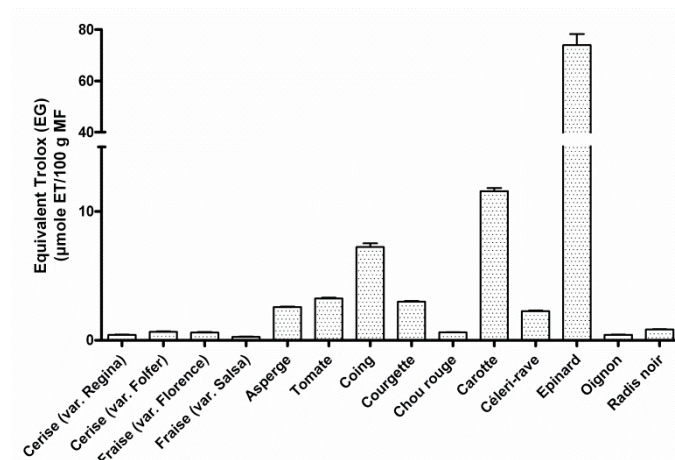


**Figure 4-42 : Chromatogrammes HPLC-AOx des extraits gras d'oignon et de radis noir**

(A : oignon ; B : radis noir)



**Figure 4-43 : Activité anti-oxydante totale des extraits gras des fruits et légumes (somme des pics chromatographiques)**



**Figure 4-44 : Activité anti-oxydante due aux extraits gras dans une portion de 100 g de fruits ou légumes (somme des pics chromatographiques)**

**Tableau 4-12 : Récapitulatif de la capacité anti-radicalaire mesurée des molécules présentes dans les extraits gras de fruits et légumes**

TE (µmole/g EG)	Cerise (Régina)		Cerise (Folifer)		Fraise (Florence)		Fraise (Salsa)		Asperge		Tomate		Coing		Courgette		Chou Rouge		Carotte		Celeri-rave		Epinards		Oignon		Radis noir					
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET				
1,82																																
2,70	1,62	0,15	2,59	0,13	13,83	0,96			22,58	0,12										1,33	0,06	1,47	0,12				1,04	0,01				
3,03																												1,67	0,07			
3,37			0,95	0,08									1,05	0,00				0,63	0,01								6,42	0,30				
4,49																												3,95	0,35			
5,74																												6,58	0,48			
7,83	2,75	0,02	1,71	0,08	1,70	0,18	1,74	0,07	1,50	0,03	1,33	0,01	0,37	0,03	1,31	0,15	3,51	0,18				0,74	0,05			1,61	0,12	2,16	0,05			
8,95																	0,43	0,09						5,05	0,07							
9,98																								0,81	0,00							
10,74																								1,22	0,09							
11,26																								1,92	0,05							
11,95																								1,31	0,04							
12,33																																
12,98																																
13,50																																
13,75																																
14,21																																
14,66																																
15,11																																
15,87																																
16,57																																
16,86	0,33	0,08																														
17,91																																
18,46																																
19,06																																
19,63	0,39	0,03	0,62	0,02	0,60	0,03	0,68	0,04	1,05	0,04	1,05	0,04	1,20	0,20	0,51	0,04	0,47	0,02														
20,12																																
20,91	9,91	0,05	9,38	0,19	11,34	0,21	6,89	0,05	5,00	0,01	5,99	0,02	23,44	0,78	8,22	0,03	3,61	0,07									1,46	0,01				
21,42																																
21,96																																
22,44																																
22,66																																
23,18																																
23,61	0,51	0,03																														
23,97			0,51	0,11																												
24,35																																
24,90	1,63	0,18	1,31	0,18	0,85	0,12	0,86	0,19	0,74	0,10																						
25,20																																
25,70																																
26,00																																
26,25																																
26,70	0,54	0,04	0,48	0,16																												
27,02																																
27,40																																
27,70																																
27,90																																
28,23	1,12	0,11	1,78	0,02																												
28,59	0,54	0,05	0,94	0,07																												
28,92	1,19	0,06	0,70	0,09																												
29,25																																
30,70																																
31,10																																
31,40	1,88	0,06	0,65	0,12																												
31,86																																
32,37	0,64	0,17																														
34,70																																
35,30																																
Total	23,06	1,02	21,60	1,25	33,47	2,05	16,87	1,06	32,36	0,41	75,53	1,72	117,03	4,29	57,66	0,95	22,14	0,84	95,97	2,02	24,45	0,53	285,87	16,78	10,26	0,83	30,40	1,43				

#### 4.4.1.4 Discussion

**Les profils des EPDS obtenus par HPLC-AOx sont représentatifs de l'ensemble de leur pouvoir anti-oxydant, justifiant l'intérêt de cette méthode dans l'étude de la capacité anti-oxydante des aliments au niveau moléculaire.** Les valeurs TEAC ou ORAC sont toutefois très largement supérieures aux valeurs d'activité anti-oxydante totale obtenues par la méthode d'addition des pics chromatographiques négatifs. Ce phénomène peut s'expliquer par d'éventuels effets de synergie possibles lors des méthodes globales, totalement absents dans le cas de l'analyse par HPLC-AOx. Une étude a par exemple démontré la possibilité d'effets anti-oxydants synergiques entre l'acide rosmarinique et la quercétine, et au contraire des effets antagonistes entre la catéchine et l'acide caféique (Peyrat-Maillard, Cuvelier et Berset, 2003). De plus, le milieu réactionnel des essais TEAC et ORAC réalisées en microplaques n'est pas le même que dans l'approche HPLC-AOx, pouvant ainsi influencer la vitesse des réactions anti-radicalaires. En effet, la méthode HPLC-AOx implique un mélange entre la phase mobile, composé d'eau acidifié et d'acétonitrile, et le réactif ABTS tamponné, alors que les méthodes en microplaques se déroulent dans le tampon seul. Les durées des réactions anti-radicalaires sont également limitées à 0,81 minutes de par le volume que représente la boucle de réaction et le débit. Or, les méthodes en microplaques autorisent les réactions sur une durée plus longue (respectivement TEAC et ORAC : 10 minutes et 2 h). Ces méthodes rendent ainsi également compte des réactions plus lentes. Par exemple, certains polyphénols, ayant réduit un premier radical, peuvent agir une seconde fois (Seyoum, Asres et El-Fiky, 2006), cependant par des réactions généralement plus lentes. Malgré ces aspects, nous avons observé une très forte corrélation entre les valeurs obtenues par HPLC-AOx et celles obtenues par ORAC ou par TEAC.

L'importante corrélation entre les résultats suggère toutefois que l'ensemble des molécules détectées par la HPLC-AOx et le dosage individuel de leur capacité anti-radicalaire est bien représentatif de l'échantillon dans sa globalité.

**A travers l'ensemble des techniques utilisées, nous avons pu démontrer que le chou rouge, le coing et la cerise (var. Regina) expriment le plus fort potentiel anti-oxydant imputable à la classe de molécules polaires.** Les résultats obtenus sont toutefois difficilement comparables de manière directe à ceux publiés par d'autres auteurs dû au manque de standardisation à la fois des méthodes d'extraction et des méthodes de dosage. Les valeurs d'activité anti-oxydante des fruits et légumes sont en effet extrêmement variables

selon les sources choisies. Il est donc plus pertinent de comparer les différents classements des aliments décrits dans la littérature, plutôt que leurs valeurs brutes. Nos résultats sont ainsi pour partie en adéquation avec les diverses autres études. Ainsi, les fruits et légumes à forte teneur en anthocyanes, comme dans le cas du chou rouge ou de la cerise, sont régulièrement décrits comme possédant d'importantes capacités anti-radicalaire, le plus souvent exprimées en valeur ORAC (Pellegrini et al., 2003; Wolfe et al., 2008; Wu, Beecher, et al., 2004). Dans plusieurs exemples des EPDS, la quasi-totalité des polyphénols présents au sein de certains aliments participent à l'activité anti-oxydante totale. En effet, le profil HPLC-AOx associé aux hypothèses structurales moléculaires, démontre que les cyanidines du chou rouge sont toutes, ou en grande majorité, capables de neutraliser le radical ABTS<sup>•+</sup>, et ce quelque soit la position des acylations et glycosylations. Etant donné l'importance du cycle phénolique B du noyau cyanidique dans la réactivité anti-oxydante des polyphénols, il est peu probable que celui-ci soit concerné par ces dérivations, confortant ainsi les hypothèses structurales (Rice-Evans, Miller et Paganga, 1997; Sekher Pannala et al., 2001; Seyoum, Asres et El-Fiky, 2006). Les nombreuses modifications de ce noyau cyanidique au cours de leur biosynthèse ont donc préservé, au moins partiellement, la réactivité chimique de cette classe de molécules dans le chou rouge. Ces résultats sont en accord avec les résultats décrits par Kähkönen et Heinonen (2003), démontrant une capacité anti-oxydante similaire pour les formes monoglucosides de la cyanidines par rapport à l'aglycone. Les acylations et la multiplication des glycosylations tendent néanmoins à diminuer leur potentiel anti-oxydant.

Dans le cas de la cerise, les résultats confirment également que le pouvoir anti-oxydant des molécules polaires est partagé entre des anthocyanes d'une part, et des dérivés d'acide hydroxycinnamiques d'autre part. Ces résultats sont donc en adéquation avec les corrélations, établies dans d'autres études, entre les teneurs en polyphenols totaux ou encore les teneurs en anthocyanes et l'activité anti-radicalaire de la cerise (Usenik, Fabčič et Štampar, 2008). Il en est de même notamment dans le cas du coing, où l'activité anti-oxydante est directement proportionnelle à la teneur de deux isomères de l'acide caféoylquinique, s'agissant des polyphénols très largement majoritaires de la pulpe de coing (Silva et al., 2004). Cependant, les résultats suggèrent par ailleurs que toutes les différentes formes dérivés d'une même base polyphénolique ne sont pas toujours égales dans ce contexte anti-oxydant. La quercétine est considérée comme l'une des structures polyphénoliques ayant le plus fort pouvoir anti-oxydant (Rice-Evans, Miller et Paganga, 1997), ce qui en fait souvent un outil de dosage pour justifier d'une capacité anti-oxydante, comme dans l'exemple de l'oignon (Miller et Paganga, 1997; Sellappan et Akoh, 2002). Cependant, deux dérivés quercétiniques majeurs dans

l'oignon sont très différents dans leur réactivité anti-oxydante. En effet, dans le cas de la quercétine-3,4'-diglucoside, la glycosylation touchant le cycle B serait à l'origine de l'inactivation totale de sa capacité anti-oxydante. Malgré une teneur sans doute importante de ce composé dans l'EPDS d'oignon de par un pic important observé par absorbance UV à 280 nm, il ne participe donc pas à l'action anti-radicalaire de cet aliment. Nos résultats suggèrent donc que contrairement à l'estimation totale de la quercétine, la discrimination des formes moléculaires actives et inactives par HPLC-AOx est plus pertinente.

**Les potentiels anti-oxydants des EG évalués par les méthodes TEAC et ORAC sont en opposition avec les profils HPLC-AOx correspondants.** La méthode TEAC est pourtant souvent décrite comme étant compatible avec les molécules anti-oxydantes liposolubles, notamment par l'utilisation de solvants organiques comme milieux réactionnels au lieu du milieu tamponné utilisé pour les composés hydrosolubles. Cependant, le pH du milieu réactionnel est largement déterminant dans les taux de transfert d'électrons, et donc dans la capacité anti-oxydante mesurée, suggérant une plus grande fiabilité des tests réalisés sur les composés hydrosolubles (Prior, Wu et Schaich, 2005). L'influence du milieu réactionnel sur les mesures des capacités anti-oxydantes serait encore plus importante pour la méthode ORAC (Pérez-Jiménez et Saura-Calixto, 2006). De plus, le radical ABTS<sup>+</sup> une fois réduit en présence d'anti-oxydants est insoluble dans un solvant organique comme l'éthanol et forme des agrégats, pouvant ainsi fausser les mesures de l'absorbance. C'est pourquoi nous avons fait le choix d'utiliser le même milieu réactionnel tamponné pour les différents types d'extraits dans la méthode TEAC mais aussi ORAC. Étonnamment, les résultats initiaux des EG obtenus par les dosages ORAC ou TEAC ne traduisent pas les profils HPLC-AOx obtenus pour ces mêmes échantillons. En effet, l'évaluation de l'extrait gras d'épinard par ORAC ou par TEAC ne révèle qu'un effet très modéré de l'extrait. Or, l'analyse HPLC-AOx démontre pour ce même EG d'importantes teneurs en composés anti-radicalaires. Par ailleurs, certaines études démontrent l'épinard comme étant un légume commun à fort pouvoir anti-radicalaire lorsqu'il est étudié par la méthode ORAC (Ou et al 2002 ; Wolfe et al 2008). Ceci suggère que l'analyse par la méthode HPLC-AOx des EG est davantage représentative du réel potentiel anti-oxydant lié à cette classe de molécules, et illustre encore la grande variabilité des résultats obtenus par les méthodes ORAC et TEAC entre différents laboratoires. Ces résultats nous permettent de conclure que le fort potentiel anti-oxydant de l'épinard est lié à la présence de molécules de caractère apolaire, contrairement à ce que d'autres études démontrent où la fraction hydro-soluble serait responsable de cette activité (Wu, Beecher, et

al., 2004). La nature exacte de ces molécules n'a cependant pas encore pu être établie, mais étant donné leur caractère fortement apolaire, il est probable qu'il s'agit de molécules de type caroténoïdiques. Enfin, le coing se révèle également comme aliment riche en composés anti-oxydants à la fois de nature hydro-solubles et lipo-solubles. En effet, la présence des acides caféoylquiniques anti-oxydants au sein de ce fruit a été largement décrite dans la littérature (Hamauzu et al., 2005; Magalhães et al., 2009; Silva et al., 2004). Par contre, la nature de la très grande diversité de molécules anti-oxydantes de caractère apolaire, démontré par l'analyse HPLC-AOx de son EG, est encore incertaine. Une forme de la vitamine E participe largement au fort potentiel anti-oxydant de cet aliment.

## 4.4.2 Potentiel anti-oxydant au niveau biologique (*in vitro* et *in vivo*)

### 4.4.2.1 Etude *in vitro*

Dans un but de valider le potentiel anti-radicalaire des fruits et légumes démontré par des approches chimiques, une étude *in vitro* sur le modèle de cellules d'insulinome de rat, les cellules RINm5F, a été réalisée. Or, de par leur caractère hautement apolaire, les EG et EADG n'ont pas pu être solubilisés dans le milieu de culture. Ainsi, seuls les EPDS seront traités dans cette phase d'étude.

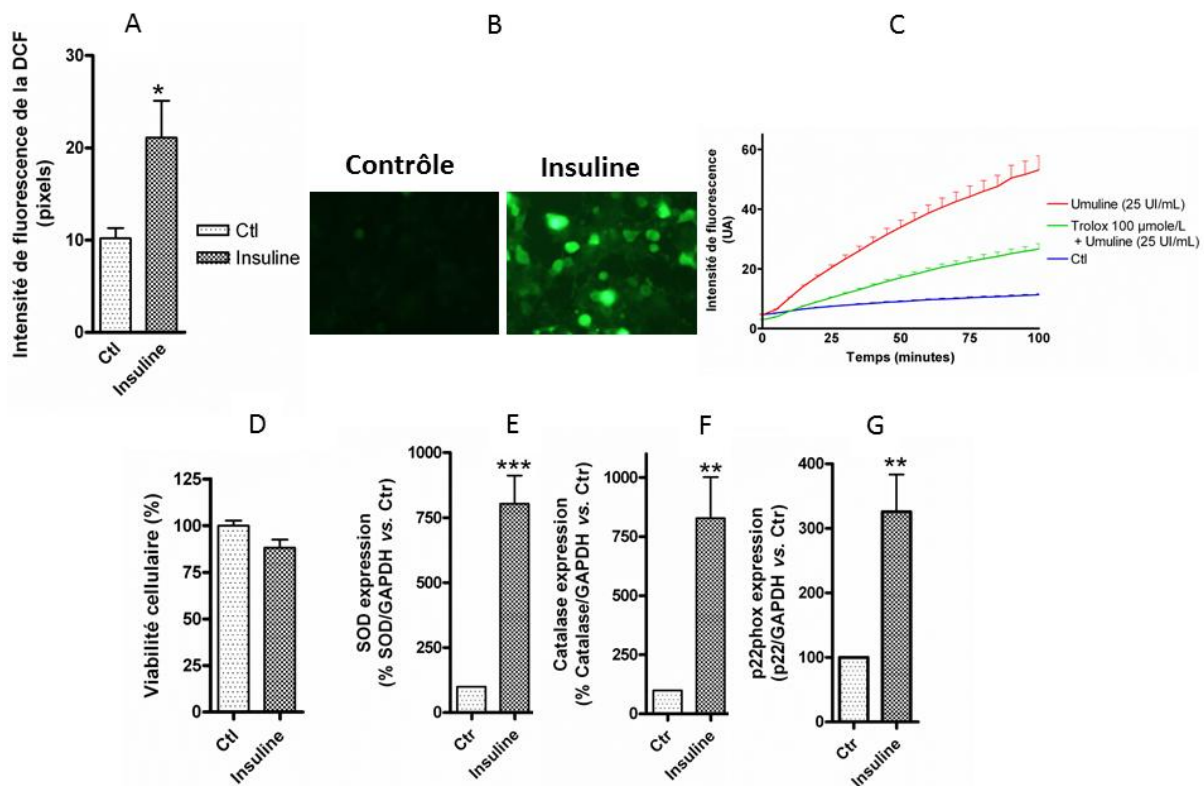
#### 4.4.2.1.1 Modèle de stress hyperinsulinique

Afin d'étudier la capacité protectrice des extraits de fruits et légumes vis-à-vis du stress oxydant sur un modèle cellulaire *in vitro*, nous avons mis en place un modèle de stress hyperinsulinique.

L'incubation des cellules RINm5F avec l'umuline à 25 UI/mL pendant 100 minutes induit une augmentation importante et significative de la fluorescence due au marquage à la DCFH-DA (Figure 4-38 ; A et B). L'hyperinsulinisme induit par un apport exogène d'umuline induit donc une croissance des phénomènes oxydatifs dans le compartiment cellulaire. En effet comme décrit précédemment la DCFH-DA, après être entrée dans la cellule, y reste piégée suite à l'action des estérases clivant la fonction di-acétate. Ce même stress n'induit cependant aucune perte de viabilité significative, démontré par la mesure de l'activité mitochondriale par un test MTT (Figure 4-45 ; D). Le suivi de l'intensité de fluorescence cellulaire (marquage à la DCFH-DA) au cours du temps, démontre une augmentation importante et progressive après induction d'un stress hyperinsulinique de 25 UI/mL. En l'absence de ce stress induit, le niveau de fluorescence reste basal. La pré-incubation des cellules avec le trolox à 100  $\mu$ mole/L pendant 24 h permet de démontrer une forte diminution de la croissance de fluorescence intracellulaire (Figure 4-38 ; C). La présence de ce puissant anti-oxydant permet donc de prévenir les réactions oxydatives liées à la surproduction de ROS induites par le stress hyperinsulinique, et illustre l'utilité de ce modèle dans l'étude de la capacité anti-oxydante d'un échantillon hydrosoluble. Enfin, l'incubation des cellules RINm5F avec l'umuline à 25 UI/mL pendant 24 h, provoque une surexpression significative de la CAT et de la SOD, deux enzymes anti-oxydantes, et de la p22phox, une enzyme pro-oxydante (Figure 4-38 ; E, G et F). Ceci confirme encore l'état de stress oxydant induit sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques par le stress hyperinsulinique. Ce modèle de stress hyperinsulinique



représente donc bien une réponse métabolique cellulaire et non pas un simple stress oxydant induit par un agent oxydant comme le peroxyde d'hydrogène par exemple.



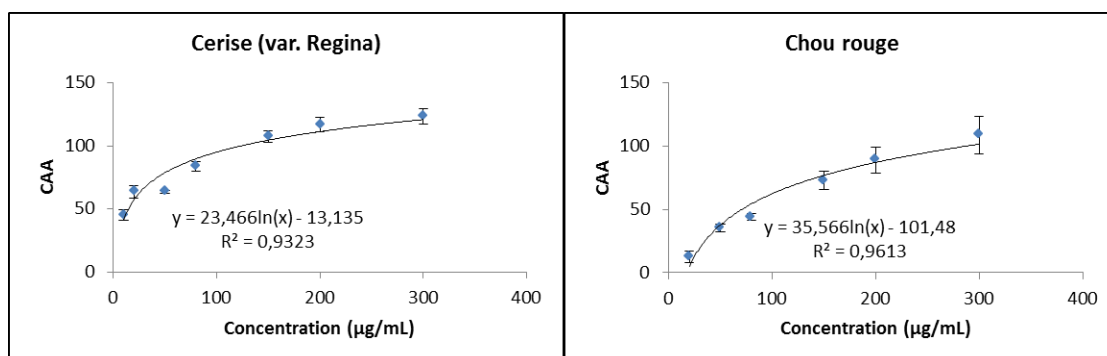
**Figure 4-45 : Modèle d'hyperinsulinisme exogène provoquant un stress oxydant**

A et B : Observation microscopique et intensité de fluorescence des cellules RINm5F incubés pendant 100 minutes avec 25 UI/mL d'Umuline (Marquage à la DCFH-DA). C : Evolution de la fluorescence cellulaire après induction ou non d'un stress hyperinsulinique avec ou sans 24 h de pré-incubation avec 100 µmole/L de trolox (Marquage à la DCFH-DA ; Cinétique de fluorescence en microplaques 96 puits). D : Evaluation de la viabilité cellulaire des RINm5F après 100 d'incubation avec 25 UI/mL d'Umuline (test MTT). E, F et G : expression de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la p22phox après induction d'un stress hyperinsulinique.

#### 4.4.2.1.2 Activité anti-oxydante cellulaire – CAA

La capacité des EPDS à protéger un modèle cellulaire, les cellules RINm5f, vis-à-vis d'un stress oxydant induit a été évaluée grâce à une méthode adaptée de la Cellular Antioxidant Activity (Wolfe et Liu, 2007). Les valeurs  $IC_{50}$  présentées ici représentent la concentration de l'extrait, ou l'équivalent en matière fraîche, nécessaire pour inhiber 50% de la fluorescence provoquée par l'induction du stress oxydant au travers de la réaction d'oxydation de la DCFH. Nous avons choisi d'étudier dans cette phase d'étude, le caractère préventif des EPDS de fruits et légumes contre un stress oxydant dû à un hyperinsulinisme exogène. Les  $IC_{50}$ , traduisant la concentration en EPDS nécessaire pour inhiber de 50 % l'oxydation de la DCFH par le stress hyperinsulinique, sont calculés à partir des courbes

d'activité anti-oxydante cellulaire (CAA) en fonction des concentrations d'EPDS testées (Figure 4-46).



**Figure 4-46 : Activité anti-oxydante cellulaire des EPDS de cerise et de chou rouge sur le modèle RINm5f soumis à un stress hyper-insulinique**

Dans un premier temps, les éventuels effets néfastes des EPDS sur la viabilité cellulaire ont été évalués au moyen d'un test MTT. Les résultats (Tableau 4-13) n'ont pu établir une quelconque perte de la viabilité des cellules après 24 h d'incubation avec les EPDS à des concentrations comprises entre 10 et 300 µg/mL. Nous en déduisons qu'il n'y a pas de cytotoxicité dans ces conditions en dessous de 300 µg d'EPDS/mL.

L'EPDS de cerise (var. Regina) et de fraise (var. Florence) se classent ensemble au premier rang en ce qui concerne le potentiel préventif contre les réactions oxydatives liées à un hyperinsulinisme induit (Tableau 4-13) présentant respectivement un  $IC_{50}$  de  $16 \pm 3$  et  $17 \pm 5$  µg EPDS/mL. Les extraits de coing, de cerise (var. Folfer) et de fraise (var. Salsa) et d'oignon suivent de très près, avec des  $IC_{50}$  compris entre  $24 \pm 3$  et  $33 \pm 10$  µg EPDS/mL. Le groupe suivant présente un pouvoir protecteur intermédiaire contre les attaques oxydatives, rassemblant les EPDS de carotte, de tomate, de radis noir et du chou rouge. Enfin, les EPDS de l'épinard, du céleri-rave, de l'asperge et de la courgette terminent ce classement avec des  $IC_{50}$  entre 6 et 16 fois supérieurs à celui de la cerise au premier rang.

Ces résultats de capacité anti-oxydante cellulaire des EPDS (au travers des  $IC_{50}$ ) présentent une corrélation avec les résultats décrits plus haut obtenus par les méthodes TEAC et ORAC, respectivement avec  $r = -0,641$  et  $r = -0,628$ . Celle-ci n'est donc pas linéaire, mais une corrélation entre 0,5 et 0,8 est souvent considérée comme moyenne, suggérant qu'une partie des réactions chimiques observées précédemment ont lieu sur ce modèle cellulaire.

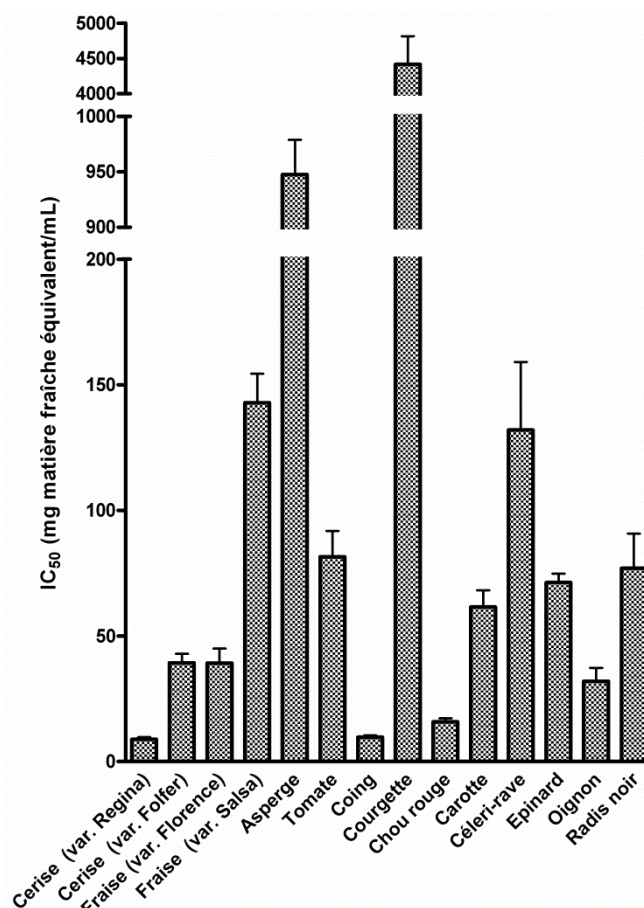
**Tableau 4-13 : Potentiel protecteur des EPDS vis-à-vis d'un stress oxydant induit par un stress hyperinsulinique exogène sur le modèle cellulaire des RINm5f**

Aliment	IC <sub>50</sub> (µg EPDS/mL) ± ET			N =	Cytotoxicité (µg/mL)	
<b>Cerise (var. Regina)</b>	16	±	3	a	4	>300
<b>Fraise (var. Florence)</b>	17	±	5	a; b	4	>300
<b>Coing</b>	24	±	3	b; c	4	>300
<b>Cerise (var. Folfer)</b>	25	±	5	b; c	4	>300
<b>Fraise (var. Salsa)</b>	28	±	5	c	4	>300
<b>Oignon</b>	33	±	10	c; d	3	>300
<b>Carotte</b>	44	±	10	d	4	>300
<b>Tomate</b>	48	±	12	d; e	4	>300
<b>Radis noir</b>	61	±	20	d; e	3	>300
<b>Chou rouge</b>	67	±	10	e	3	>300
<b>Epinard</b>	95	±	8	f	3	>300
<b>Céleri-rave</b>	120	±	43	f; g	3	>300
<b>Asperge</b>	135	±	8	g	3	>300
<b>Courgette</b>	256	±	40	h	3	>300
Corrélation CAA IC <sub>50</sub> vs TEAC : r = - 0,641 (p value > 0,05)						
Corrélation CAA IC <sub>50</sub> vs ORAC : r = - 0,628 (p value < 0,05)						

Les aliments n'ayant pas de lettre commune ont un IC<sub>50</sub> significativement différents (p < 0,05)

En divisant les IC<sub>50</sub> par les rendements d'extraction, ce classement évolue et permet un partage en quatre groupes des EPDS des fruits et légumes, des plus au moins anti-oxydants sur le modèle cellulaire. Les EPDS de Cerise (var. Regina), de coing et de chou rouge se positionnent en tête du classement avec respectivement des valeurs IC<sub>50</sub> à  $8,9 \pm 1,7$  ;  $9,8 \pm 1,2$  et  $15,8 \pm 2,5$  mg de matière fraîche équivalente/mL (Figure 4-47). Le second groupe se

compose de l'oignon, de la cerise (var. Folfer) et de la fraise (var. florence) ( $32,0 \pm 9,3 < IC_{50} < 39,2 \pm 7,4$ ). Le troisième groupe rassemble la carotte, l'épinard, la tomate, le radis noir, le céleri-rave et la fraise (var. Salsa) présentant des  $IC_{50}$  compris entre  $61,6 \pm 13,3$  et  $142,9 \pm 23,2$  mg de matière fraîche équivalent/mL. Enfin, l'asperge et la courgette terminent ce classement. Etant pauvres en EPDS, leurs capacités anti-oxydantes cellulaires sont faibles.

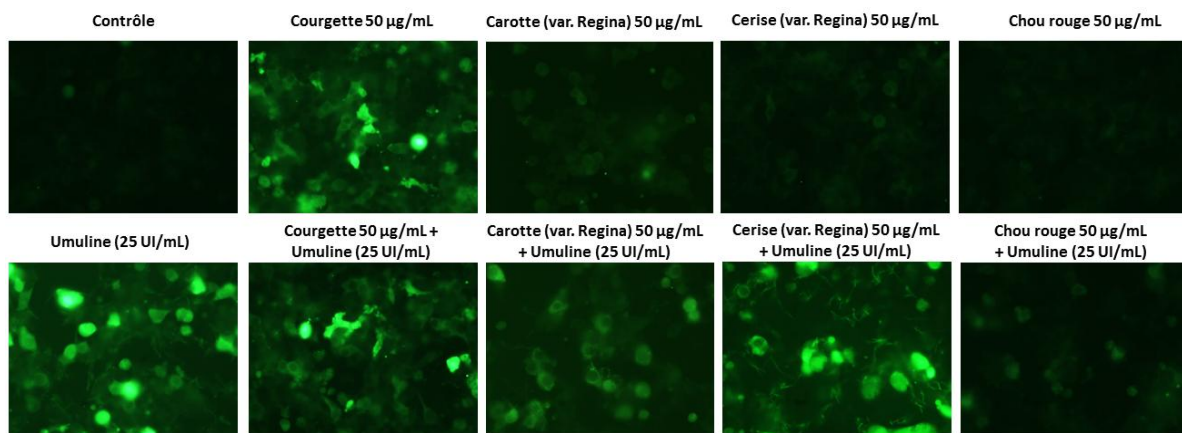


**Figure 4-47 : Capacité anti-oxydante cellulaire des fruits et légumes liée à leur extrait polaire désucre**

#### 4.4.2.1.3 Observations microscopiques (DHE ; DCFH-DA)

L'observation au microscope à fluorescence des cellules préincubées avec la sonde DCFH-DA et les EPDS de courgette, de carotte, de cerise (var. Regina) ou de chou rouge a été réalisée. D'une part les EPDS de cerise et du chou rouge, et d'autre part l'EPDS de courgette ont été choisis, car ils présentent respectivement un très fort potentiel anti-oxydant, et un très faible potentiel anti-oxydant, quelque soit la méthode d'étude. Enfin, l'EPDS de carotte a démontré de faibles capacités anti-radicalaires par les analyses chimiques, or cet extrait a par ailleurs démontré un effet protecteur intéressant vis-à-vis d'un stress oxydant induit sur le modèle des cellules RINm5F.

La condition « contrôle » correspond aux cellules uniquement incubées avec la DCFH-DA, ne subissant aucun stress hyperinsulinique induit. La condition « Insuline » correspond aux cellules incubées avec la DCFH-DA puis soumis à un stress hyperinsulinique pendant 100 minutes avant observation. Les résultats démontrent premièrement une augmentation importante de la fluorescence 100 minutes après induction du stress oxydant par l'hyperinsulinisme exogène (Figures 4-48 ; 4-49).



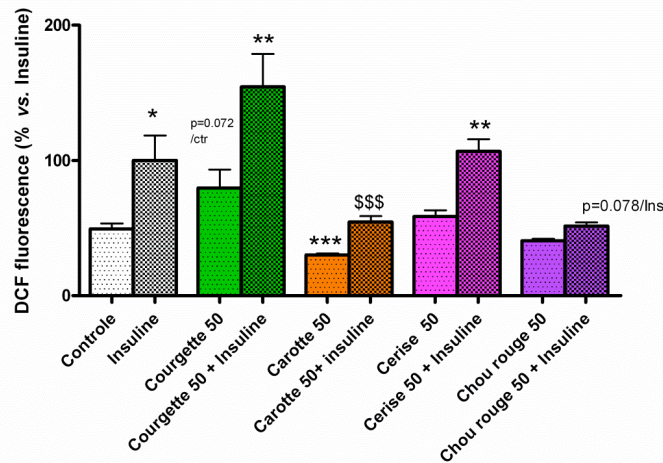
**Figure 4-48 : Observation par microscopie à fluorescence du potentiel anti-oxydant cellulaire des EPDS de fruits et légumes sur le modèle cellulaire des RINm5f soumis à un stress hyper-insulinique (marquage à la DCFH-DA)**

La préincubation des cellules avec l'EPDS de courgette à une concentration de 50 µg/mL pendant 24 h induit également une augmentation de la fluorescence. Ceci suggère donc un effet pro-oxydant de la part de cet extrait de courgette. Lorsque la préincubation des cellules avec cette même concentration d'EPDS de courgette est suivie d'un stress hyperinsulinique pendant 100 minutes, la fluorescence moyenne est encore augmentée. Ainsi, les effets pro-oxydants de l'EPDS de courgette et du stress hyperinsulinique se cumulent.

Dans le cas des extraits de carotte et de chou rouge la préincubation des cellules avec 50 µg/mL ou 300 µg/mL d'EPDS pendant 24 h, la fluorescence reste basale en l'absence de stress induit (Figure 4-49 ; 4-50). De plus, dans le cas de l'extrait de carotte, à 50 µg/mL, l'EPDS permet la réduction du niveau basal de fluorescence et donc des réactions oxydatives. L'induction du stress hyperinsulinique 24 heures après incubation avec les EPDS de carotte ou de chou rouge augmente encore légèrement les réactions oxydatives. Les niveaux de fluorescences restent toutefois très proches du niveau basal. Dans le cas de l'EPDS de cerise (var. Régina), aucun effet pro-oxydant n'est observé au microscope, la fluorescence restant au niveau basal après 24 h d'incubation avec 50 ou 300 µg d'EPDS/mL. Cependant, à 50 µg/mL, cet EPDS ne semble pas protéger les cellules vis-à-vis de l'oxydation liée à

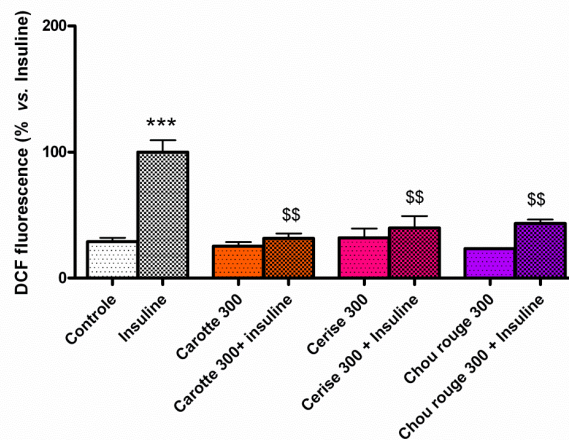


l'hyperinsulinisme. C'est après incubation des cellules avec 300 µg/mL d'EPDS de cerise que sa capacité anti-oxydante est validée, la fluorescence restant basale après induction du stress hyperinsulinique.



**Figure 4-49 : Activité anti-oxydante cellulaire des EPDS de courgette, de carotte, de cerise ou de chou rouge à 50 µg/mL, sur les cellules RINm5f (Observations au microscope à fluorescence)**

\* : p < 0,05 ; \*\* p < 0,05 ; \*\*\* : p < 0,001 ; X versus Contrôle; t-test (n=4)  
 \$ : p < 0,05 ; \$\$ p < 0,05 ; \$\$\$ : p < 0,001 ; X versus Insuline ; t-test (n=4)

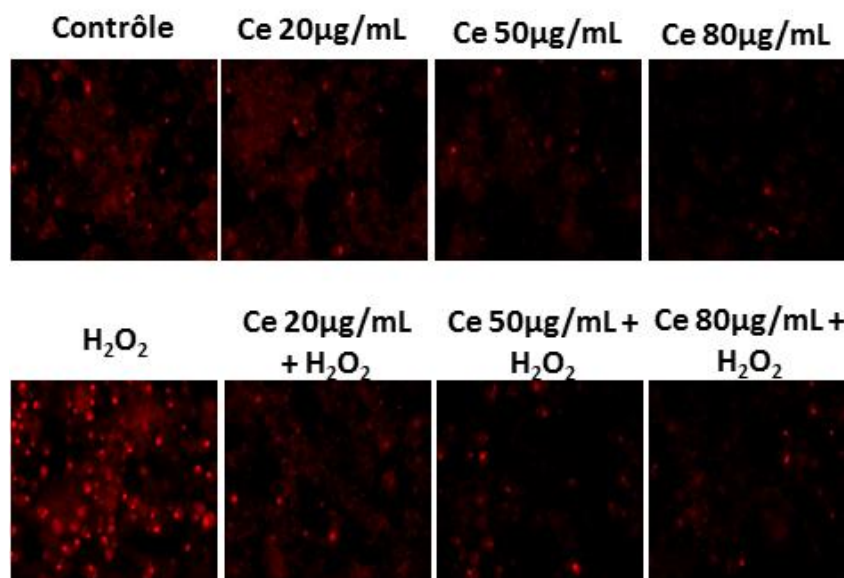


**Figure 4-50 : Activité anti-oxydante cellulaire des EPDS de carotte, de cerise ou de chou rouge à 300 µg/mL, sur les cellules RINm5f (observations au microscope à fluorescence)**

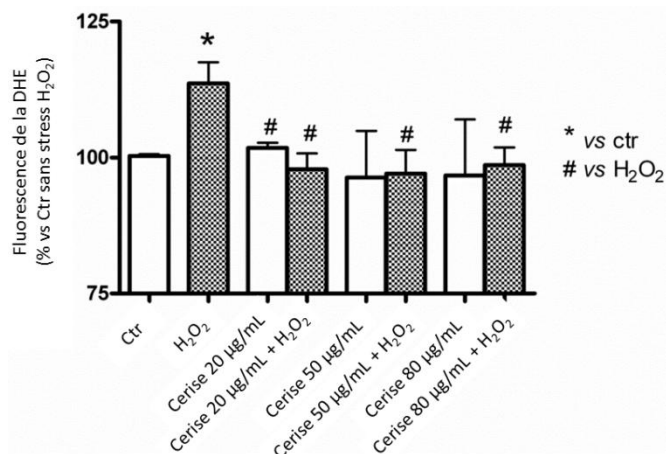
\* : p < 0,05 ; \*\* p < 0,05 ; \*\*\* : p < 0,001 ; X versus Contrôle; t-test (n=4)  
 \$ : p < 0,05 ; \$\$ p < 0,05 ; \$\$\$ : p < 0,001 ; X versus Insuline ; t-test (n=4)

L'observation au microscope à fluorescence du potentiel protecteur de l'EPDS de cerise (var. Regina) vis-à-vis des réactions oxydatives induites par le peroxyde d'hydrogène sur le modèle cellulaire des RINm5f a également été réalisée grâce au marquage à la dihydroéthidine (DHE). En effet, en présence de radicaux libres, et notamment des ROS, la DHE s'oxyde en éthidium s'intercalant à l'ADN. On observe une légère augmentation du niveau de fluorescence 1 h après ajout de 50 µmole/L de peroxyde d'hydrogène, marquant

principalement les noyaux (Figure 4-51 ; 4-52). La préincubation des cellules avec 20, 50 ou 80  $\mu\text{g}$  d'EPDS/mL pendant 1 h permet de protéger les cellules contre les réactions oxydatives initiées par le peroxyde d'hydrogène.



**Figure 4-51 : Observation au microscope à fluorescence du potentiel protecteur des EPDS de cerise (var. Regina) vis-à-vis des réactions oxydatives provoqués par le peroxyde d'hydrogène sur le modèle cellulaire des RINm5f**



**Figure 4-52 : Capacité anti-oxydante cellulaire de l'EPDS de cerise (var. Regina) vis-à-vis des réactions oxydatives provoqués par le peroxyde d'hydrogène sur le modèle RINm5f**

\* :  $p < 0,05$  ; X versus Contrôle; t-test ( $n=4$ )

# :  $p < 0,05$  ; X versus Insuline ; t-test ( $n=4$ )

#### 4.4.2.1.4 Expression des enzymes pro- et anti-oxydantes (WB : CAT ; SOD ; p22)

L'évaluation de la modification de l'expression de certaines enzymes anti-oxydantes ou pro-oxydantes par les EPDS de chou rouge et de cerise sur la lignée cellulaire RINm5f a été étudiée selon plusieurs scénarios. D'une part, les cellules ont été incubées avec les extraits pendant 24 h, suivie ou non de l'induction d'un hyperinsulinisme de 24 h. D'autre part, les

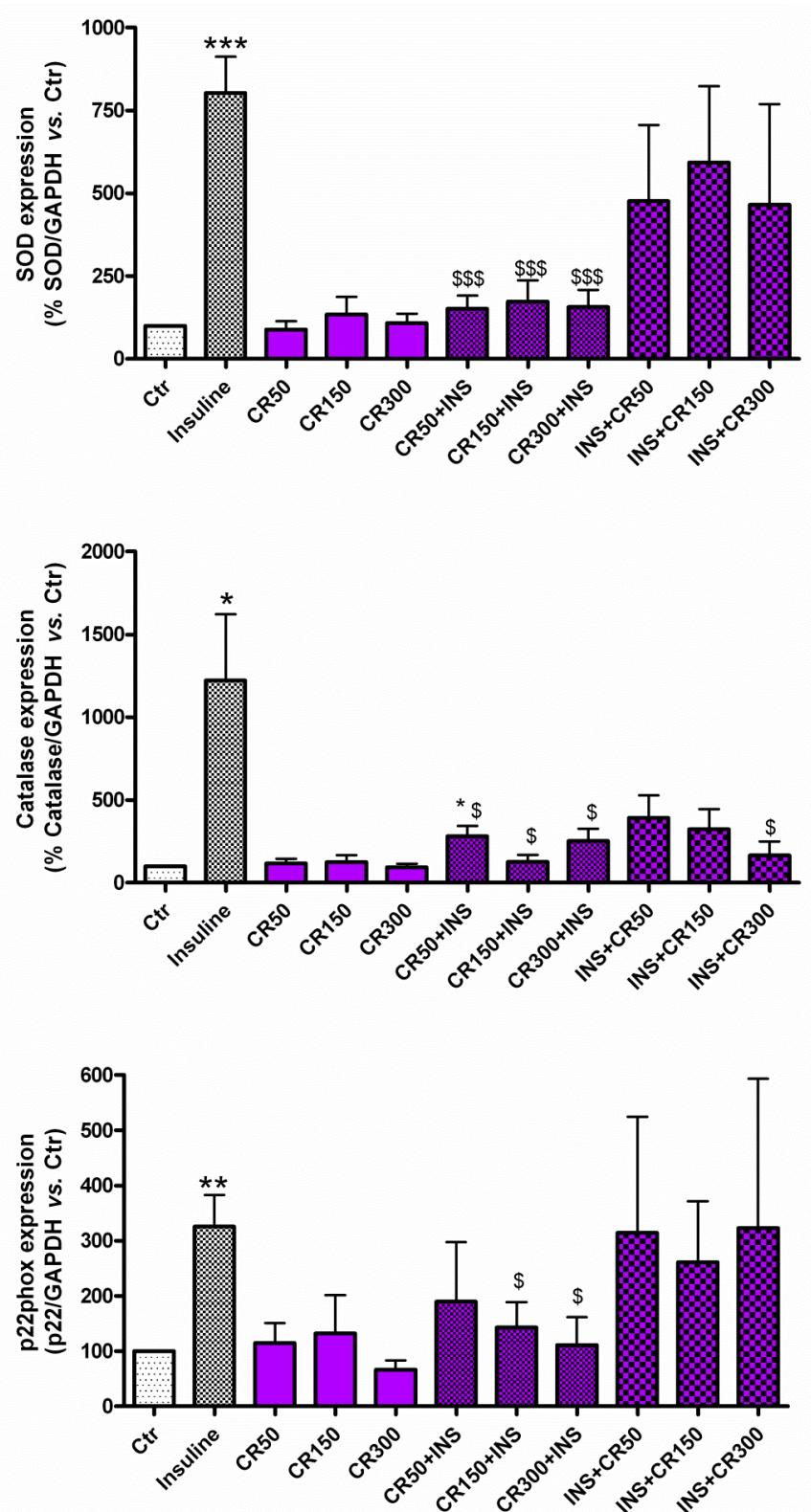
cellules ont d'abord été soumises à l'hyperinsulinisme pendant 24 h, puis ont été incubées avec les extraits pendant 24 h. La condition « Ctr » correspond aux cellules n'ayant subi aucun traitement. La condition « Insuline » correspond aux cellules soumises au stress hyperinsulinique pendant 24 h. L'expression des protéines d'intérêt est normalisée par rapport à l'expression de la protéine GAPDH et les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport au témoin sans traitement (100% d'expression).

Le stress hyperinsulinique, induit par ajout d'insuline exogène à hauteur de 25 UI/mL pendant 24 h, provoque tout d'abord la surexpression des enzymes anti-oxydantes, la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), mais également de la sous-unité p22phox de la NADPH oxydase (Figure 4-53). Il semble donc qu'une activation des voies pro-oxydantes, impliquant vraisemblablement la sous-unité p22phox, participe à la mise en place d'un stress oxydant induit par l'hyperinsulinisme. En réponse à cet état de stress oxydant, survient alors la surexpression des enzymes anti-oxydantes SOD et CAT.

L'EPDS de chou rouge seul ne modifie pas l'expression de ces enzymes sur le modèle des cellules RINm5F (Figure 4-46). Par contre, lorsque l'incubation des cellules avec cet extrait est suivie d'un hyper-insulinisme induit, nous observons une expression significativement réduite pour l'ensemble de ces enzymes. L'expression de la SOD et de la CAT sont à un niveau quasi basal, quelque soit la concentration en EPDS évaluée. L'expression de la p22phox est réduite de façon significative à partir d'une concentration de 150 µg/mL, et semble dose-dépendante. L'EPDS de chou rouge semble donc pouvoir substituer une partie de la machinerie enzymatique anti-oxydante, vraisemblablement en piégeant les radicaux libres produits par la situation de stress hyperinsulinique. De plus, cet extrait permet aux plus fortes doses, d'éviter la surexpression de l'enzyme pro-oxydante la p22phox, réduisant ainsi la production de ROS.

Lorsque le stress hyperinsulinique précède l'incubation des cellules avec l'EPDS de chou rouge, l'expression de la SOD ou de la p22phox ne sont pas significativement diminuées par rapport au niveau d'expression lors du stress contrôle. Cependant, l'expression de la CAT est réduite de manière significative à partir d'une concentration de 300 µg/mL. Ce résultat suggère qu'après 24 h de stress hyperinsulinique, il y aurait plutôt une accumulation de peroxyde d'hydrogène, stimulant l'expression de la CAT. Ainsi, l'EPDS de chou rouge semble pouvoir éliminer le peroxyde d'hydrogène produit par la SOD, résultant en une moindre surexpression de la CAT.





**Figure 4-53 : Modification de l'expression de la SOD, CAT et p22phox par l'EPDS de chou rouge sur le modèle cellulaire RINm5f (soumis au stress hyperinsulinique ou non)**

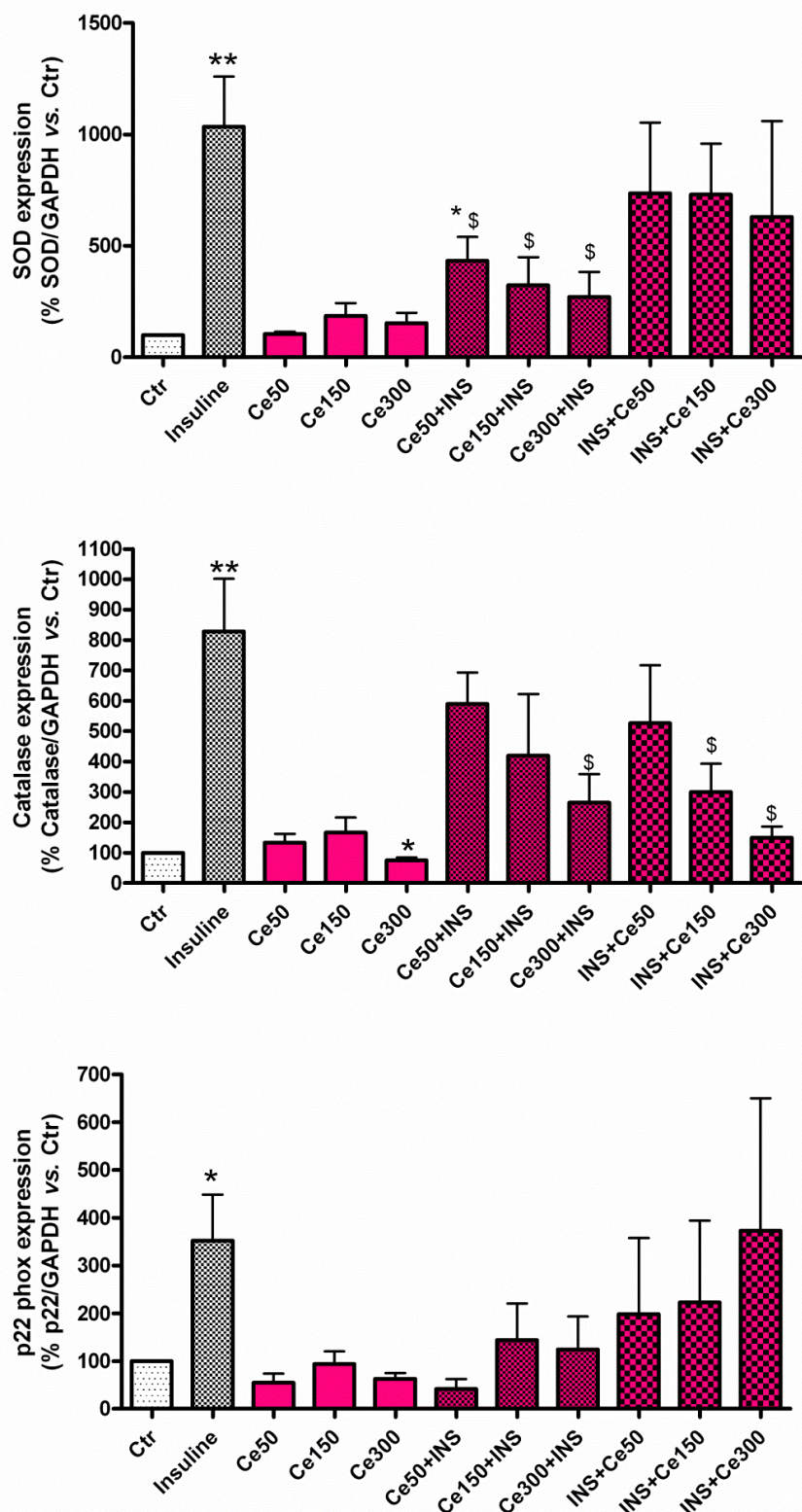
\* :  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,05$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; X versus Contrôle; t-test (n=4)

\$ :  $p < 0,05$  ; \$\$  $p < 0,05$  ; \$\$\$ :  $p < 0,001$  ; X versus Insuline ; t-test (n=4)

(CR50, CR150 et CR300 : EPDS de Chou rouge à 50, 150 ou 300  $\mu\text{g/mL}$  ; INS : umuline à 25 UI/mL ; CRX : incubation de l'EPDS seul 24 h ; CRX+INS : préincubation avec l'EPDS 24 h, puis induction du stress hyperinsulinique ; INS + CRX : Induction du stress hyperinsulinique 24 h, puis ajout des EPDS)

L'incubation des cellules avec l'EPDS de cerise seul pendant 24 h n'induit aucune augmentation de l'expression des 3 enzymes étudiées (Figure 4-54). Lorsque l'incubation avec cet extrait est suivie d'une induction de stress hyperinsulinique, on observe une expression significativement réduite de la SOD par rapport au contrôle « insuline » et ce de manière dose-dépendante. Le même profil est observé pour la CAT mais cette réduction n'est significative qu'à partir d'une concentration de 300 µg d'EPDS/mL. Une tendance à la baisse de l'expression de la p22phox induite par l'EPDS de cerise suivie d'un stress hyperinsulinique est également observée, cependant sans significativité.

Un stress hyperinsulinique induit, suivie de l'incubation des cellules avec l'EPDS de cerise ne modifie pas l'expression de la SOD ni de la p22phox, mais l'expression de la CAT est significativement diminuée par rapport à la condition « insuline » à partir de 150 µg EPDS/mL et ce de manière dose-dépendante.



**Figure 4-54 : Modification de l'expression de la SOD, CAT et p22phox par l'EPDS de cerise sur le modèle cellulaire RINm5f (soumis au stress hyperinsulinique ou non)**

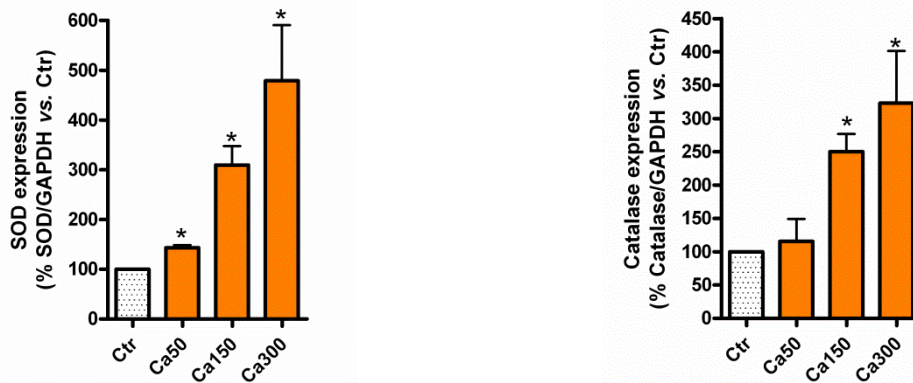
\* :  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,05$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; X versus Contrôle; t-test (n=4)

\$ :  $p < 0,05$  ; \$\$  $p < 0,05$  ; \$\$\$ :  $p < 0,001$  ; X versus Insuline ; t-test (n=4)

(Ce50, Ce150 et Ce300 : EPDS de Cerise à 50, 150 ou 300  $\mu\text{g/mL}$  ; INS : umuline à 25 UI/mL ; ; CeX : incubation de l'EPDS seul 24 h ; CeX+INS : préincubation avec l'EPDS 24 h, puis induction du stress hyperinsulinique ; INS + CeX : Induction du stress hyperinsulinique 24 h, puis ajout des EPDS)



L'incubation des cellules avec différentes concentrations de l'EPDS de carotte révèle une surexpression des deux enzymes anti-oxydantes, et de manière dose-dépendante (Figure 4-55). Ainsi, après 24 h d'incubation des cellules RINm5F avec 300 µg/mL d'EPDS de carotte, l'expression de la SOD est augmentée à  $479 \pm 112$  % (vs. Ctr), et l'expression de la CAT est augmentée à  $323 \pm 78$  % (vs. Ctr).



**Figure 4-55 Modification de l'expression de la SOD et de la CAT par l'EPDS de carotte sur le modèle cellulaire RINm5f (soumis au stress hyperinsulinique ou non)**

\* :  $p < 0,05$  ; X versus Contrôle; t-test ( $n=4$ )  
(Ca50, Ca150 et Ca300 : EPDS de carotte à 50, 150 ou 300 µg/mL pendant 24 h)

#### 4.4.2.1.5 Discussion

Le stress hyperinsulinique induit *in vitro* permet de mimer une situation d'hyperinsulinisme rencontrée dans le cas du syndrome métabolique impliquant une insulino-résistance. Pour mettre en place ce stress hyperinsulinique, nous avons fait le choix d'une insuline lente qui permettait une libération progressive de l'insuline dans le milieu, mimant au mieux les conditions de l'hyperinsulinisme chronique. La production de ROS est ainsi également progressive, ce qui est vérifié par l'augmentation régulière de la fluorescence liée à l'oxydation de la DCFH. Le stress oxydant qui en résulte est donc vraisemblablement une réponse métabolique à l'hyperinsulinisme. Ce modèle semble ainsi plus pertinent qu'un stress oxydant induit directement par un agent oxydant comme le peroxyde d'hydrogène, peu représentatif des phénomènes physiologiques. Par ailleurs, ce modèle de stress s'est révélé être reproductible, contrairement aux essais de stress hyperglycémiques très long et dont les résultats étaient hautement variables (données non montrées). De plus nous souhaitons travailler sur un modèle plus pertinent dans un contexte préventif que le modèle du stress hyperglycémique. Car une fois l'hyperglycémie installée, les cellules  $\beta$ -pancréatiques sont insulino-péniques. La production de ROS induite par l'insuline a déjà été décrite dans la littérature, et joueraient notamment un rôle dans la voie de signalisation de l'insuline

(Goldstein et al., 2005). Cependant, un hyperinsulinisme entrainerait un stress oxydant, participant ou aggravant notamment la résistance à l'insuline. En effet, une surproduction de radical hydroxyle, d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène a été rapporté dans les adicocytes en culture exposés à un hyperinsulinisme (Ge et al., 2008). Par ailleurs, dans le tissu aortique, une surproduction de l'anion superoxyde a été mesurée à la suite d'un hyperinsulinisme exogène, et mettant en jeu la NADPH oxydase (Kashiwagi et al., 1999). Ainsi, diverses études démontrent qu'un effet pro-oxydant lié à l'hyperinsulinisme est délétère pour les vaisseaux ou le tissu adipeux. Cependant, il n'est pas exclu que l'hyperinsulinisme au travers de ce stress oxydant soit également délétère pour les cellules  $\beta$ -pancréatique elles-mêmes. Afin de mettre au point ce modèle sur la cellule  $\beta$ , nous avons utilisé des quantités d'insuline probablement supérieure à la situation physiologique. Elle a cependant permis de générer un stress oxydant spécifique au niveau de la cellule.

**Les expériences de mesure de CAA des fruits et légumes démontrent l'important potentiel protecteur des EPDS de la cerise, du coing et du chou rouge vis-à-vis des réactions d'oxydations induites par un stress hyperinsulinique.** Ces résultats suggèrent donc que les fortes teneurs en anthocyanes principalement présents dans le chou rouge et la cerise, ou les molécules conjuguant acides hydroxycinnamiques avec l'acide quinique retrouvés dans le coing, mais également dans la cerise, sont capables, dans les conditions expérimentales utilisées, d'entrer dans les cellules RINm5F et d'y exercer leur activité anti-radicalaire en situation de stress oxydant. Toutefois, l'absence de pouvoir anti-oxydant observée par microscopie à fluorescence lors d'une préincubation des cellules avec 50  $\mu\text{g/mL}$  d'EPDS de cerise, s'oppose au résultat CAA attribuant le premier rang à cet extrait de par son  $\text{IC}_{50}$  le plus bas. Ce résultat peut être dû à une moindre sensibilité de la méthode de mesure de la fluorescence moyenne évaluée par la microscopie, ou encore à une durée d'excitation trop longue pendant les observations microscopiques résultant en une oxydation accélérée de la DCFH. Par ailleurs, de faibles concentrations de ce même extrait ont été démontrées comme anti-oxydants efficaces face à un stress induit par incubation des cellules RINm5F avec 50  $\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène, révélée par un niveau basal de fluorescence après marquage à la DHE.

Il est difficile de comparer les résultats obtenus avec la littérature étant donné le nombre relativement faible d'études comparatives menées sur le pouvoir anti-oxydant des fruits et légumes sur des modèles cellulaires. Néanmoins, nos résultats ne semblent que

partiellement en accord avec ceux décrits dans la littérature. En effet, Song et al., (2010) et Wolfe et al., (2008) ont également démontré un potentiel anti-oxydant très important de la plupart des fruits rouges sur le modèle HepG2 soumis à un stress oxydant par incubation avec l'ABAP, un initiateur de radicaux. Ces résultats suggèrent une dominance des fruits en tant qu'anti-oxydants devant les légumes. Or, les résultats CAA de l'étude EVA mettent en évidence une importante action protectrice des composés de l'oignon, et du radis noir contre les réactions oxydatives, au même titre que le coing, le chou rouge ou la cerise. Une autre étude sur le modèle cellulaire L-929, soumis à un stress oxydant par incubation avec l'hydroperoxyde de tert-butyle, suggère encore la forte activité anti-oxydante d'un jus de fraise, et étonnamment une action pro-oxydante du jus de carotte ou de brocoli cru, et une forte action anti-oxydante de ces jus obtenus après cuisson des légumes (Girard-Lalancette, Pichette et Legault, 2009). Or, la plupart des extraits de fruits et légumes inclus dans notre étude, dont l'EPDS de carotte, n'ont démontré aucun effet pro-oxydant aux concentrations testées. Le caractère pro-oxydant serait donc probablement lié aux molécules apolaires, absentes dans le cas de l'EPDS. De plus, les modèles cellulaires n'étant pas les mêmes et les conditions d'induction d'un stress oxydant étant de nature différentes, les différences observées ne permettent pas de conclure.

Seul l'EPDS de courgette provoque, à de faibles concentrations, une action pro-oxydante révélée par les observations au microscope à fluorescence. Ces observations confirment ainsi le dernier rang de la courgette en tant qu'aliment anti-oxydant parmi les fruits et légumes étudiés, démontré précédemment par son  $IC_{50}$  très élevée. Cette action pro-oxydante des molécules de cet extrait peut être de plusieurs origines. D'une part, il est possible que, comme le démontrent plusieurs études, en présence de métaux de transition, comme le cuivre ou le fer, certains polyphénols soient oxydés favorisant leur polymérisation au travers de réactions génératrices de radicaux libres (Halliwell, 2008). Les catéchines et épigallo-catéchines gallate, les polyphénols principaux du thé, ont notamment démontré que lorsqu'ils sont oxydés en présence de cuivre, ces derniers induisent des lésions au niveau de l'ADN par une production de radicaux hydroxyles (Azam et al., 2004).

**L'activité anti-oxydante des EPDS de chou rouge et de cerise permettent sur le modèle cellulaire RINm5F soumis à un stress hyperinsulinique, de rétablir partiellement la balance oxydative, évitant ainsi l'activation des voies de défenses enzymatiques (CAT et SOD).** L'étude de l'expression de ces enzymes a été réalisée afin de confirmer que le

pouvoir anti-oxydant des EPDS du chou rouge et de la cerise, démontré par les faibles niveaux d'oxydation lors des expériences décrites plus haut, résulte des réactions anti-radicalaires et non de l'activation des mécanismes de défense anti-oxydantes endogènes. Les résultats démontrent, qu'en présence des EPDS de chou rouge ou de cerise, la surexpression de ces enzymes est fortement réduite après induction d'un stress hyper-insulinique. De plus, la surexpression de la catalase, vraisemblablement induite par l'accumulation de peroxyde d'hydrogène, provoqué par l'hyperinsulinisme induit, peut être inhibée par la présence de l'EPDS de cerise ou de chou rouge en neutralisant cet agent oxydant. Il semble donc que l'action anti-oxydante observé pour ces extraits soit de type anti-radicalaire plutôt que pharmacologique. Or, il a par ailleurs été décrit que les cyanidines possèdent un rôle dans diverses voies de signalisation cellulaire, dont la suppression des mécanismes inflammatoires de la voie NF- $\kappa$ B par exemple (Domitrovic, 2011).

Enfin, la surexpression des enzymes anti-oxydantes par les cellules RINm5F en présence de l'EDPS de carotte seul suggère que son mécanisme anti-oxydant s'opère plutôt par une action pharmacologique, plutôt que par des réactions anti-radicalaires, étant donné la faible activité anti-radicalaire évaluée par les approches chimiques. En effet, seul deux acides cafféoyquiniques, en faible quantité, ont été détectés comme molécules piègeuses de radicaux dans l'EPDS de carotte par l'étude HPLC-AOx. Il est possible que l'effet pro-oxydant du jus de carotte rapporté précédemment (Girard-Lalancette, Pichette et Legault, 2009) soit indirectement responsable de l'action anti-oxydante observée pour l'EPDS de carotte. La stimulation de l'expression des enzymes anti-oxydantes passerait ainsi par une première signalisation pro-oxydante induite par cet extrait. Cependant, il est probable qu'une molécule, ne présentant aucune activité anti-radicalaire et donc ignorée par l'approche HPLC-AOx, ait une action pharmacologique en agissant directement sur les voies de signalisation impliquées dans les défenses anti-oxydantes. Certaines molécules naturelles, comme l'épigallocatechine gallate, ont en effet été décrites comme stimulant directement l'expression de la SOD et de la CAT, en plus de leur action anti-radicalaire (Weinreb et al., 2009).

Les polyphénols anti-oxydants présents au sein des extraits de fruits et légumes les plus anti-radicalaires permettent donc de réduire *in situ* le stress oxydant, limitant la mise en place des systèmes de défense cellulaires endogènes. D'autres molécules, agiraient comme anti-oxydant en stimulant directement les défenses endogènes, comme dans le cas de l'EPDS de carotte. Cette étude a ainsi permis de confirmer le potentiel préventif des molécules naturelles des fruits et légumes en matière de stress oxydant.

#### 4.4.2.2 Etude in vivo

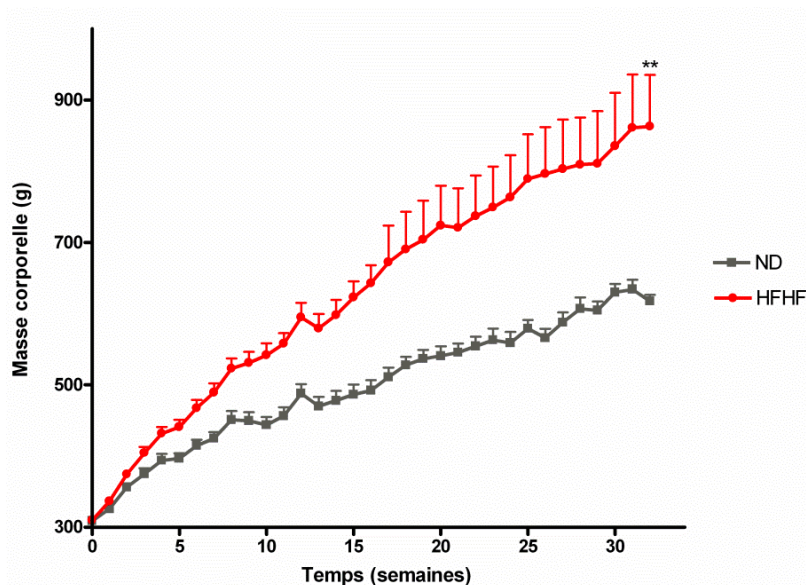
##### 4.4.2.2.1 Modèle High Fat High Fructose

Avant d'évaluer *in vivo* les effets du chou rouge et de la cerise, un modèle de rat diabétique de type 2 a été mis en point par une approche alimentaire basée sur un régime hypercalorique : le régime High Fat High Fructose (HFHF). L'impact du régime HFHF a été évalué sur différents paramètres métaboliques et tissulaires chez ces rats, et comparé à une alimentation équilibrée ND (Normal Diet).

Dans la suite de ce document, nous appellerons les rats nourris au régime HFHF « rats HFHF », et les rats nourris au régime ND « rats ND ».

##### 4.4.2.2.1.1 Impact du régime HFHF sur le poids et la leptinémie

Dès la 3<sup>ème</sup> semaine de régime, les rats HFHF présentent une masse corporelle significativement plus élevée que les rats ND (respectivement  $404,5 \pm 8,2$  g et  $375,1 \pm 7,9$  g ;  $p < 0,05$ ) (Figure 4-56). Cet écart de poids entre les deux groupes s'accroît tout au long de l'étude. Ainsi, à 16 semaines, le poids moyen est de  $492,3 \pm 14,3$  g pour les rats ND, contre  $642,8 \pm 25,2$  g pour les rats HFHF. Après 24 semaines et 32 semaines, les poids des rats ND atteignent respectivement  $559,0 \pm 15,3$  g et  $617,4 \pm 8,9$  g. Aux mêmes temps, les poids des rats HFHF sont respectivement de  $763,4 \pm 59,1$  g et  $862,9 \pm 72,2$  g. Le régime HFHF entraîne donc une obésité chez le rat.

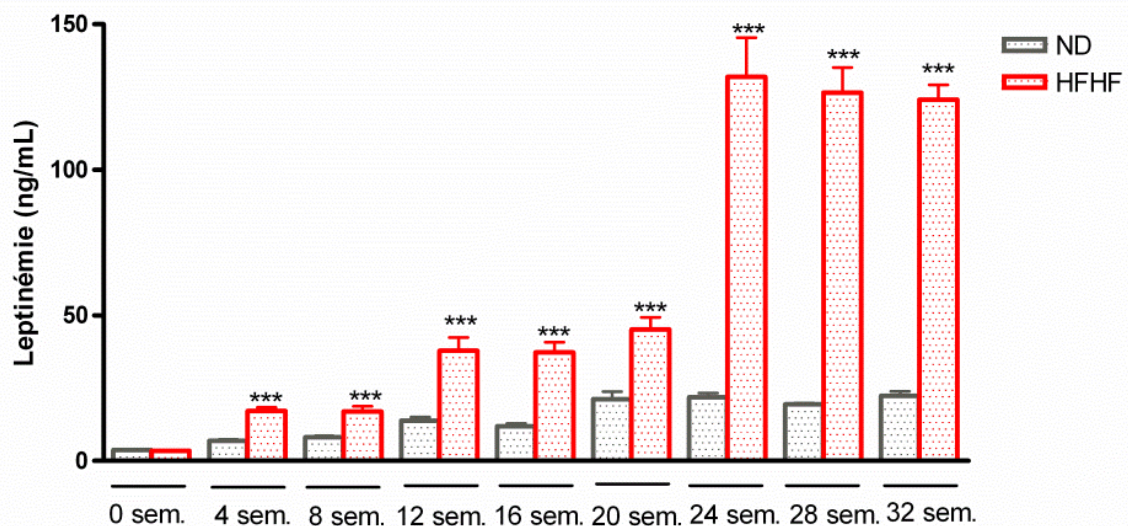


**Figure 4-56 : Evolution du poids des rats en fonction de leur régime alimentaire**

Poids moyens  $\pm$  SEM (n = 6) (t-test HFHF vs ND :  $p < 0,05$  à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine). « ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose



La mesure de la leptinémie, reflet de la sécrétion de leptine par les adipocytes, permet d'apprécier l'accumulation de masse grasse. En effet, généralement, plus le tissu adipeux est hypertrophié, plus la leptinémie est élevée. Une hyperleptinémie est ainsi observée chez les rats HFHF dès 12 semaines avec  $37,9 \pm 4,5$  ng/mL, par rapport à  $13,9 \pm 1,2$  ng/mL pour les rats ND ( $p < 0,005$ ) (Figure 4-57). L'écart entre les deux groupes évolue peu jusqu'à 20 semaines, avec respectivement pour les rats ND ( $21,2 \pm 2,7$  ng/mL) et les rats HFHF ( $45,1 \pm 4,1$  ng/mL). A partir de 24 semaines de suivi, la leptinémie des rats HFHF est fortement augmentée pour atteindre  $131,9 \pm 13,4$  ng/mL contre  $21,9 \pm 1,5$  ng/mL chez les rats ND. Enfin, à 32 semaines d'étude, ce rapport n'évolue plus. La courbe de poids semble donc être corrélée avec l'augmentation progressive de la masse grasse des animaux révélée par l'hyperleptinémie.



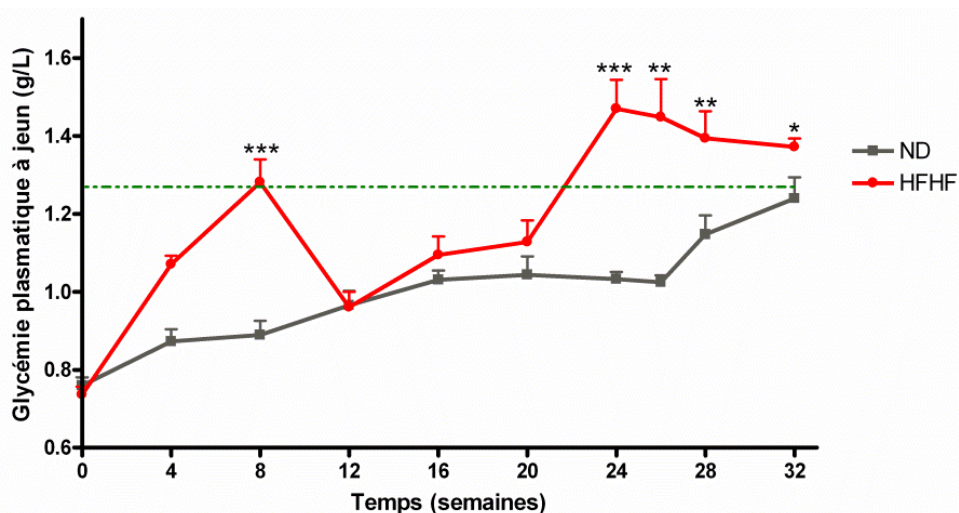
**Figure 4-57 : Evolution de la leptinémie des rats en fonction du régime alimentaire**

Les leptinémies présentées sont les valeurs moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM (n = 6) (t-test HFHF vs ND \*\*\* :  $p < 0,005$ ). « ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose

#### 4.4.2.2.1.2 Impact du régime HFHF sur la régulation glycémique, la tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline

Le régime HFHF induit dès 4 semaines une augmentation des glycémies à jeun qui devient significative à 8 semaines ( $p < 0,005$ ) (Figure 4-58). L'hyperglycémie induite à court terme est cependant transitoire, étant donné une normalisation glycémique à 12 semaines jusqu'à 20 semaines. A partir de 24 semaines, la glycémie à jeun des rats HFHF est supérieure à 1,26 g/L de sucre dans le sang ( $1,47 \pm 0,1$  g/L), contrairement aux rat ND ( $1,03 \pm 0,02$  g/L). L'hyperglycémie à jeun des rats soumis au régime HFHF persiste jusqu'à la fin de l'étude à

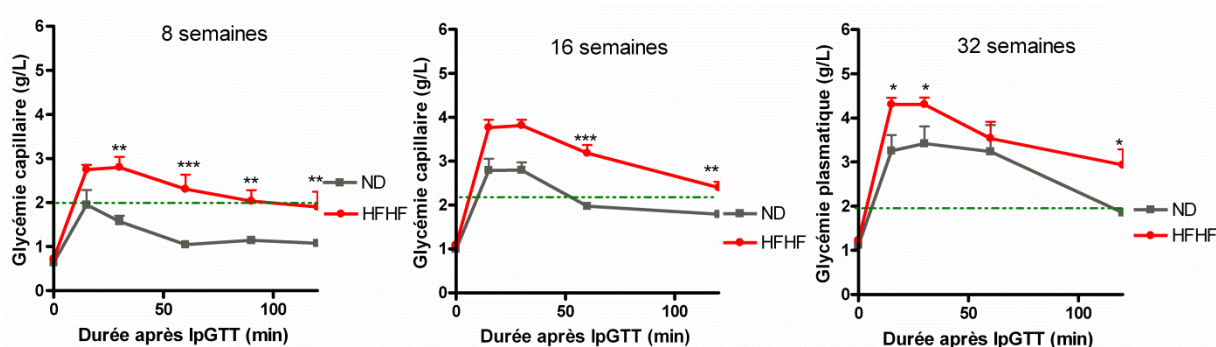
32 semaines. On peut cependant noter une augmentation continue de la glycémie des rats ND durant toute la durée de l'étude.



**Figure 4-58 : Evolution de la glycémie à jeun des rats en fonction de leur régime alimentaire**

Les valeurs de glycémies à jeun obtenus par dosage RTU représentent la moyenne de chaque groupe  $\pm$  SEM (n=6) (t-test ND vs HFHF : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$ ).

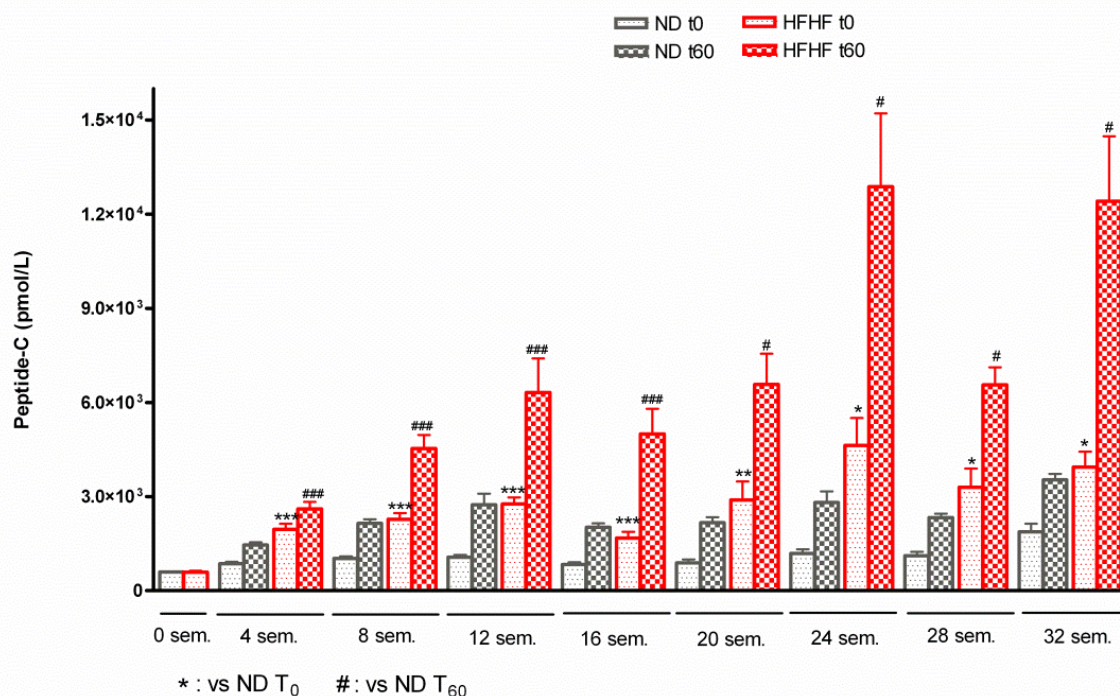
Afin de vérifier la capacité des rats de réguler leur glycémie, une IpGTT est réalisée. Pour ce faire, une solution de glucose est injectée en intrapéritonéale à 2g/Kg, en suivant l'évolution de la glycémie au cours des 120 minutes suivantes. Une intolérance au glucose est constatée lorsque 2 h après l'IpGTT, la glycémie n'est pas inférieure à 2g/L. Une heure après l'IpGTT, les glycémies post-prandiales des rats HFHF sont significativement augmentées dès 8 semaines de régime avec une valeur à  $2,30 \pm 0,3$  g/L, contre  $1,08 \pm 0,1$  g/L pour le groupe ND ( $p < 0,01$ ) (Figure 4-59). Toutefois, 2 h après l'IpGTT, la glycémie redescend en dessous des 2 g/L ( $1,90 \pm 0,3$  g/L). Cette augmentation de la glycémie post-prandiale due au régime HFHF persiste à la 16<sup>ème</sup> semaine, avec, à 1 h après l'IpGTT, une glycémie de  $3,18 \pm 0,2$  (contre et  $1,98 \pm 0,1$  g/L pour les rats ND ;  $p < 0,005$ ). Mais à 32 semaines, aucune différence de la glycémie post-prandiale 1 h après l'IpGTT n'est observée pour les 2 régimes (HFHF :  $3,61 \pm 0,3$  g/L, ND :  $3,24 \pm 0,6$  g/L). A 2 h après l'IpGTT, la glycémie reste supérieure à 2 g/L pour les rats HFHF (16 et 32 semaines respectivement :  $2,4 \pm 0,1$  et  $2,94 \pm 0,3$  g/L ; contre ND  $1,80 \pm 0,04$   $p < 0,01$  et  $1,85 \pm 0,07$  g/L  $p < 0,05$ ). Ainsi, une intolérance au glucose est induite par le régime HFHF dès 16 semaines, et persiste pendant toute l'étude.



**Figure 4-59 : Evolution de la tolérance au glucose**

Evolution des glycémies capillaires durant un IpGTT (glycémie moyenne  $\pm$  SEM) (n = 6) (t-test ND vs HFHF : \* p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,005). « ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose

L'insulino-sécrétion à jeun et post-prandiale est mesurée au travers de la c-peptidémie (Figure 4-60). L'insulino-sécrétion des rats ND n'évolue que très peu au cours du temps. A 4 semaines, les insulinémies à jeun et postprandiale sont respectivement de  $1027 \pm 71$  et  $1974 \pm 164$  pmole/L, pour atteindre des valeurs maximales de  $1872 \pm 259$  et  $3535 \pm 185$  pmole/L après 32 semaines. A l'opposé, on observe un hyperinsulinisme significatif chez les rats HFHF dès 4 semaines ( $2282 \pm 188$  pmole/L à jeun : p<0,005 ;  $4531 \pm 433$  pmole/L en postprandial : p<0,005), qui progresse au cours du temps pour atteindre de  $3937 \pm 495$  à jeun (p<0,05) et  $12412 \pm 2072$  pmole/L (p<0,05) en postprandial après 32 semaines d'étude.



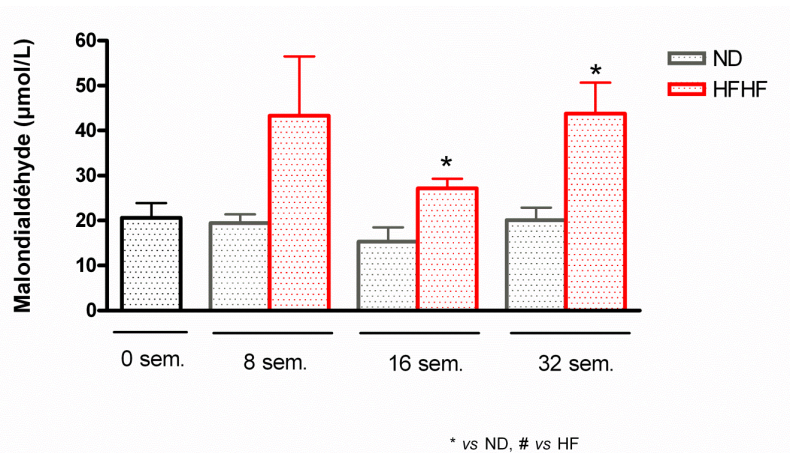
**Figure 4-60 : Evolution de l'insulino-sécrétion des rats en fonction de leur régime alimentaire**

Les valeurs de C-peptidémie correspondent aux moyennes  $\pm$  SEM de chaque groupe à jeun ( $t_0$ ) et post-IpGTT ( $t_{60}$ ) (n = 6) (t-test ND  $T_0$  vs. HFHF  $T_0$  \* p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,005 ; t-test ND  $T_{60}$  vs. HFHF  $T_{60}$  # : p < 0,05 ; ## : p < 0,01 ; ### : p < 0,005).



#### 4.4.2.2.1.3 Impact du régime HFHF sur le stress oxydant

Les concentrations sériques de malondialdéhyde, marqueur de la peroxydation lipidique, sont augmentées chez les rats HFHF de manière significative à partir de 16 semaines de régime ( $27,2 \pm 2,1 \mu\text{mole/L}$ , contre  $15,3 \pm 3,2 \mu\text{mole/L}$  pour les rats ND :  $p < 0,05$ ) (Figure 4-61). L'élévation du niveau de peroxydation lipidique par le régime HFHF s'accroît encore avec le temps, pour atteindre  $43,8 \pm 6,8 \mu\text{mole/L}$  à 32 semaines, contre  $20,1 \pm 2,8 \mu\text{mole/L}$  chez les rats ND ( $p < 0,05$ ).

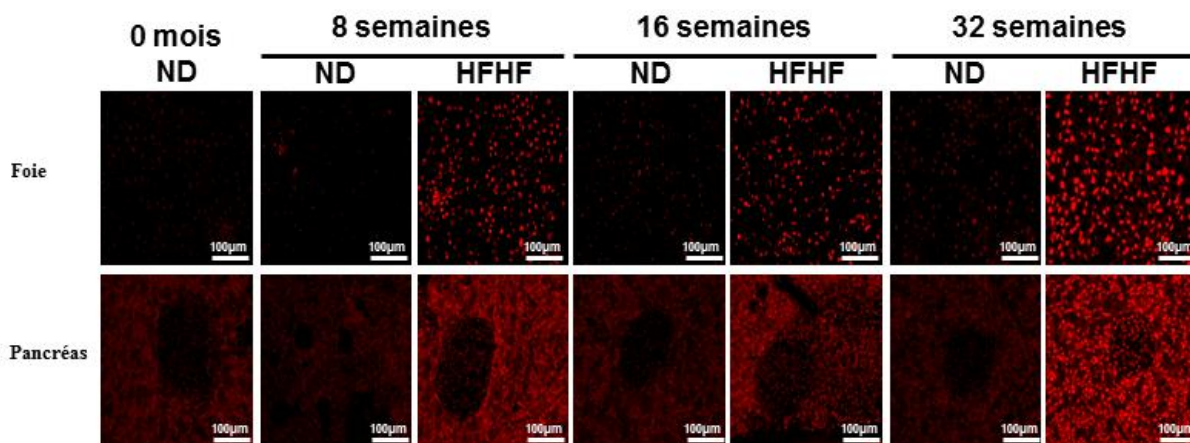


**Figure 4-61 : Evolution de la peroxydation lipidique chez les rats en fonction de leur régime alimentaire**

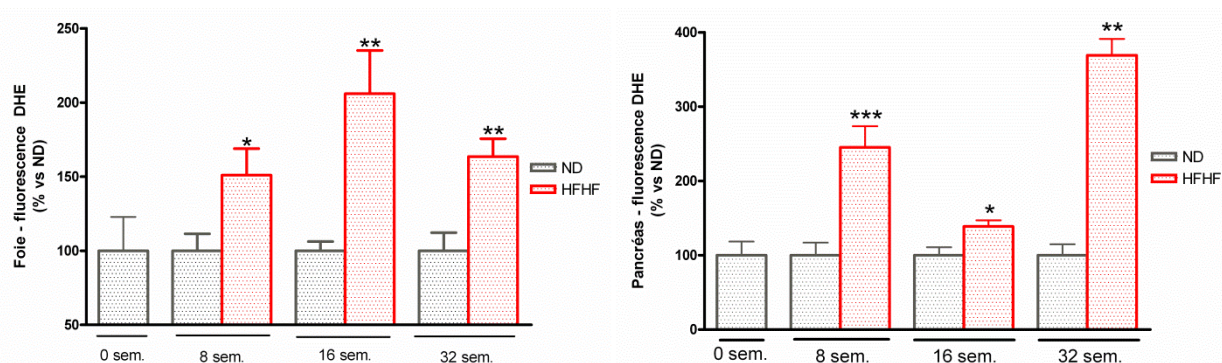
(\*  $p < 0,05$ )

Le marquage fluorescent des ROS à l'aide de la sonde DHE sur les coupes histologiques de foie des rats HFHF à 8 semaines montre une élévation significative de leur production par rapport aux rats ND ( $151 \pm 18 \%$  ;  $p < 0,05$ ) (Figure 4-62 et 4-63). Cet état de stress oxydant hépatique persiste tout au long de l'étude, s'intensifiant même à  $206 \pm 29$  ( $p < 0,01$ ) et  $164 \pm 12 \%$  ( $p < 0,01$ ) après respectivement 16 et 32 semaines.

Dans le pancréas, une élévation significative du niveau de fluorescence est observée également dès 16 semaines de régimes HFHF avec  $245 \pm 28 \%$  ( $p < 0,005$ ). Ce stress oxydant pancréatique induit à court terme est transitoire, étant donné la diminution de fluorescence à 16 semaines ( $139 \pm 8 \%$  ;  $p < 0,05$ ). Enfin, à long terme (32 semaines), une importante surproduction de ROS est à nouveau révélée  $369 \pm 22 \%$  ( $p < 0,01$ ).



**Figure 4-62 : Observations du stress oxydant tissulaire – coupes histologiques de foie et de pancréas de rats après marquage à la DHE**



**Figure 4-63 : Evaluation du stress oxydant tissulaire chez le rat en fonction de leur régime alimentaire**

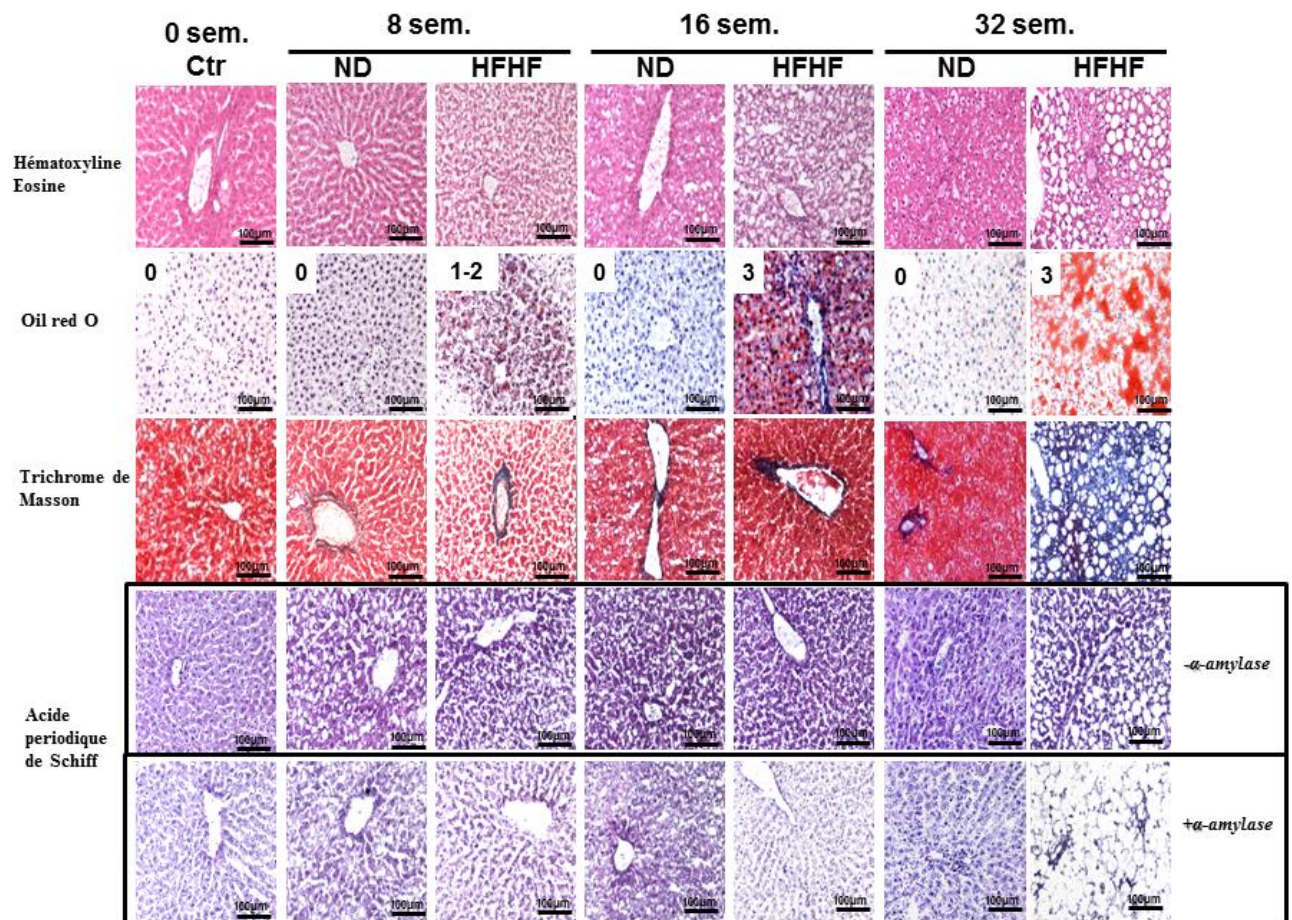
Le niveau de stress oxydant est évalué par la quantification de la fluorescence des tissus après marquage à la DHE aux différents temps de l'étude. L'analyse porte sur  $n = 6$  ; les valeurs représentent la moyenne de fluorescence de chaque groupe  $\pm$  SEM ; \*  $p < 0,05$  vs. ND ; \*\*  $p < 0,01$  vs. ND. Les rats ND servent de référence, le niveau de fluorescence des coupes histologiques est par défaut de 100 % à chaque temps de sacrifice.

L'analyse histologique des foies après marquage à l'hématoxyline éosine (HE), au red oil, au trichrome de Masson, ou à l'acide periodique de Schiff (avec ou sans digestion préalable) permet d'observer respectivement la structure tissulaire, l'incorporation de lipides, le collagène, et le stockage du glycogène dans le foie.

Au démarrage de l'étude, les hépatocytes sont organisés de manière radiale autour des veines centro-lobulaires (Figure 4-64). Les cellules sont dans l'ensemble homogènes avec un cytoplasme très rosé et des noyaux bien définis. Aucune stéatose n'est observée dans ce tissu hépatique à ce stade (score de 0). Cette structure évolue peu chez les rats ND tout au long de l'étude. Par contre, le régime HFHF induit, dès 16 semaines, une stéatose hépatique visualisée par le gonflement des hépatocytes (présence de vacuoles de gouttelettes lipidiques, et



déplacement fréquent des noyaux en périphérie). Cette stéatose, mise en évidence par observation des coupes colorées au RedOil, est évaluée à un score entre 1 et 2 à 8 semaines (33 à 66% de la surface du foie), et évolue jusqu'au stade maximale de 3 dès 16 semaines. Aucune fibrose tissulaire n'est observée après coloration des foies au trichrome de Masson au cours du temps, quelque soit le régime alimentaire. Par contre, après 32 semaines de régime HFHF, les rats développent une importante fibrose hépatique démontrée par l'intense coloration bleue de l'ensemble du tissu hépatique. Enfin, la coloration à l'acide periodique de Schiff, après digestion par la diastase ou non permet de d'observer le stockage important et progressif du glycogène dans les hépatocytes chez les rats HFHF. En effet, dès 16 semaines d'étude, une décoloration importante par l' $\alpha$ -amylase est observée pour ce groupe, et décoloration qui s'intensifie encore à 32 semaines.



**Figure 4-64 : Observations par microscopie des foies de rats ayant suivi un régime ND ou HFHF – évolution dans le temps**

Coupes histologiques de foies après coloration HE, RedOil, Trichrome de Masson et à l'acide periodique de Schiff (en présence ou non d' $\alpha$ -amylase).

#### 4.4.2.2.1.4 Discussion

**Le régime High Fat High Fructose provoque une obésité confirmée par une augmentation de la leptinémie chez le rat.** La leptine, produite et excrétée par les cellules du tissu adipeux, est une hormone impliquée dans la régulation du métabolisme par stimulation de la dépense énergétique, réduction de la prise alimentaire, et, à termes, rétablissement d'une normoglycémie (Galic, Oakhill et Steinberg, 2010). C'est notamment à travers l'activation de la protéine kinase AMPK (AMP-activated protein kinase, régulant l'homéostasie énergétique) que la leptine agit (Daval, Ferré et Foufelle, 2006). Cette fonction de signalisation est cependant altérée par l'obésité, induisant des phénomènes de résistance à la leptine. Les résultats suggèrent donc que le régime HFHF provoque progressivement une résistance à la leptine. D'après Caro et al. (1996), il pourrait s'agir d'une altération des mécanismes de transport permettant le passage de la leptine au travers de la barrière hématoencéphalique. De plus, la consommation excessive de fructose serait responsable de cette résistance progressive à la leptine, qui lorsqu'associée à un régime HFD (High Fat Diet) provoque le développement rapide de l'obésité (Shapiro et al., 2008).

**L'obésité induite par ce régime HFHF s'accompagne de plus d'un hyperinsulinisme et d'une intolérance au glucose.** En effet, un hyperinsulinisme à jeun et post-*Ip*GTT est induit par le régime HFHF. Il est à l'origine d'une dérégulation de la glycémique (glycémie post-prandiale restant supérieure à 2,0 g/L après 120 minutes). Après 24 semaines, une hyperglycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L est définitivement installée, confirmant ainsi le diabète de type 2. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Huang et al. (2004), démontrant une dysfonction de l'insulino-sécrétion, résultant en une intolérance au glucose, induite par 8 semaines de régime HFD chez le rat.

**Le régime HFHF induit également un état de stress oxydant généralisé : augmentation de la peroxydation lipidique plasmatique, surproduction de ROS dans le pancréas et le foie, associée à une stéatose non compliquée (Non-Alcoholic Fatty Liver, NAFL).** L'obésité, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinisme développés par le régime HFHF seraient en effet impliqués dans la surproduction de ROS à l'origine d'un stress oxydant généralisé. Ces résultats sont également en accord avec la littérature, incriminant la peroxydation lipidique, et donc le stress oxydant, comme principal responsable du développement de stéatose hépatique (Birkner et al., 2005; Pessayre, Fromenty et Mansouri, 2004).

**Ce modèle HFHF permet donc d'induire un diabète de type 2 après 24 semaines de régime. En effet, à ce stade, les animaux présentent une obésité, associée à un hyperinsulinisme, des hyperglycémies à jeun et postprandiales, une intolérance au glucose. Ces modifications métaboliques s'accompagnent d'une stéatose hépatique ainsi que d'un stress oxydant généralisé.**

#### **4.4.2.2.2 Protocole EVA**

Pour cette étude, 2 types de modèles ont été mis en place:

- L'approche nutraceutique où les rats sont nourris par un régime HFHF, supplémenté ou non par 10 % de lyophilisat de chou rouge ou de cerise à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine.
- L'approche hygiéno-diététique où les rats sont nourris par un régime HFHF pendant une première période de 8 semaines, avant de basculer à une alimentation ND supplémentée ou non par 10 % de lyophilisat de chou rouge ou de cerise.

##### *4.4.2.2.2.1 Approche Nutraceutique*

Dans cette approche, nous avons étudié l'impact d'une supplémentation d'un régime HFHF par un lyophilisat de chou rouge ou de cerise, sur les paramètres physiques, métaboliques, oxydatifs et tissulaires.

Dans cette partie, nous appellerons les rats nourris avec un régime HFHF supplémenté par 10 % de lyophilisat de chou rouge ou de cerise à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine respectivement « rats HFHF Chou R » et « rats HFHF Cerise »

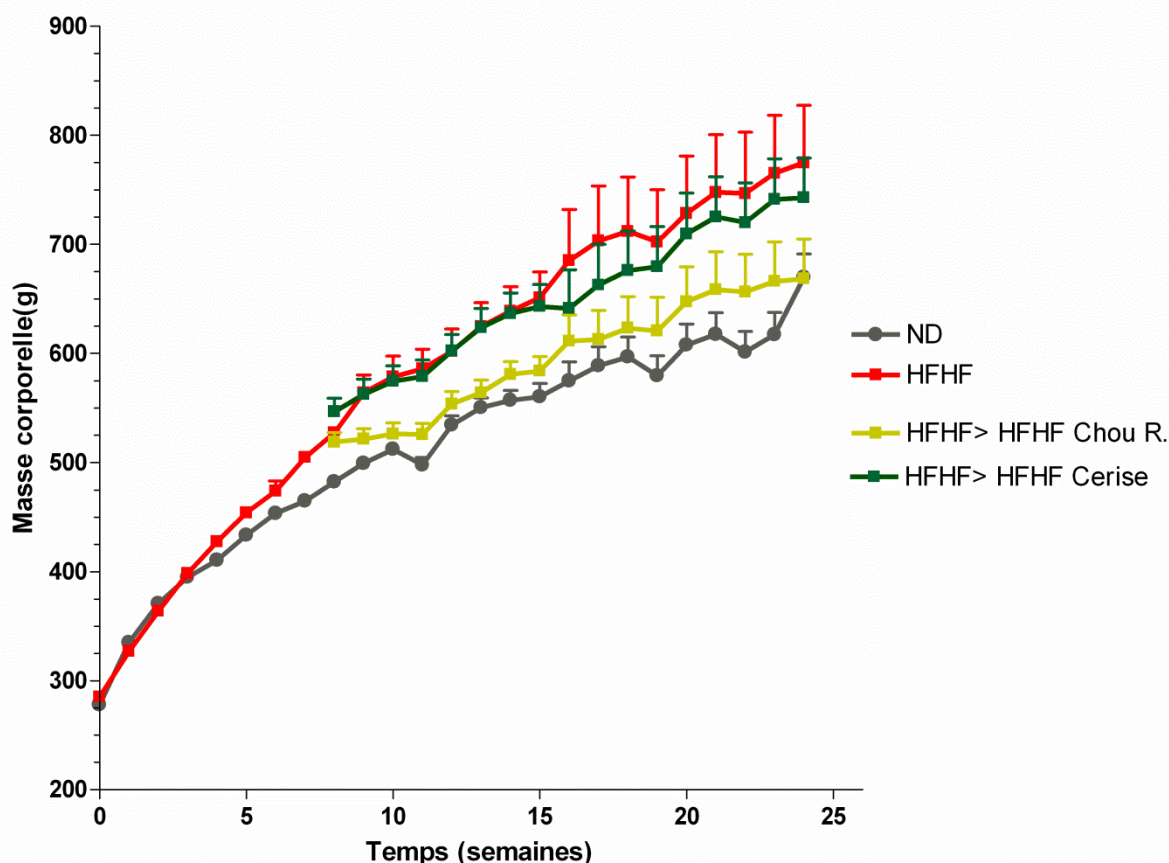
##### *4.4.2.2.2.1.1 Impact sur le poids et la leptinémie*

Les résultats démontrent qu'à partir de 8 semaines, le poids moyen des rats HFHF Chou R. augmente plus lentement par rapport aux rats HFHF (Figure 4-65). En effet, dès la 9<sup>ème</sup> semaine, le poids moyen des rats du groupe HFHF Chou R est significativement plus bas que pour les rats HFHF (respectivement  $521,4 \pm 9,7$  g et  $563,8 \pm 16,3$  g ;  $p < 0,05$ ). Cette réduction de prise de masse corporelle reste significative jusqu'à la 15<sup>ème</sup> semaine. En revanche, de la 16<sup>ème</sup> semaine à la 24<sup>ème</sup> semaine, la variabilité inter-individuelle étant importante du fait de la réduction du nombre d'animaux, aucune différence significative n'est observée entre le poids moyen des rats HFHF et les rats HFHF Chou R (respectivement à 24 semaines  $774,8 \pm 52,8$  g et  $668,3 \pm 36,7$  g).



Pour le régime HFHF Cerise, aucune différence significative n'est observée au cours de l'étude par rapport aux rats HFHF. Ainsi, à 24 semaines, les rats du groupe HFHF Cerise présentent un poids moyen de  $742,8 \pm 36,5$  g, contre  $774,8 \pm 52,8$  g pour les rats du groupe HFHF.

Ces résultats peuvent être corrélés à une prise alimentaire significativement diminuée pour les animaux HFHF Chou R par rapport aux rats HFHF ou HFHF Cerise (données non montrées), mais qui doit encore être confirmée par une mesure exacte de l'apport calorique.



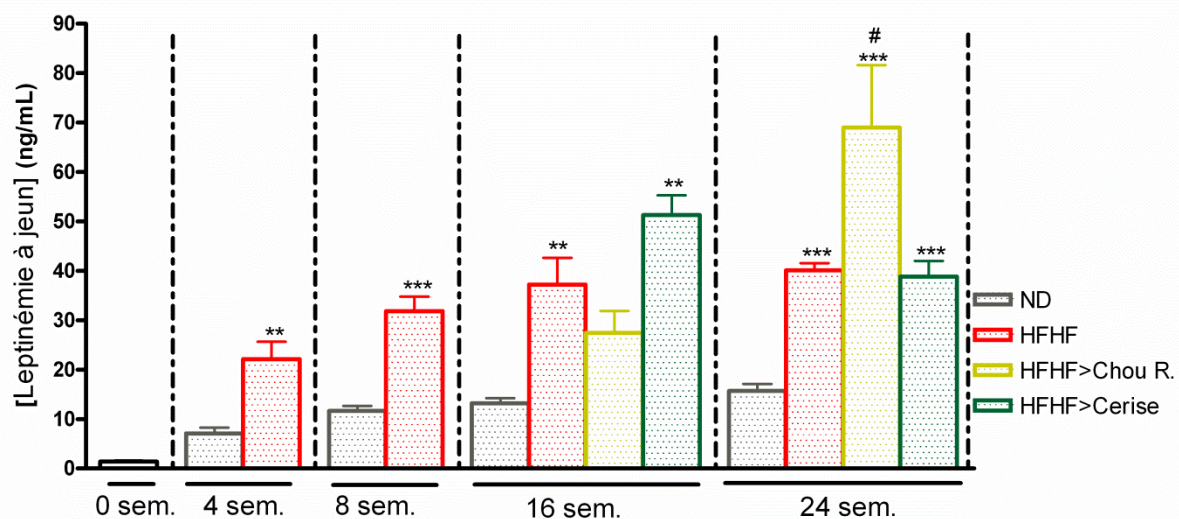
**Figure 4-65 : Evolution de la masse corporelle - effet de l'approche nutraceutique**

Poids moyens par groupe  $\pm$  SEM (sem.0 à sem.8 ND : n=18 ; HFHF : n=42 ; sem.9 à sem.16 n=12 ; sem.13 à sem.24 n=6).

t-test ND vs X : \* :  $p < 0,05$ . vs HFHF : \* 4<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  24<sup>ème</sup> sem.; vs HFHF Chou R : \* 9<sup>ème</sup> sem.; vs HFHF Cerise : \* 8<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  23<sup>ème</sup> sem. ; t-test HFHF vs HFHF Chou R :  $p < 0,05$  9<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  15<sup>ème</sup> sem.

« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Cerise.

En accord avec ces données, le régime HFHF chou rouge induit dans un premier temps (à 16 semaines) une baisse de la leptinémie chez les rats (Figure 4-66). Cependant, à 24 semaines, on observe une hyperleptinémie encore plus prononcée que celle induite par le régime HFHF seul (respectivement  $70,0 \pm 12,6$  ng/mL et  $40,1 \pm 1,5$  ng/mL ;  $p < 0,05$ ). En revanche, le régime HFHF cerise ne modifie pas l'hyperleptinémie par rapport au régime HFHF seul (respectivement à 24 semaines  $38,8 \pm 3,2$  et  $40,1 \pm 1,5$  ng/mL).



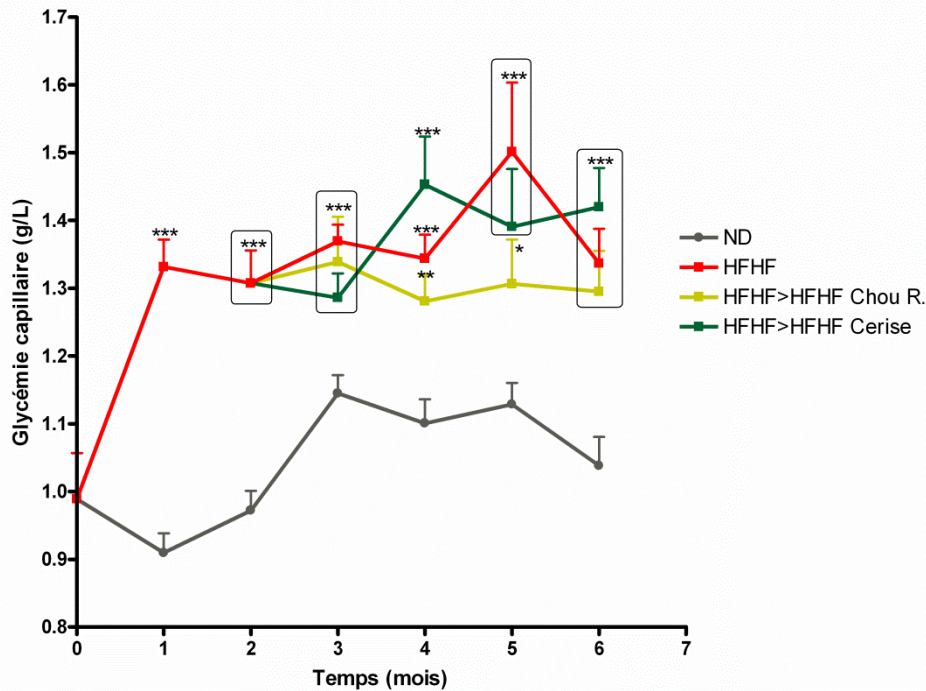
**Figure 4-66 : Evolution de la leptinémie à jeun - effet de l'approche nutraceutique**

Les valeurs de leptinémie à jeun des rats correspondent à la moyenne de chaque groupe  $\pm$  SEM (sem.0 à sem.8 ND : n=18 ; HFHF : n=42 ; sem.9 à sem.16 n=12 ; sem.13 à sem.24 n=6) (t-test ND vs. X : \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; t-test HFHF vs X : # :  $p < 0,05$ ).

« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Cerise.

#### 4.4.2.2.2.1.2 Impact sur la régulation glycémique ; tolérance au glucose et sécrétion d'insuline

L'hyperglycémie à jeun induit par le régime HFHF dès 4 semaines ( $1,33 \pm 0,4$  g/L ;  $p < 0,005$ ) n'est modifié ni par le chou rouge, ni par la cerise (Figure 4-67). En effet, une hyperglycémie à jeun, supérieure à 1,26 g/L, est définitivement installée dans les différents groupes HFHF à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine. Cette hyperglycémie est plus précoce que dans l'étude initiale de mise en place du modèle HFHF.



**Figure 4-67 : Evolution de la glycémie à jeun - effet de l'approche nutraceutique**

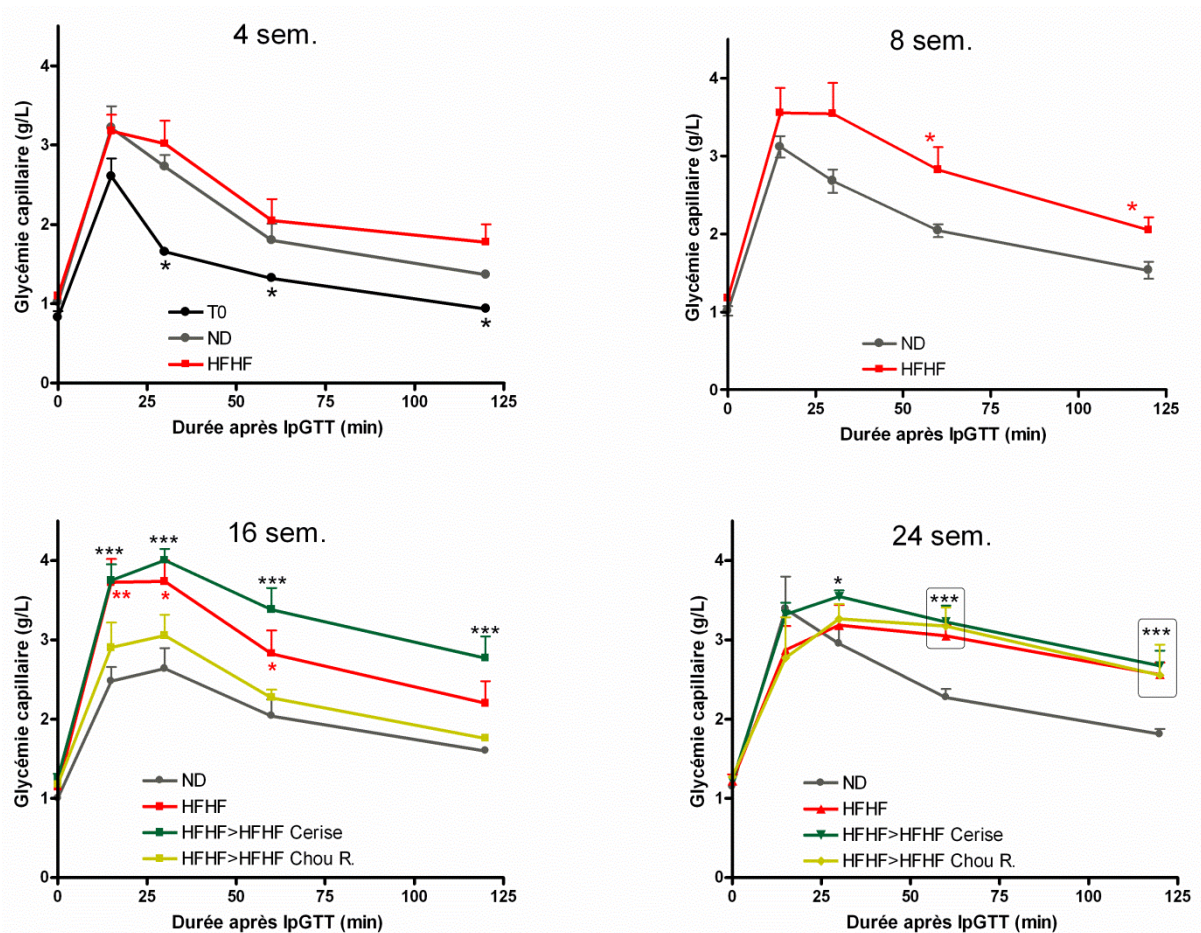
Les valeurs de glycémies à jeun obtenus par dosage RTU représentent la moyenne de chaque groupe  $\pm$  SEM (sem.0 à sem.8 ND : n=18 ; HFHF : n=42 ; sem.9 à sem.16 n=12 ; sem.13 à sem.24 n=6) (t-test ND vs X : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$ ).

« ND : normale diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » :  $T_0-T_8 = \text{HFHF}$  puis  $T_8-T_{24} = \text{HFHF Chou R}$  ; « HFHF>HFHF Cerise » :  $T_0-T_8 = \text{HFHF}$  puis  $T_8-T_{24} = \text{HFHF Cerise}$ .

Cependant, lors de l'étude de la tolérance au glucose par IpGTT, on observe une amélioration de la régulation glycémique à 16 semaines chez les rats HFHF Chou R par rapport aux rats HFHF (à  $T_{120}$  :  $1,76 \pm 0,1$  g/L ; vs. HFHF  $2,2 \pm 0,3$  g/L ; vs. ND  $1,6 \pm 0,1$  g/L) (Figure 4-68) alors qu'aucune amélioration n'est observée pour le régime HFHF cerise. Le suivi des glycémies post-IpGTT des rats HFHF Cerise au cours du temps démontre même des valeurs globalement plus élevées que celles des rats HFHF. De plus, la glycémie postprandiale des rats HFHF Cerise, 120 minutes après l'IpGTT, est supérieure à 2 g/L dès 16 semaines ( $t_{120}$  :  $2,77 \pm 0,3$  g/L), tout comme pour les rats HFHF, confirmant une intolérance au glucose, qui persiste à 24 semaines.

A plus long terme (24 semaines), plus aucun effet n'est observé chez les rats HFHF Chou R. Ainsi, l'ensemble de rats nourris au régime HFHF sont intolérants au glucose après 24 semaines : à  $T_{120}$  HFHF :  $2,56 \pm 0,15$  g/L ( $p < 0,005$ ) ; HFHF Chou R :  $2,56 \pm 0,35$  g/L ( $p < 0,005$ ) ; HFHF Cerise :  $2,67 \pm 0,19$  g/L ( $p < 0,005$ ).



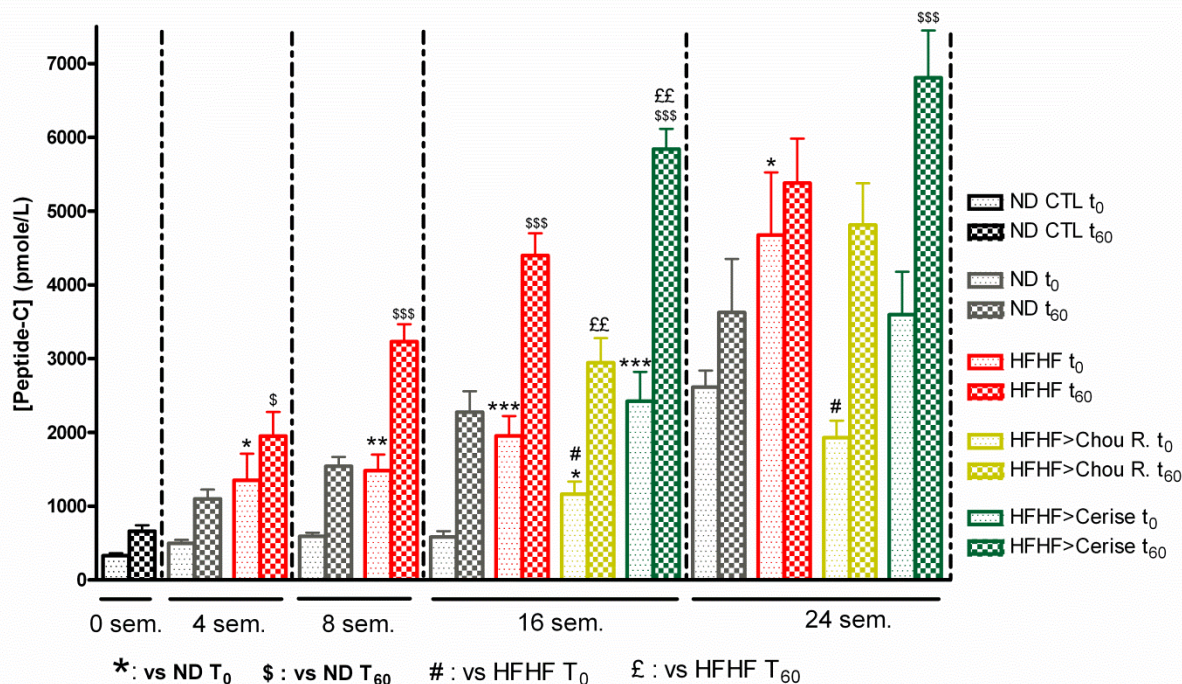


**Figure 4-68 : Evolution de la tolérance au glucose - effet de l'approche nutraceutique**

Evolution des glycémies capillaires durant un IpGTT à 4, 8, 16 et 24 semaines ; moyenne  $\pm$  SEM (n=6) (t-test ND vs X : \* < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,005).

« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Cerise.

L'hyperinsulinisme à jeun induit par le régime HFHF, est limité à partir 16 semaines chez les rats HFHF Chou R (à T<sub>0</sub> : 1163  $\pm$  173 pmole/L vs. HFHF à T<sub>0</sub> : 1945  $\pm$  267 pmole/L ; p<0,05), avec une faible augmentation à 24 semaines comparé aux HFHF (à T<sub>0</sub> : 1929  $\pm$  232 pmole/L vs. HFHF à T<sub>0</sub> : 4767  $\pm$  848 ; p<0,05) (Figure 4-69). L'insulinémie postprandiale des rats HFHF Chou R est uniquement diminuée à court terme (16 semaines) (à T<sub>60</sub> : 2944  $\pm$  335 pmole/L ; vs. HFHF à T<sub>60</sub> : 4398  $\pm$  299 pmole/L ; p<0,01). Pour les rats HFHF Cerise, aucune différence n'est observée par rapport aux rats HFHF pour l'insulinémie à jeun. De plus, l'hyperinsulinisme postprandial est aggravé à court terme (16 semaines) (5841  $\pm$  275 pmole/L vs. HFHF 4398  $\pm$  299 pmole/L ; p<0,01).



**Figure 4-69 : Evolution de la c-peptidémie - effet de l'approche nutraceutique**

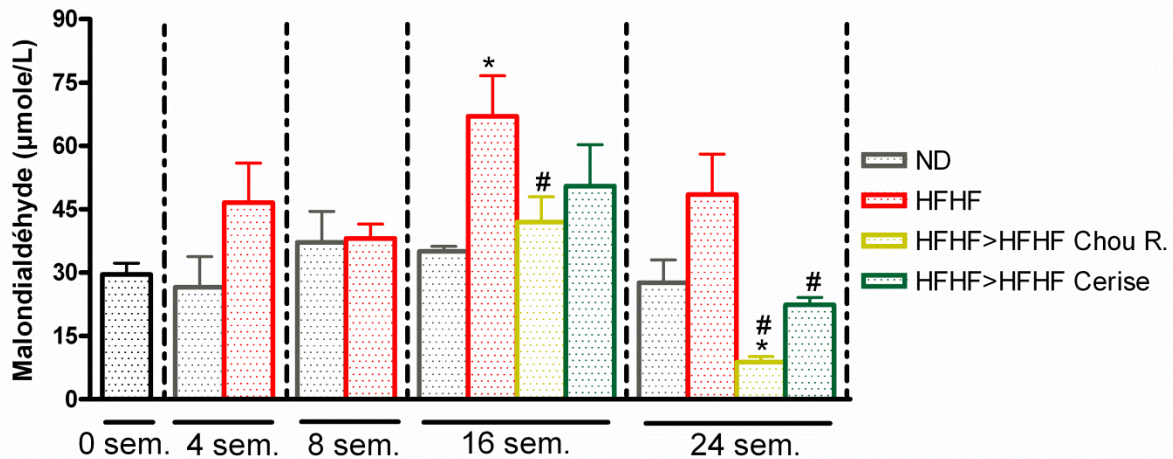
Les valeurs de c-peptidémie correspondent à la moyenne de chaque groupe  $\pm$  SEM (n=6) (t-test \*,\$,#,\$ :  $p < 0,05$  ; \*\*,\$\$,##,££ :  $p < 0,01$  ; \*\*\*,\$\$\$,###,£££ :  $p < 0,005$ ).

« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Cerise.

#### 4.4.2.2.2.1.3 Impact sur le stress oxydant

Les résultats du dosage du malondialdéhyde sérique, démontrent que l'important niveau de peroxydation lipidique induit par 16 semaines de régime HFHF, est significativement diminué chez les rats HFHF Chou R (à 16 sem. HFHF Chou R. : [MDA]=41,9  $\pm$  6,0  $\mu$ mole/L vs. HFHF : [MDA]=67,0  $\pm$  9,6  $\mu$ mole/L ;  $p < 0,05$ ) (Figure 4-70). De plus, à la 24<sup>ème</sup> semaine, le niveau de peroxydation lipidique des rats HFHF Chou R est significativement plus faible que celui du groupe ND (respectivement [MDA]=8,8  $\pm$  1,3  $\mu$ mole/L et [MDA]=27,6  $\pm$  5,4  $\mu$ mole/L ;  $p < 0,05$ ). Une diminution de la peroxydation lipidique est également observée pour les rats HFHF Cerise, mais cette différence est significative qu'après 24 semaines ([MDA]=22,4  $\pm$  1,73  $\mu$ mole/L ;  $p < 0,05$ ).



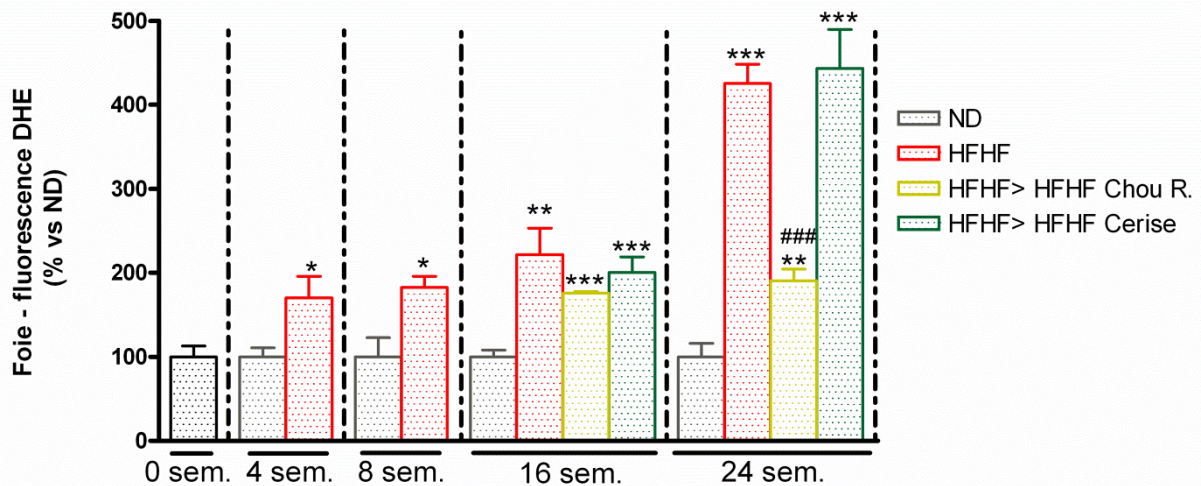


**Figure 4-70 : Evolution de la peroxydation lipidique - effet de l'approche nutraceutique**

Les concentrations de malondialdéhyde correspondent aux valeurs moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM (sem.0 à sem.8 ND : n=18 ; HFHF : n=42 ; sem.9 à sem.16 n=12 ; sem.13 à sem.24 n=6) (t-test ND vs X : \* : p < 0,05). « ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Cerise.

L'observation des coupes histologiques de foie marquées à la DHE révèlent que les rats HFHF Chou R présentent une diminution significative des niveaux de ROS par rapport aux rats HFHF (Figure 4-71 et 4-73). En effet, à 24 semaines, le niveau de fluorescence dans le foie est significativement plus bas pour les rats HFHF Chou R ( $191 \pm 13$  %) par rapport aux rats HFHF ( $425 \pm 23$  % ; p<0,005), mais est cependant 2 fois plus élevé que celle des rats ND (p<0,01). Cet effet est encore plus marqué dans le pancréas (Figure 4-72 et 4-74). En effet, à 16 et 24 semaines, le niveau de fluorescence des coupes de pancréas des rats HFHF Chou R est comparable à celui des rats contrôles ND (respectivement  $103 \pm 21$  % et  $99 \pm 12$  %).

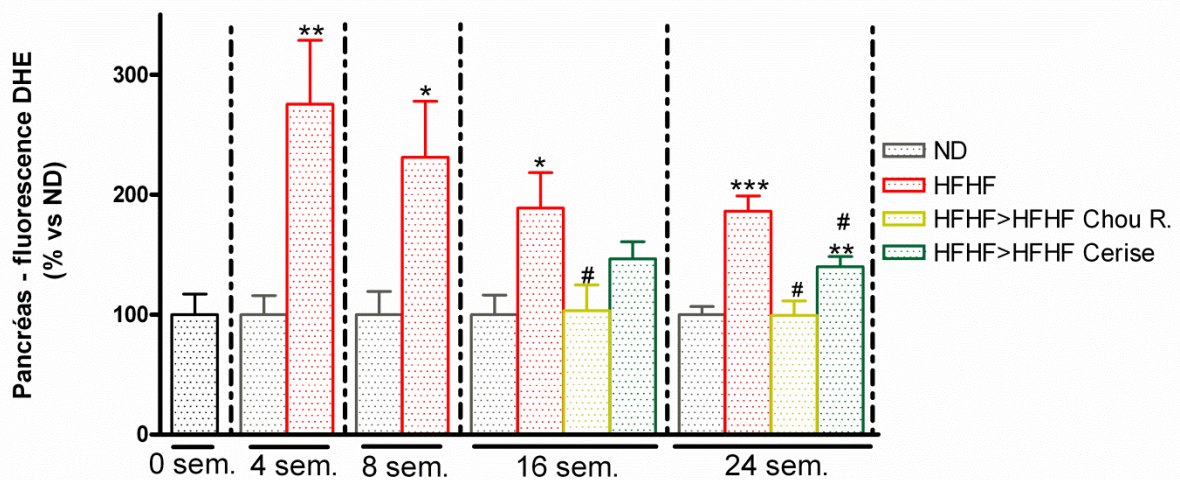
Au niveau hépatique, la supplémentation du régime HFHF en cerise n'a pas d'effet sur la production de ROS. En effet, les niveaux de fluorescence observés des coupes histologiques marquées à la DHE sont comparables à ceux des rats HFHF (à 24 semaines : HFHF Cerise :  $443 \pm 46$  % ; HFHF :  $425 \pm 23$  %). En revanche, la cerise permet une diminution du stress oxydant induit par le régime HFHF dans le pancréas à 24 semaines : (HFHF Cerise :  $140 \pm 8$  % ; HFHF :  $186 \pm 13$  % ; p<0,05), mais cette diminution est moins marquée que pour le chou rouge.



**Figure 4-71 : Evolution du stress oxydant hépatique - effet de l'approche nutraceutique**

Quantification de la fluorescence des coupes de foies après marquage à la DHE au temps 0, 4, 8, 16 et 24 semaines de l'étude. Les valeurs correspondent à la moyenne de fluorescence de chaque groupe  $\pm$  SEM. (n=6) (t-test ND vs. X : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; HFHF vs X : # :  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ### :  $p < 0,005$ ). Les rats ND servent de référence, le niveau de fluorescence des coupes histologiques est par défaut de 100 % à chaque temps de sacrifice.

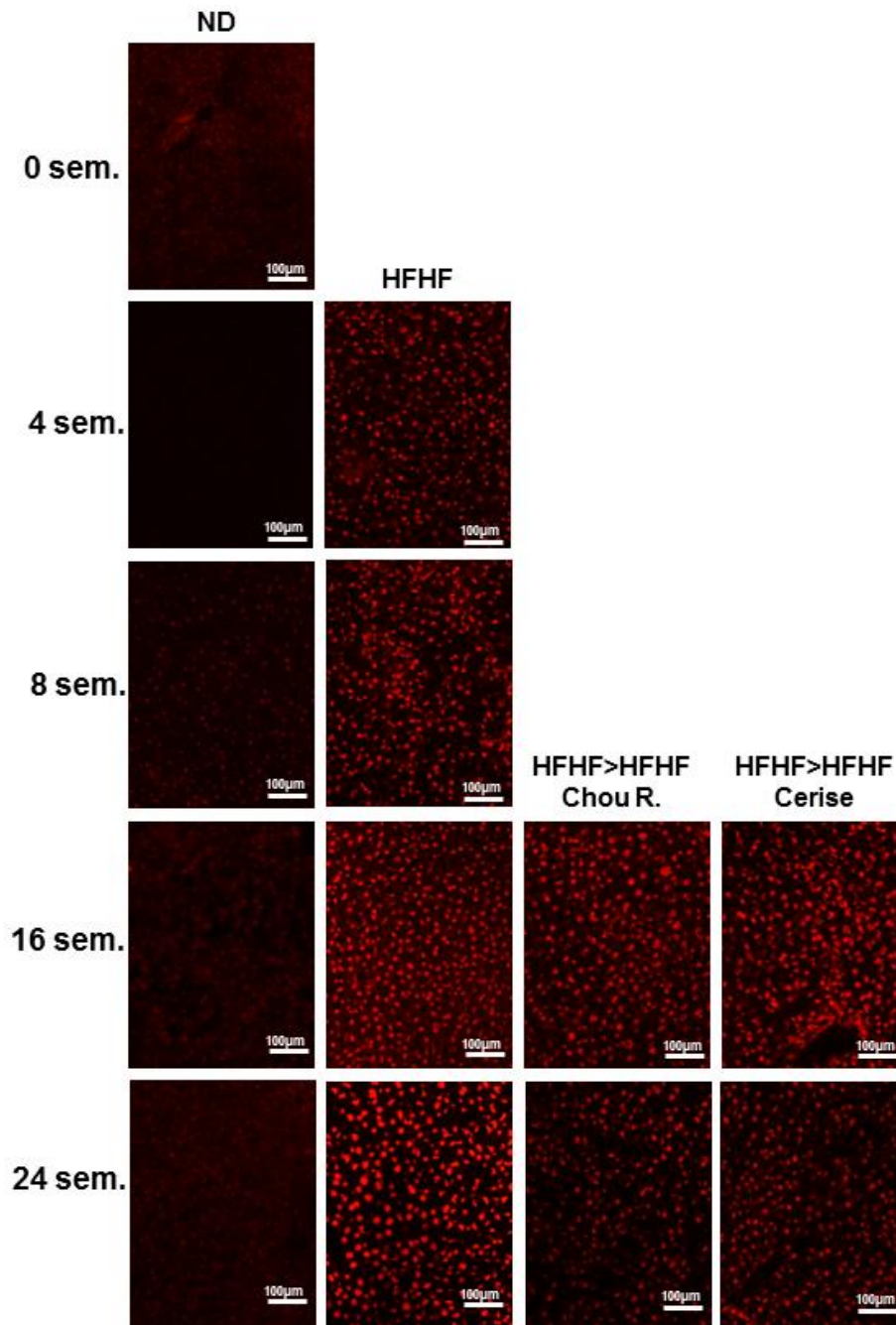
« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = HFHF Cerise.



**Figure 4-72 : Evolution du stress oxydant dans le pancréas - effet de l'approche nutraceutique**

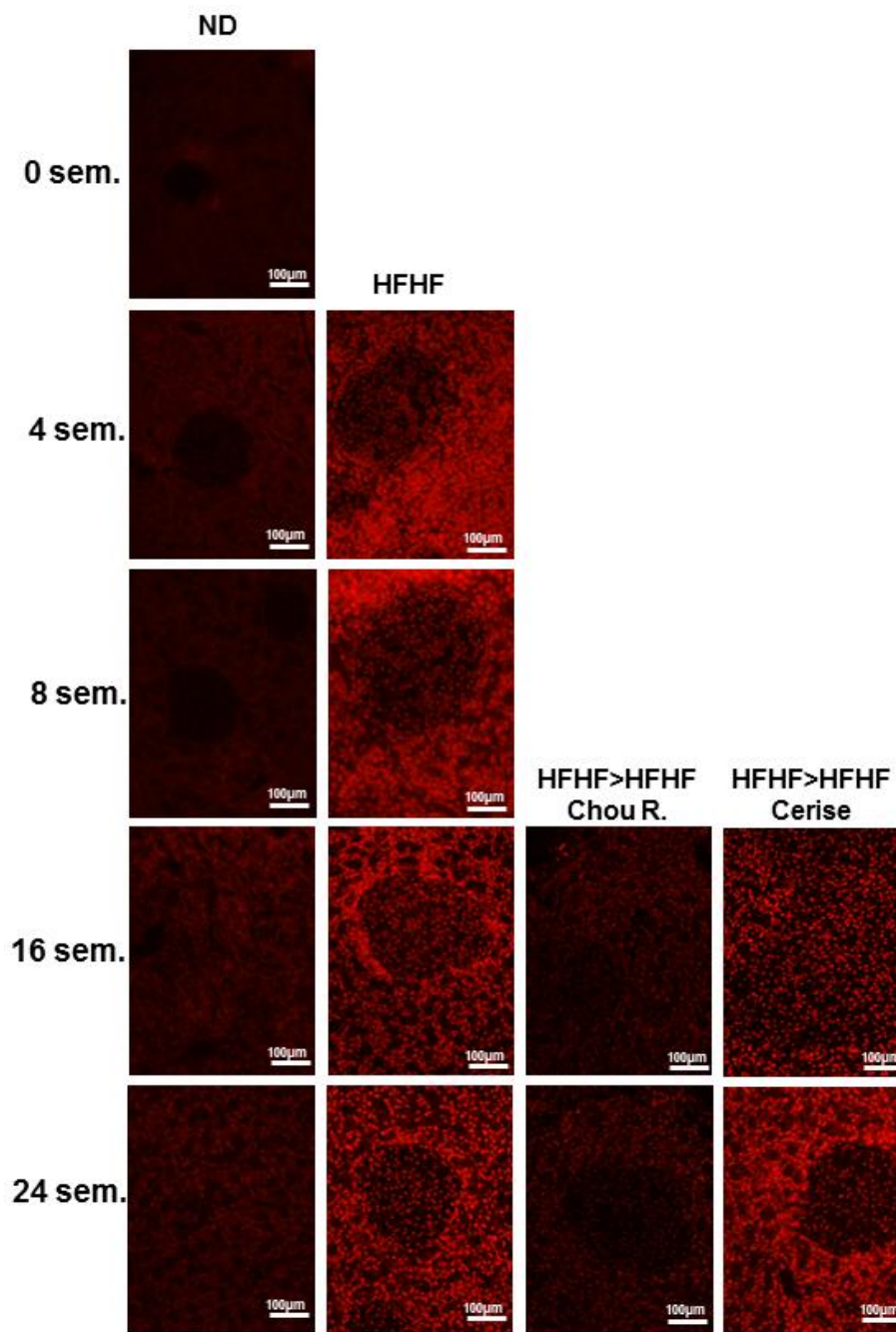
Quantification de la fluorescence des coupes de pancréas après marquage à la DHE au temps 0, 4, 8, 16 et 24 semaines de l'étude. Les valeurs correspondent à la moyenne de fluorescence de chaque groupe  $\pm$  SEM ; (n=6) (t-test ND vs. X : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; HFHF vs X : # :  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ### :  $p < 0,005$ ). Les rats ND servent de référence, le niveau de fluorescence des coupes histologiques est par défaut de 100 % à chaque temps de sacrifice.

« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = HFHF Cerise.



**Figure 4-73 : Evolution du stress oxydant hépatique - effet de l'approche nutraceutique**  
 « ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R. » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Cerise.



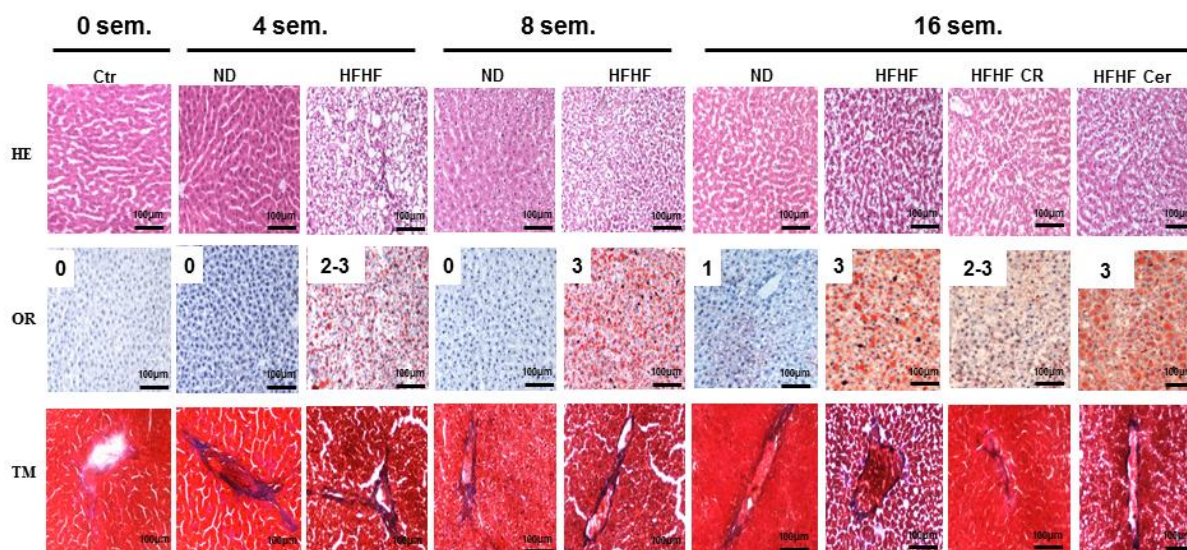


**Figure 4-74 : Evolution du stress oxydant dans le pancréas - effet de l'approche nutraceutique**

« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>HFHF Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Chou R ; « HFHF>HFHF Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Cerise.

#### 4.4.2.2.1.4 Observation histologiques

La structure du tissu hépatique des rats HFHF Chou R et HFHF Cerise est comparable aux rats HFHF à 16 semaines (Figure 4-75). En effet, les cellules présentent un gonflement, des noyaux en périphérie, ainsi qu'une quantité importante de gouttelettes lipidiques, quelque soit le régime HFHF. La stéatose hépatique induite par le régime HFHF est toutefois légèrement diminuée par la supplémentation par le chou rouge, démontrée par la coloration au RedOil, atteignant ainsi un score compris entre 2 et 3. La supplémentation du régime HFHF en cerise n'a aucun impact sur le développement de la stéatose hépatique (score 3 à 16 semaines).



**Figure 4-75 : Histologie hépatique - effet de l'approche nutraceutique**

Coupes histologiques de foie de rat après coloration à l'hématoxyline-éosine (HE), au RedOil (OR), et au trichrome de Masson (TM) aux temps 0, 4, 8 et 16 semaines de l'étude.

« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Chou R ; « HFHF Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = HFHF Cerise.

#### 4.4.2.2.1.5 Discussion

**Le chou rouge, et vraisemblablement les cyanidines qu'il renferme, a une action hyperleptinémiant associée à une diminution de la prise de poids chez le rat suivant un régime HFHF.** La supplémentation du régime HFHF en chou rouge induit une diminution de la prise de poids (à court terme), contrairement à la cerise. La cerise ne semble pas agir sur la leptinémie dans cette étude. Cependant, de manière surprenante, malgré le rôle majeur du chou rouge dans la diminution de la prise de poids des rats, ce dernier entraîne une hyperleptinémie très marquée. Il semble donc que la consommation de chou rouge associée au régime HFHF réduise la prise de masse grasse des animaux, tout en stimulant la fonction

sécrétrice de la leptine par le tissu adipeux (soit en accélérant la résistance à la leptine par l'altération de sa voie de transport). Ainsi, l'augmentation de la leptinémie induite par le chou rouge, palliant vraisemblablement les phénomènes de résistance à la leptine liés au régime HFHF, serait à l'origine de la diminution de la prise alimentaire. En effet, la leptine agit au niveau de l'hypothalamus et signale l'état nutritionnel général de l'organisme, qui lors d'une hyperleptinémie se traduit par la sensation de satiété (Elmqvist, Elias et Saper, 1999). La leptine agit également par stimulation des dépenses énergétiques. Les résultats suggèrent également que le chou rouge améliore légèrement la régulation glycémique dans les premières semaines, qui pourrait être liée au ralentissement de la prise de poids. En effet, l'intolérance au glucose s'installe de manière plus tardive que dans le régime HFHF non supplémenté, et seul un hyperinsulinisme postprandial a pu être observé. Tsuda et al. (2003) ont démontré dans un premier temps que les anthocyanes possèdent un rôle suppresseur du développement de l'obésité, normalisateur de l'hypertrophie adipocytaire et réducteur de l'hyperglycémie chez la souris HFD. Une seconde étude a précisé que les cyanidines (aglycones ou non) induisent une sur-excrétion d'adiponectine et de leptine par les adipocytes de rat isolés, (Tsuda et al 2004). De plus, cette étude démontre une activation de l'AMPK par les adipocytes en présence de cyanidines, malgré une diminution du ratio AMP/ATP. Ainsi, l'augmentation de la leptinémie au travers de l'activation directe de l'AMPK limiterait l'accumulation des acides gras. De plus, l'augmentation de l'adiponectinémie améliorerait la sensibilité à l'insuline. Etant donné l'importante teneur en cyanidines dans le chou rouge, démontrée précédemment, nous pouvons suggérer que le mécanisme d'action réduisant la prise de poids chez le rat HFHF est directement lié à l'hyperleptinémie induite par le chou rouge. Les polyphénols du chou rouge, et aux doses consommées par les rats, exerceraient donc une action inhibitrice vis-à-vis du développement de l'obésité, et amélioreraient la régulation de l'insulino-sécrétion. Toutefois, à terme et dans les conditions expérimentales choisies, cette supplémentation par le chou rouge n'a pas empêché l'installation de l'intolérance au glucose ni de l'hyperglycémie à jeun.

**La consommation de chou rouge réduit le stress oxydant de manière générale chez le rat suivant un régime HFHF.** En effet, la consommation quotidienne de chou rouge dans l'alimentation HFHF permet de réduire considérablement la peroxydation lipidique, de diminuer fortement les taux de ROS dans le foie et dans le pancréas. Cependant, malgré la réduction importante du niveau de production de ROS dans le foie, seule une faible diminution du score de stéatose est obtenue par la supplémentation du régime HFHF en chou

rouge. Ce sont vraisemblablement les nombreuses cyanidines piégeuses de radicaux libres qui sont responsables de ces effets. En effet, une étude a déjà pu mettre en évidence un rôle anti-inflammatoire pour la cyanidine-3-glucoside administrée quotidiennement chez la souris HFD liée à une inhibition de la sécrétion de cytokines inflammatoires (Guo et al., 2012). A cette action anti-inflammatoire, réduisant certainement le stress oxydant, est associée une légère réduction de l'incorporation des lipides dans le foie faisant reculer la stéatose hépatique. Par ailleurs, une action inhibitrice de la peroxydation lipidique dans le foie par les anthocyanes du chou rouge a été mise en évidence chez le rat nourri au paraquat, un inducteur de stress oxydant (Igarashi, Kimura et Takenaka, 2000). Ces résultats sont en accord avec notre étude, et suggèrent que les cyanidines du chou rouge peuvent donc exercer leur activité anti-radicalaire *in vivo*, et ce dans différentes localisations. Leur action serait cependant plus importante dans le pancréas étant donné l'absence totale de marqueur de stress oxydant malgré le régime HFHF. Parmi les stratégies thérapeutiques de la stéatose hépatique non compliquée sont souvent citées des approches visant à améliorer la sensibilité à l'insuline, à limiter l'inflammation du tissu adipeux, ou encore à réduire le stress oxydant (Schattenberg et Schuppan, 2011). La supplémentation du régime HFHF en chou rouge, permettant la diminution importante du stress oxydant hépatique, associée à une diminution de la stéatose hépatique, suggère en effet la possibilité thérapeutique des anti-oxydants. Dans les conditions expérimentales de l'étude, cet apport en anti-oxydants par la consommation de chou rouge n'est cependant pas suffisant pour réduire de manière très marquée le développement de cette complication hépatique induite par le régime HFHF.

**La supplémentation du régime HFHF par 10 % de lyophilisat de cerise n'a pas, ou peu d'effet anti-diabétique chez le rat.** En effet, aucune amélioration n'a pu être observée que ce soit que niveau de l'équilibre glycémique, de la tolérance au glucose, de l'insulinémie, ou de l'obésité. Or, une étude a démontré une action anti-diabétique de la cerise avec une réduction des glycémies à jeun (administration orale d'une dose de 200 mg/kg/jr pendant 30 jours d'un extrait éthanolique de cerise chez le rat diabétique induit par l'alloxane) (Lachin et Reza, 2012). Ceci suggère que dans le cas de notre étude, que la supplémentation du régime HFHF à hauteur de 10 % de lyophilisat de cerise ne permettrait pas d'apporter une dose quotidienne suffisante en cyanidines, ou que d'autres polyphénols comme les acides caféoylquiniques présents dans la cerise, pour être à l'origine d'une action anti-diabétique. De plus, le lyophilisat de cerise n'étant pas désucre dans notre étude, l'absence d'effet observé lors de la supplémentation en cerise du régime HFHF pourrait être lié à l'excès de sucre apporté par la

cerise (notamment en fructose). Cet apport supplémentaire de fructose par la cerise contrebalancerait ainsi les effets anti-diabétiques des polyphénols de cerise.

**La supplémentation d'un régime HFHF par la cerise permet cependant une réduction du stress oxydant chez le rat.** En effet, la peroxydation lipidique est réduite à un niveau similaire à celui des rats suivant un régime équilibré ND. De plus, la production de ROS dans le pancréas est diminuée, sans pour autant retrouver un niveau basal. En revanche, aucun effet n'est obtenu dans le foie que ce soit au niveau du stress oxydant, ou de la stéatose. Ces données suggèrent donc que les molécules anti-oxydantes présentes dans la cerise sont absorbées et sont capables d'exercer leur action anti-radicalaire *in vivo*, mais de manière plus localisée que celles du chou rouge. L'absence d'effet préventif de la cerise au niveau hépatique, s'explique vraisemblablement, comme décrit précédemment, par son index glycémique élevé qui masque ainsi les effets bénéfiques des polyphénols de cerise. Enfin, les cyanidines ne représentant qu'une partie des composés anti-radicalaires de la cerise, des différences de la biodisponibilité et de métabolisation des autres composés (acides phénoliques ; flavone) peuvent également expliquer les effets moins marqués pour la cerise. En effet, une faible absorption de l'acide chlorogénique (CQA) au niveau du système digestif a été démontrée après une administration orale chez le rat (Azuma et al., 2000).

Le chou rouge a ainsi révélée des effets anti-diabétiques à court terme, de par une baisse de la prise de poids associé à l'hyperleptinémie, une suppression de l'hyperinsulinisme à jeun, effets qui n'ont pu être observés pour la cerise. De plus, le chou rouge permet une meilleure prévention du stress oxydant que la cerise, de par une distribution plus large et une plus importante de ces effets. Cependant, même si la supplémentation de chou rouge permet de lutter contre les effets néfastes d'une mauvaise alimentation, à long terme elle n'empêche pas la progression de l'obésité vers l'installation du diabète et ses complications comme la stéatose hépatique. Une stratégie préventive du diabète limitée à une supplémentation en anti-oxydants ne semble donc pas suffisante, et renforce l'importance d'une meilleure hygiène alimentaire.

#### 4.4.2.2.2 Approche Hygiéno-diététique

Dans cette approche, nous avons étudié l'impact du changement de régime alimentaire HFHF à un régime ND supplémenté ou non en chou rouge ou en cerise, sur les paramètres physiques, métaboliques, oxydants et tissulaires.

Dans cette partie, nous appellerons les rats ayant changé d'un régime HFHF à un régime ND après 8 semaines « HFHF>ND ». Les rats ayant changé d'un régime HFHF à un régime ND supplémenté en chou rouge ou en cerise sont appelés « ND Chou R » et « ND Cerise » respectivement.

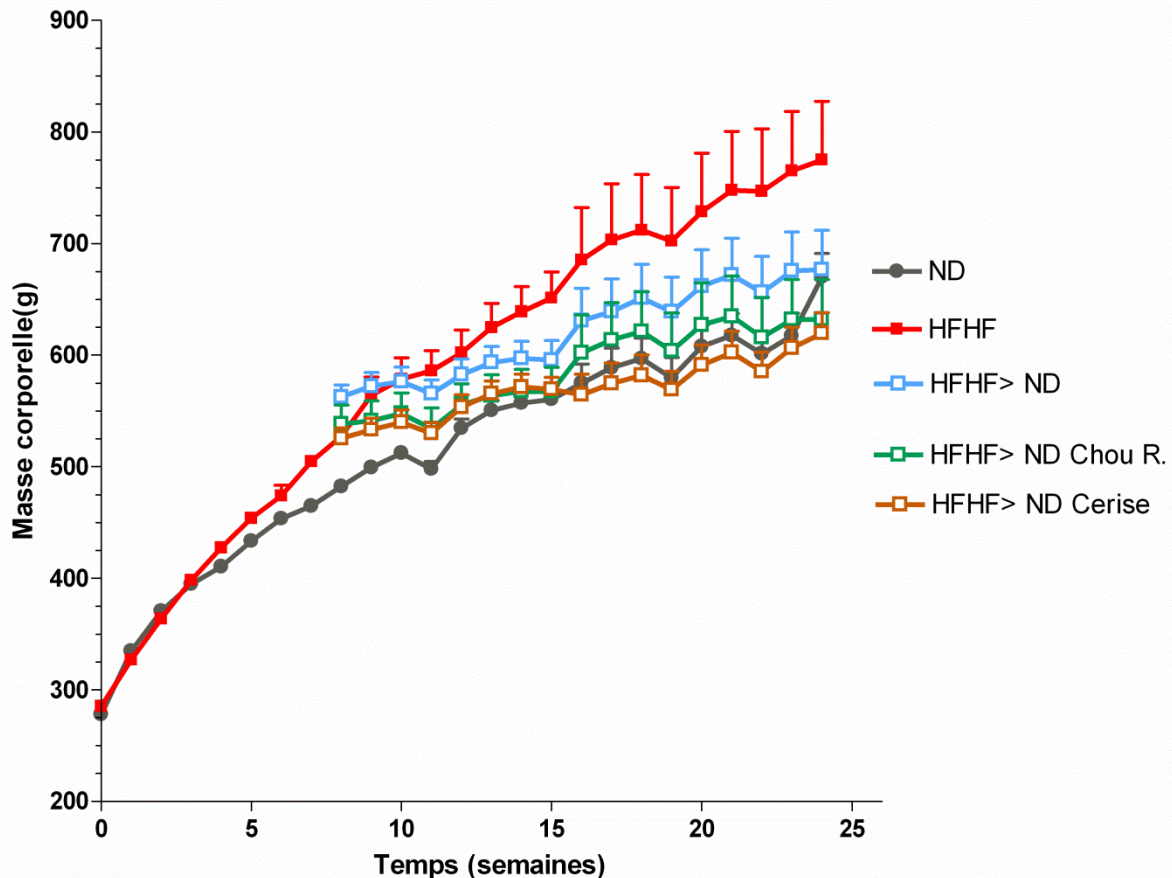
#### 4.4.2.2.2.1 *Impact sur le poids et la leptinémie*

Après le changement de régime alimentaire après 8 semaines de régime HFHF, les rats HFHF>ND ne montrent pas de différence significative en termes d'évolution de masse corporelle par rapport aux rats HFHF (Figure 4-76). En effet, l'importante variabilité inter-individuelle à partir de la 16<sup>ème</sup> semaine, due à la réduction de la taille des groupes, ne permet pas de distinguer significativement le poids des rats HFHF>ND par rapport à celui des rats HFHF ou celui des rats ND (à 16 sem. HFHF>ND :  $631 \pm 29$  g ; ND :  $575 \pm 60$  g ; HFHF :  $685 \pm 115$  g).

Les rats ND Cerise présentent une stabilisation du poids, et atteignent un poids moyen significativement inférieure à celui des rats HFHF, et comparable à celui des rats contrôle ND dès la 12<sup>ème</sup> semaine (ND Cerise :  $553 \pm 11$  g ; HFHF :  $602 \pm 21$  g ( $p < 0,05$ ); ND :  $534 \pm 10$  g). Cette stabilisation s'accroît tout au long de l'étude pour atteindre respectivement  $619 \pm 18$  g (ND Cerise) contre  $775 \pm 53$  g (HFHF ;  $p < 0,05$ ) et  $670 \pm 21$  g (ND ;  $p < 0,05$ ) à 24 semaines.

Un profil similaire est observé pour les rats ND Chou R, avec cependant une plus grande variabilité. En effet, le poids moyen de ces rats est significativement ( $p < 0,05$ ) inférieur à celui des rats HFHF entre la 13<sup>ème</sup> et la 15<sup>ème</sup> semaine. Mais de la 16<sup>ème</sup> à la 21<sup>ème</sup> semaine, aucune différence ne peut être notée entre les rats ND Chou R, HFHF ou ND. A la fin de l'étude, une tendance à la baisse du poids des rats ND Chou R par rapport aux rats HFHF est à nouveau observée (sem. 22 :  $p = 0,076$  ; sem. 23  $p = 0,064$ ), pour finalement être significative à 24 semaines ( $632 \pm 36$  g contre HFHF  $775 \pm 53$  g ;  $p < 0,05$ ).





**Figure 4-76 : Evolution de la masse corporelle - effet de l'approche hygiéno-diététique**

Poids moyens par groupe  $\pm$  SEM (n = 6). (sem.0 à sem.8 ND : n=18 ; HFHF : n=42 ; sem.9 à sem.16 n=12 ; sem.13 à sem.24 n=6)

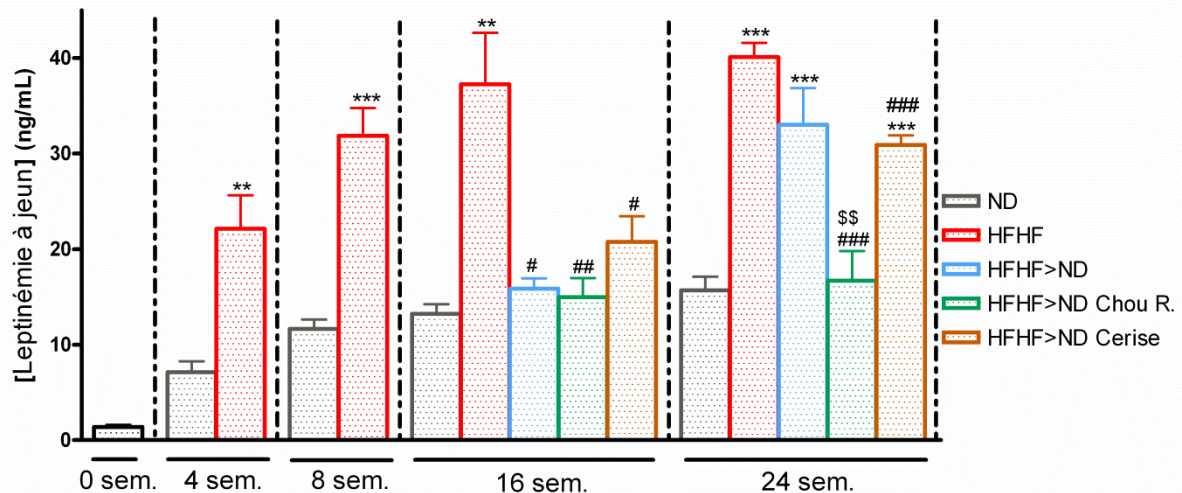
t-test ND vs X :  $p < 0,05$  vs HFHF : 4<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  24<sup>ème</sup> sem. ;  $p < 0,05$  vs HFHF>ND : 8<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  14<sup>ème</sup> sem. ;  $p < 0,05$  vs HFHF ND Chou R : 8<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  11<sup>ème</sup> sem. ;  $p < 0,05$  vs HFHF>ND Cerise : 8<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  11<sup>ème</sup> sem.

t-test HFHF vs X :  $p < 0,05$ . vs HFHF ND : 8<sup>ème</sup> sem. ;  $p < 0,05$  vs HFHF ND Chou R : 13<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  15<sup>ème</sup> sem. et 24<sup>ème</sup> sem. ;  $p < 0,05$  vs HFHF ND Cerise : 11<sup>ème</sup> sem.  $\rightarrow$  24<sup>ème</sup> sem.

« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND ; « HFHF>ND Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Chou R ; « HFHF>ND Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Cerise.

Le changement de régime alimentaire du régime HFHF au régime ND à partir de 8 semaines réduit significativement la leptinémie des rats à 16 semaines jusqu'à un niveau équivalent à celui des rats du groupe ND (HFHF>ND :  $15,9 \pm 1,1$  ng/mL ; vs ND :  $13,2 \pm 1,0$  ng/mL ; vs HFHF :  $37,2 \pm 5,4$  ng/mL :  $p < 0,05$ ) (Figure 4-77). Cependant, après 24 semaines, la leptinémie de ce groupe HFHF>ND est à nouveau augmentée à un niveau comparable à celui des rats HFHF ( $33,0 \pm 3,8$  ng/mL ; vs HFHF :  $40,1 \pm 1,5$  ng/mL). Une diminution de la concentration plasmatique de leptine est également observée chez les rats ND chou rouge ou ND cerise dès 16 semaines (ND Chou R :  $15,0 \pm 2,0$  :  $p < 0,01$  ; et ND Cerise :  $20,8 \pm 2,7$  ng/mL :  $p < 0,05$ ). Dans le groupe ND Chou R, cette concentration plasmatique basale de la leptinémie, c'est à dire comparable au rats ND, est maintenue à 24 semaines ( $16,7 \pm 3,1$

ng/mL : vs HFHF>ND  $p < 0,01$  ; vs HFHF  $p < 0,005$ ). En revanche, de manière similaire aux rats HFHF>ND, les rats ND Cerise présentent un accroissement de la leptinémie à 24 semaines ( $30,9 \pm 1,0$  ng/mL). Ainsi, la diminution du poids à 24 semaines pour les rats ND Chou R semble corrélée avec une diminution de la leptinémie. Par contre, malgré la stabilisation rapide et durable du poids des rats ND Cerise à une valeur comparable aux rats ND, celle-ci est associée à une hyperleptinémie.



**Figure 4-77 : Evolution de la leptinémie - effet de l'approche hygiéno-diététique**

Les valeurs de leptinémie à jeun des rats correspondent à la moyenne de chaque groupe  $\pm$  SEM (sem.0 à sem.8 ND : n=18 ; HFHF : n=42 ; sem.9 à sem.16 n=12 ; sem.13 à sem.24 n=6) (t-test ND vs. X : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; t-test HFHF vs X : # :  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ### :  $p < 0,005$  ; t-test HFHF>ND vs X : \$\$  $p < 0,01$ ).

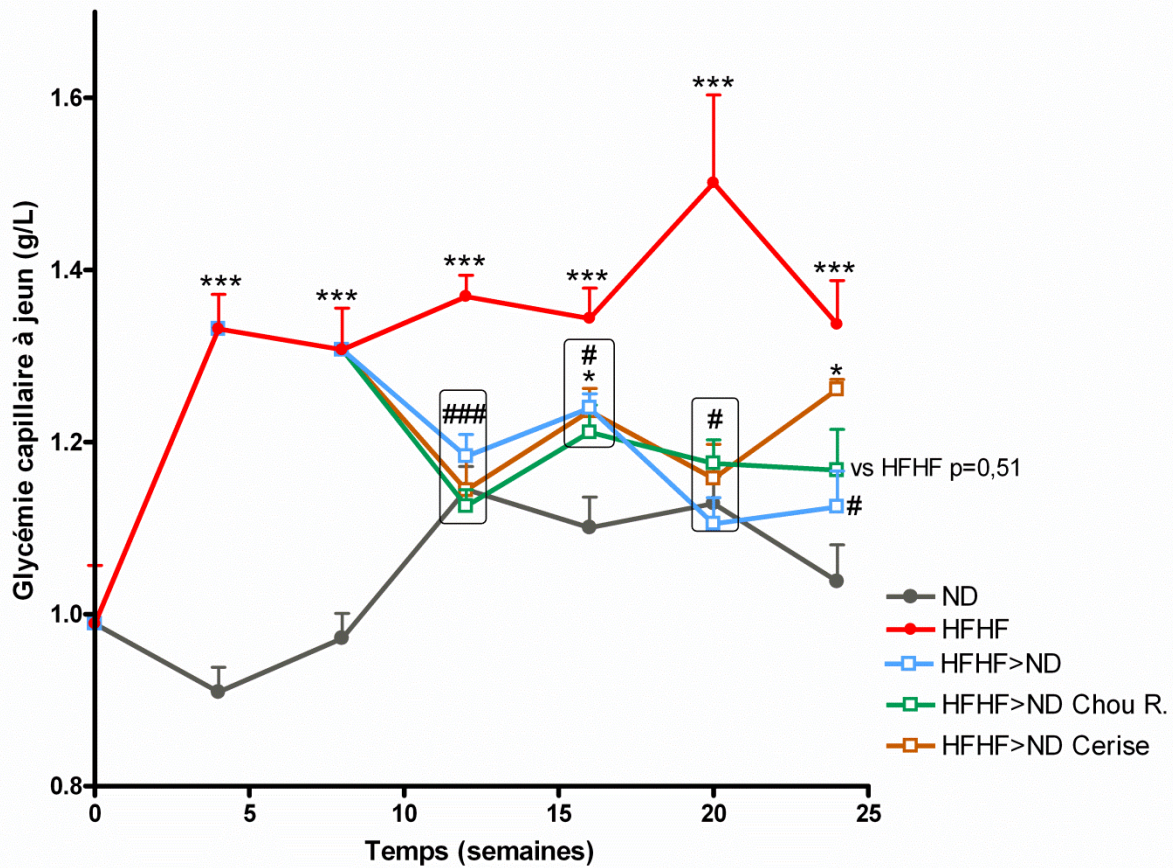
« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = ND ; « HFHF>ND Chou R » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = ND Chou R ; « HFHF>ND Cerise » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = ND Cerise.

#### 4.4.2.2.2.2 Impact sur la régulation glycémique, la tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline

Le changement de régime alimentaire à un régime ND (supplémenté ou non) entraîne un retour à des glycémies normales à 12 semaines, comparable à celui des rats contrôles ND (HFHF>ND :  $1,18 \pm 0,4$  g/L ; ND Chou R :  $1,12 \pm 0,03$  g/L ; ND Cerise :  $1,14 \pm 0,6$  g/L vs. ND  $1,14 \pm 0,05$  g/L ; vs HFHF :  $1,33 \pm 0,05$  g/L :  $p < 0,005$ ) (Figure 4-78). Paradoxalement, une augmentation significative transitoire est obtenue pour ces 3 groupes à 16 semaines (vs ND :  $p < 0,05$  ; vs HFHF :  $p < 0,05$ ). A 24 semaines, seuls les rats HFHF>ND maintiennent une glycémie à jeun significativement inférieure à celle des rats HFHF (HFHF>ND :  $1,12 \pm 0,10$  g/L vs HFHF :  $1,34 \pm 0,05$  g/L  $p < 0,05$ ), contrairement aux rats ND Cerise. En effet, la glycémie à jeun des rats ND Cerise est significativement augmentée à 24 semaines ( $1,26 \pm 0,01$  g/L ; vs ND :  $p < 0,05$ ), et se rapproche des glycémies des rats HFHF ( $1,34 \pm 0,05$  g/L).



Pour les rats ND Chou R, on observe une tendance à la diminution de la glycémie par rapport à celle des rats HFHF (ND Chou :  $1,17 \pm 0,04$  g/L ;  $p=0,051$ )



**Figure 4-78 : Evolution de la glycémie à jeun - effet de l'approche hygiéno-diététique**

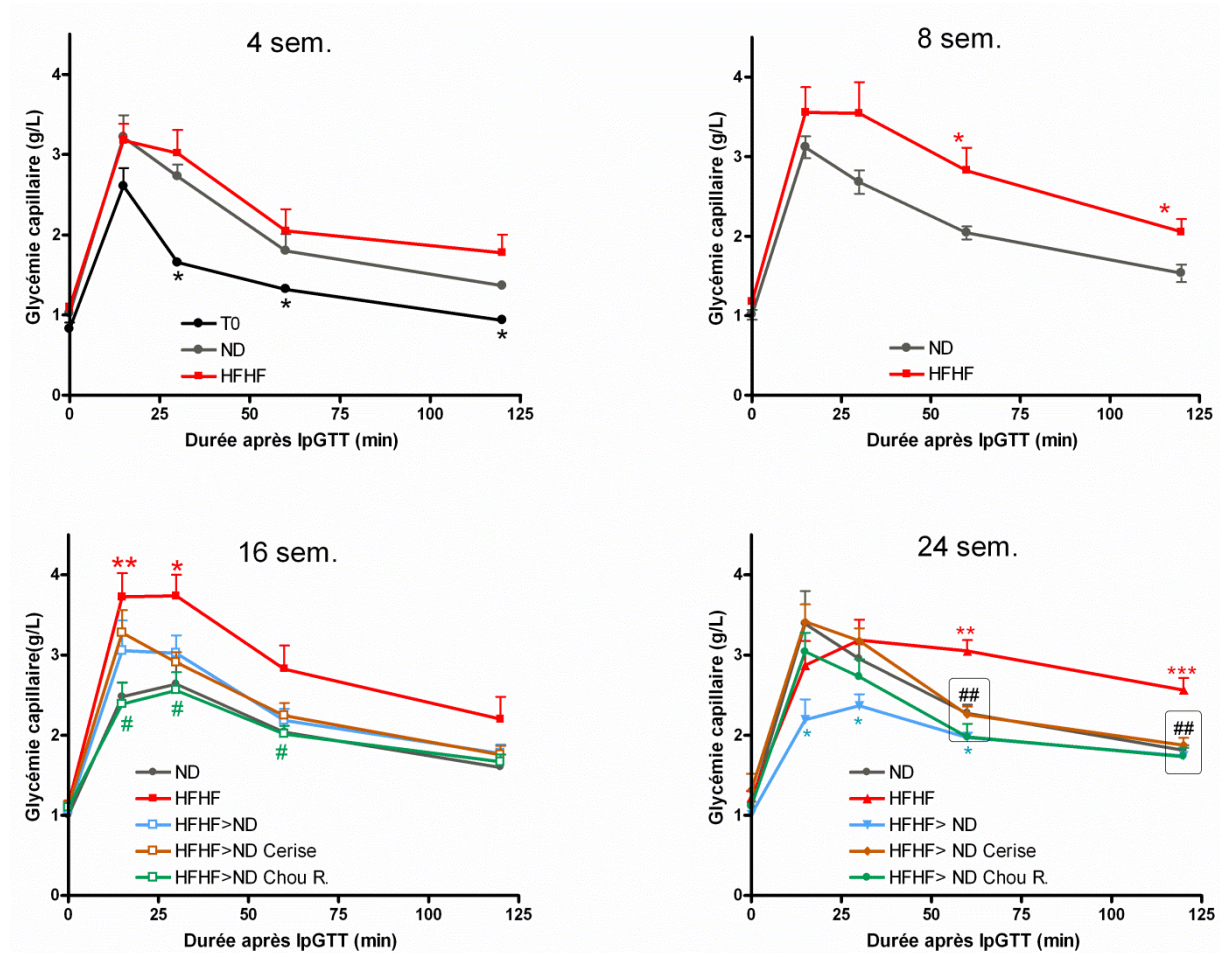
Les valeurs de glycémies à jeun obtenus par dosage RTU représentent la moyenne de chaque groupe  $\pm$  SEM (sem.0 à sem.8 ND : n=18 ; HFHF : n=42 ; sem.9 à sem.16 n=12 ; sem.13 à sem.24 n=6) (t-test ND vs X : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$ ).

« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » :  $T_0-T_8 =$  HFHF puis  $T_8-T_{24} =$  ND ; « HFHF>ND Chou R » :  $T_0-T_8 =$  HFHF puis  $T_8-T_{24} =$  ND Chou R ; « HFHF>ND Cerise » :  $T_0-T_8 =$  HFHF puis  $T_8-T_{24} =$  ND Cerise.

Le changement de régime alimentaire conduit chez les rats HFHF>ND à une absence d'intolérance au glucose à 24 semaines de par une glycémie post-IpGTT de  $1,74 \pm 0,10$  g/L (vs HFHF :  $2,56 \pm 0,15$  g/L ;  $p < 0,01$ ) (Figure 4-79).

Les rats ND Chou R. présentent une régulation glycémique améliorée dès 16 semaines : les glycémies sont significativement inférieures à celles des rats HFHF à 15, 30 et 60 minutes après l'IpGTT. 24 semaines après le début de l'étude, une augmentation importante de la glycémie est observée pour l'ensemble des groupes hormis les rats HFHF>ND 15 minutes après l'IpGTT. Cependant, les glycémies post-IpGTT restent

inférieures à 2,0 g/L (à T<sub>120</sub> : ND : 1,60 ± 0,05 g/L ; ND Chou R : 1,67 ± 0,09 g/L ; ND Cerise : 1,75 ± 0,12 g/L vs HFHF 2,20 ± 0,28 g/L ; p<0,01).



**Figure 4-79 : Evolution de la tolérance au glucose - effet de l'approche hygiéno-diététique**

Evolution des glycémies capillaires durant un IpGTT à 4, 8, 16 et 24 semaines (n = 6 ; moyenne ± SEM).

16 sem. : t-test à T<sub>30</sub> HFHF vs HFHF ND Cerise: p < 0,05 ; de T<sub>15</sub> et T<sub>60</sub> HFHF vs HFHF ND Chou R: p < 0,05

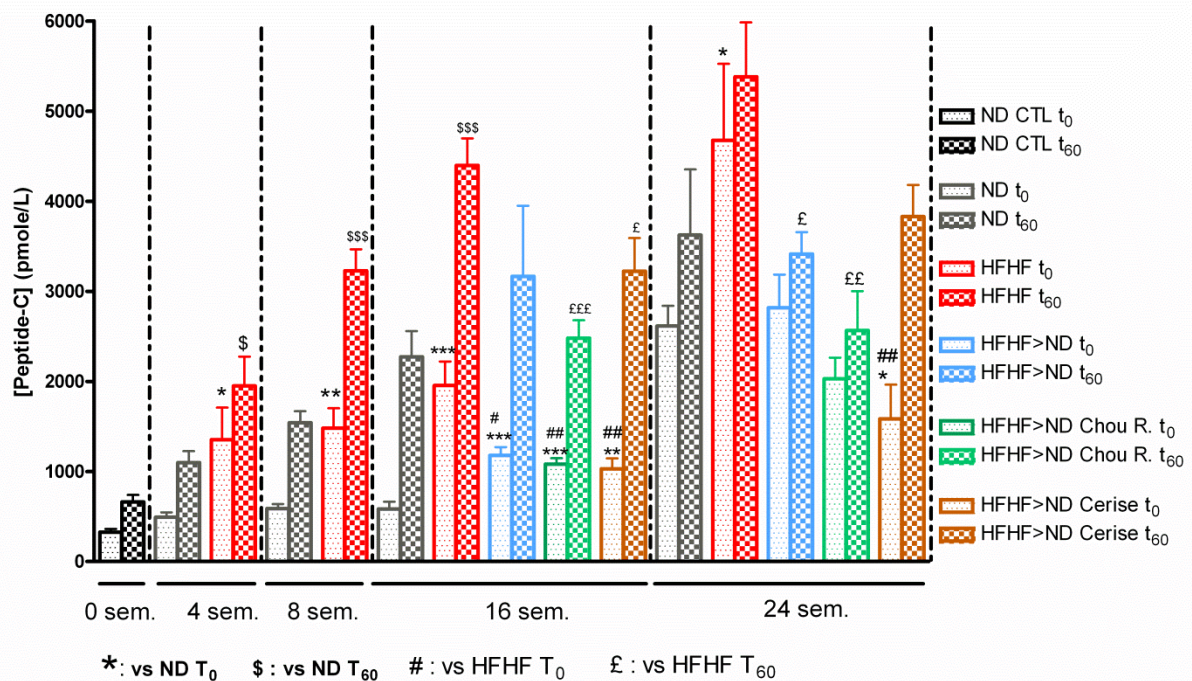
24 sem. : t-test à T<sub>60</sub> et T<sub>120</sub> HFHF ND, HFHF Chou R et HFHF ND Cerise vs HFHF : p < 0,05

« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND ; « HFHF>ND Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Chou R ; « HFHF>ND Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Cerise.

Le régime HFHF, comme démontré précédemment, induit un hyperinsulinisme à jeun et post-IpGTT dès 4 semaines, qui s'accroît jusqu'à 24 semaines (Figure 4-80). Le changement du régime HFHF à un régime ND, ND Chou R. ou ND Cerise induit à 16 semaines une diminution de l'hyperinsulinisme à jeun, comme le démontrent leur c-peptidémies (respectivement 1179 ± 91 pmole/L p<0,05 ; 1081 ± 69 pmole/L p<0,01 et 1029 ± 118 pmole/L p<0,01). Cependant, la diminution de la c-peptidémie post-IpGTT n'est significative que pour les rats ND Chou R et ND Cerise (respectivement à T<sub>60</sub> : 2479 ± 198



pmole/L  $p < 0,005$ ;  $3222 \pm 368$  pmole/L  $p < 0,05$  ; vs. HFHF  $4398 \pm 299$  pmole/L). A 24 semaines, aucune différence significative n'est observée entre les rats ND, HFHF> ND et ND Chou R. Seuls les rats ND Cerise présentent une insulinémie à jeun inférieure au groupe contrôle ND (à T<sub>0</sub>  $1583 \pm 381$  pmole/L vs. ND à T<sub>0</sub>  $2615 \pm 225$  pmole/L ;  $p < 0,05$ ). Le changement de régime alimentaire à un régime ND (supplémenté ou non) permet donc un retour à une insulino-sécrétion comparable à celle des rats contrôles ND.



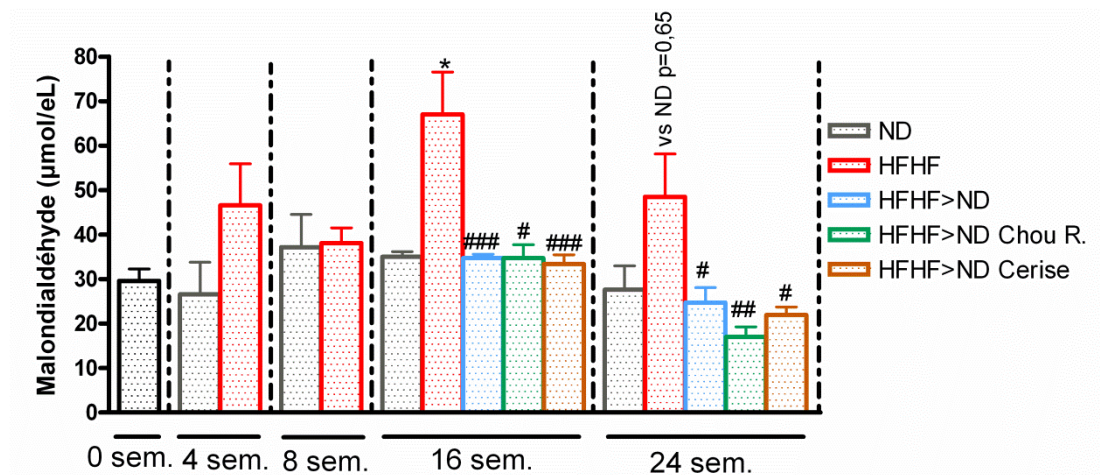
**Figure 4-80 : Evolution de la c-peptidémie - effet de l'approche hygiéno-diététique**

Les valeurs de c-peptidémie correspondent à la moyenne de chaque groupe  $\pm$  SEM (n=6) (t-test \*,\$,#,\$ :  $p < 0,05$  ; \*\*, \$\$, ##, ££ :  $p < 0,01$  ; \*\*\*, \$\$\$, ###, \$\$\$ :  $p < 0,005$ ).

« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND ; « HFHF>ND Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Chou R ; « HFHF>ND Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Cerise.

#### 4.4.2.2.2.3 Impact sur le stress oxydant

Le changement d'alimentation, du régime HFHF à un régime ND, induit une diminution de la peroxydation lipidique dès 16 semaines ([MDA]=  $34,7 \pm 0,9$   $\mu$ mole/L), pour atteindre un niveau comparable à celui des rats contrôles ND ([MDA]= $35,0 \pm 1,1$   $\mu$ mole/L ; vs HFHF :  $67,0 \pm 9,6$   $\mu$ mole/L  $p < 0,005$ ) (Figure 4-81). Ce niveau basal de peroxydation lipidique est ainsi maintenu jusqu'à 24 semaines dans ce groupe (HFHF>ND :  $24,8 \pm 3,3$   $\mu$ mole/L vs ND :  $27,6 \pm 5,4$   $\mu$ mole/L). La supplémentation du régime ND par le chou rouge ou la cerise n'induit pas de modification de la peroxydation lipidique comparé aux rats ND et HFHF>ND à 16 ou 24 semaines, (à 24 semaines ND Chou R :  $17,0 \pm 2,3$   $\mu$ mole/L et ND Cerise  $21,9 \pm 1,8$   $\mu$ mole/L).



**Figure 4-81 : Evolution de la peroxydation lipidique - effet de l'approche hygiéno-détériétique**

Les concentrations de malondialdéhéde correspondent aux valeurs moyennes de chaque groupe  $\pm$  SEM (sem.0 à sem.8 ND : n=18 ; HFHF : n=42 ; sem.9 à sem.16 n=12 ; sem.13 à sem.24 n=6) (t-test ND vs X : \* : p < 0,05 ; t-test HFHF vs X : # p<0,05 et ## p<0,005).

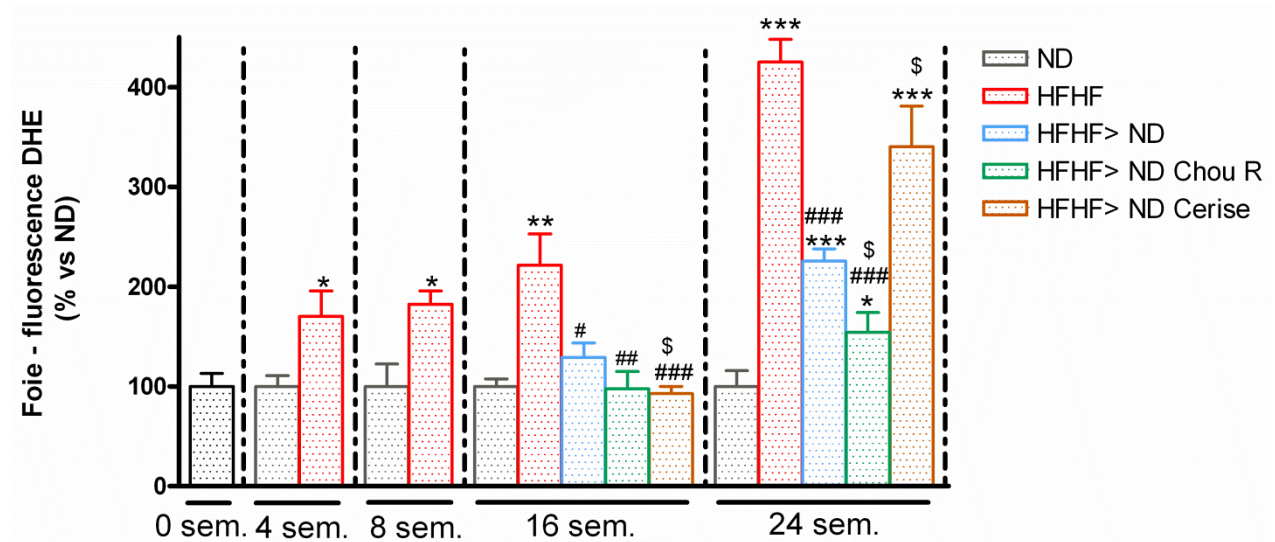
« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND ; « HFHF>ND Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Chou R ; « HFHF>ND Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Cerise.

Le changement du régime HFHF au régime ND induit, à 16 semaines, une réduction de la production de ROS dans le foie ( $129 \pm 14$  % ; vs HFHF  $221 \pm 31$  % p<0,05). Cependant, à 24 semaines la production de ROS dans le foie est significativement augmenté par rapport aux ND (HFHF>ND :  $226 \pm 12$  %, p<0,005) mais reste significativement inférieure aux rats HFHF (HFHF :  $425 \pm 23$  % ; p<0,005). Les rats ND Chou R et ND Cerise présentent à 16 semaines un niveau basal de fluorescence comparable à celui des rats ND (ND Chou R. :  $98 \pm 17$  % vs ND ; ND Cerise :  $93 \pm 7$  % vs ND) (Figure 4-82 et 4-84). A 24 semaines, la production de ROS est significativement augmentée pour les rats ND Chou R par rapport aux rats contrôles ND ( $154 \pm 20$  % ; p<0,05), mais reste significativement inférieure à celle des rats HFHF ( $425 \pm 23$  % ; p<0,01) et des rats HFHF>ND (p<0,05).

A l'opposé, la supplémentation du régime ND par la cerise provoque à termes (24 semaines) une production de ROS plus importante que les rats HFHF>ND ( $341 \pm 41$  % ; p<0,05), en atteignant un taux comparable à celui induit par le régime HFHF.

Dans le pancréas, le changement de régime HFHF à un régime ND supplémentation ou non en chou rouge, résulte, à 16 semaines, en un retour à un niveau basal de fluorescence, comparable aux rats ND (ND Chou R :  $92 \pm 13$  % ; HFHF>ND :  $106 \pm 27$  %) (Figure 4-83 et 4-85). Cependant, à 24 semaines, seuls les rats ND Chou R. maintiennent un statut oxydatif très bas dans le pancréas ( $66 \pm 16$  %), contrairement aux rats HFHF>ND pour lesquels la production de ROS est significativement augmentée ( $147 \pm 15$  % ; p<0,05).

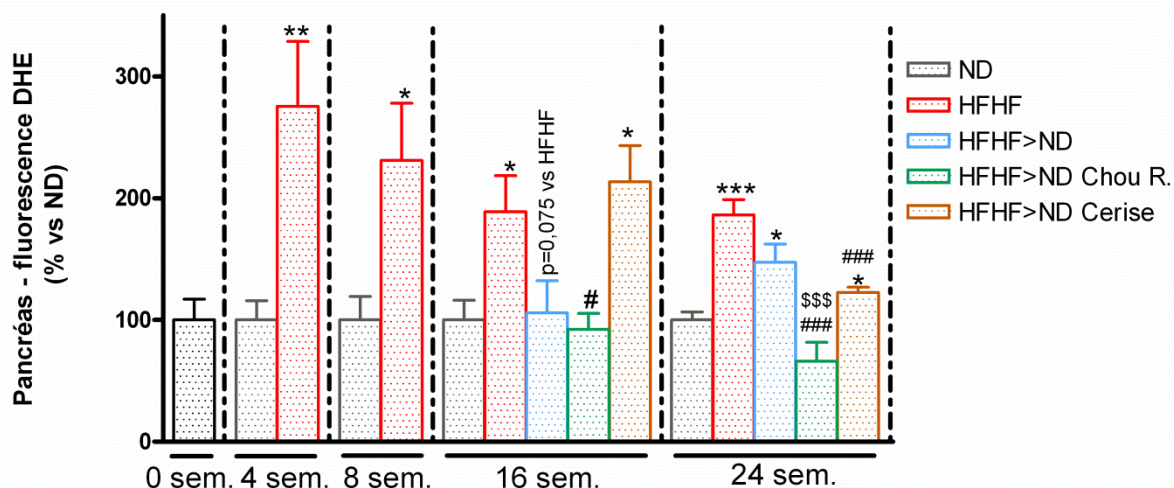
Dans le cas d'une supplémentation du régime ND par la cerise, après induction d'un stress oxydant pancréatique par un régime HFHF pendant 8 semaines, le niveau de fluorescence cellulaire moyen ne baisse qu'à partir de 24 semaines ( $123 \pm 5\%$  ;  $p < 0,005$  vs. HFHF).



**Figure 4-82 : Evolution du stress oxydant hépatique - effet de l'approche hygiéno-diététique**

Quantification de la fluorescence des coupes de foies après marquage à la DHE. Les valeurs correspondent à la moyenne de fluorescence de chaque groupe  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) (t-test ND vs. X : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; t-test HFHF vs X : # :  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ### :  $p < 0,005$  ; t-test HFHF>ND vs X : \$ :  $p < 0,05$ ). Les rats ND servent de référence, le niveau de fluorescence des coupes histologiques est par défaut de 100 % à chaque temps de sacrifice.

« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = ND ; « HFHF>ND Chou R » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = ND Chou R ; « HFHF>ND Cerise » :  $T_0$ - $T_8$  = HFHF puis  $T_8$ - $T_{24}$  = ND Cerise.

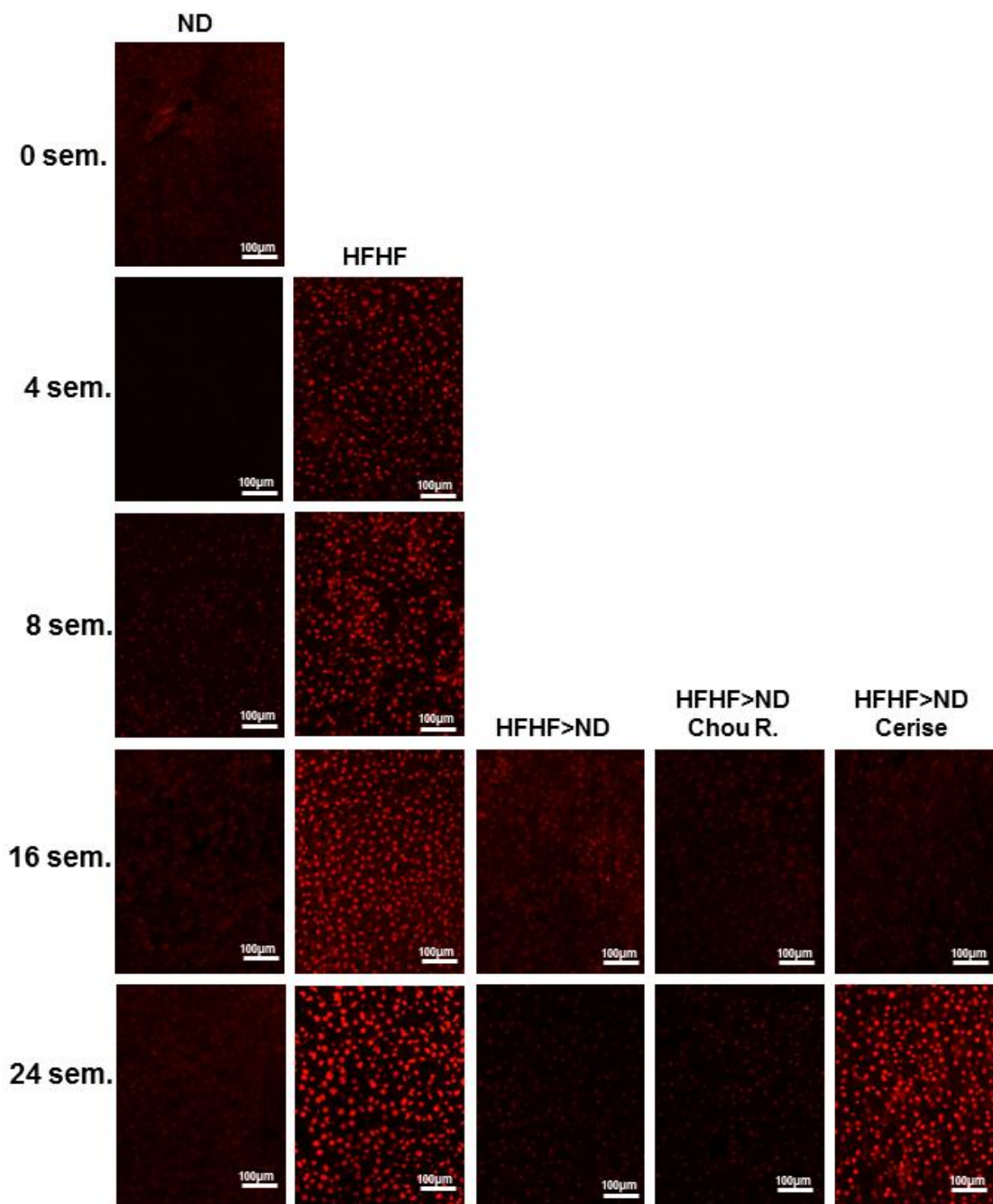


**Figure 4-83 : Evolution du stress oxydant dans le pancréas - effet de l'approche hygiéno-dietétique**

Quantification de la fluorescence des coupes de pancréas après marquage à la DHE. Les valeurs correspondent à la moyenne de fluorescence de chaque groupe  $\pm$  SEM (n = 6) (t-test ND vs. X : \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,005 ; t-test HFHF vs X : # : p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### : p < 0,005 ; t-test HFHF>ND vs X : \$\$\$ : p < 0,005). Les rats ND servent de référence, le niveau de fluorescence des coupes histologiques est par défaut de 100 % à chaque temps de sacrifice.

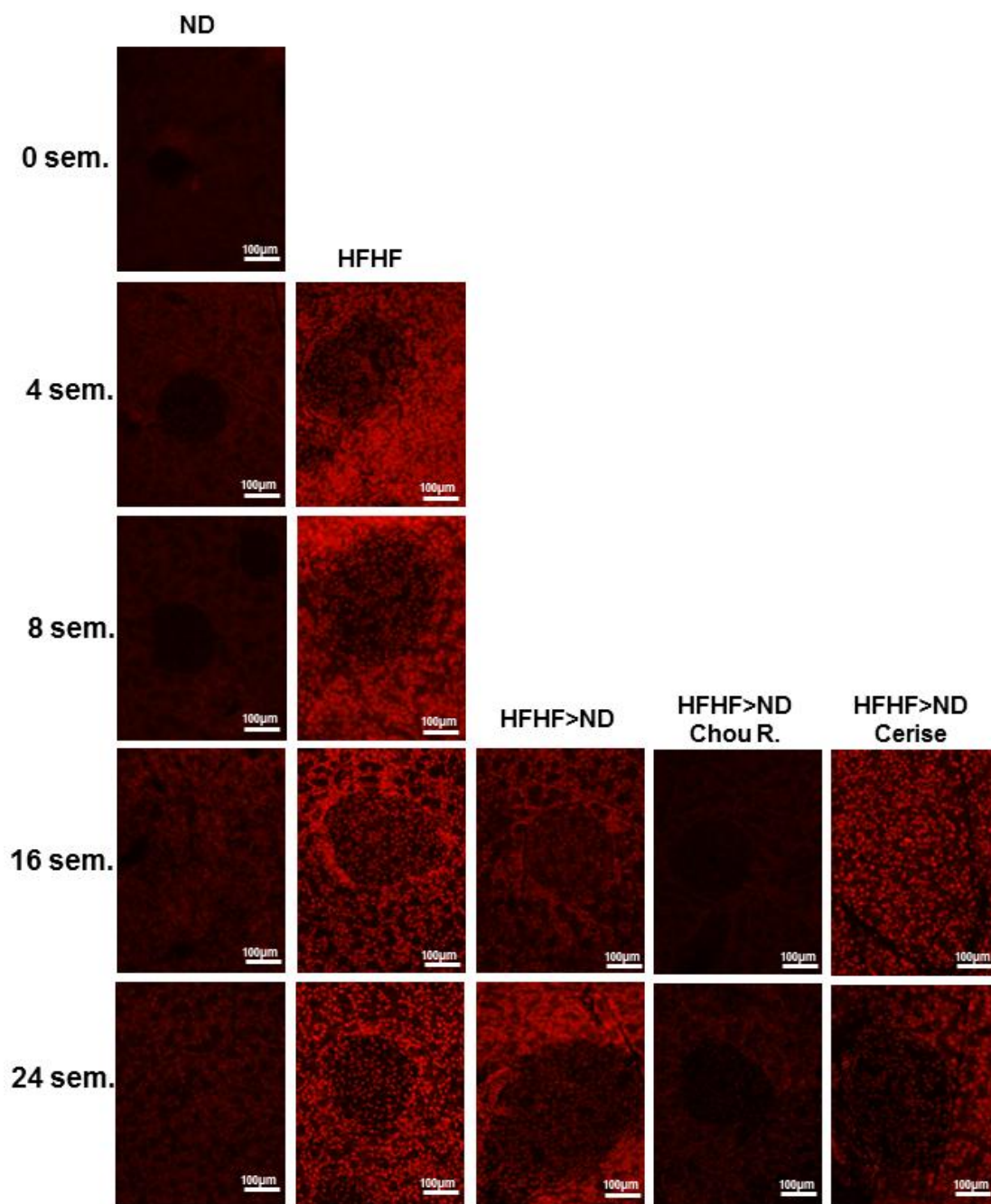
« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND ; « HFHF>ND Chou R » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Chou R ; « HFHF>ND Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Cerise.





**Figure 4-84 : Evolution du stress oxydant hépatique - effet de l'approche hygiéno-dététique**

« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND ; « HFHF>ND Chou R. » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Chou R. ; « HFHF>ND Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Cerise.



**Figure 4-85 : Evolution du stress oxydant dans le pancréas - effet de l'approche hygiéno-diététique**

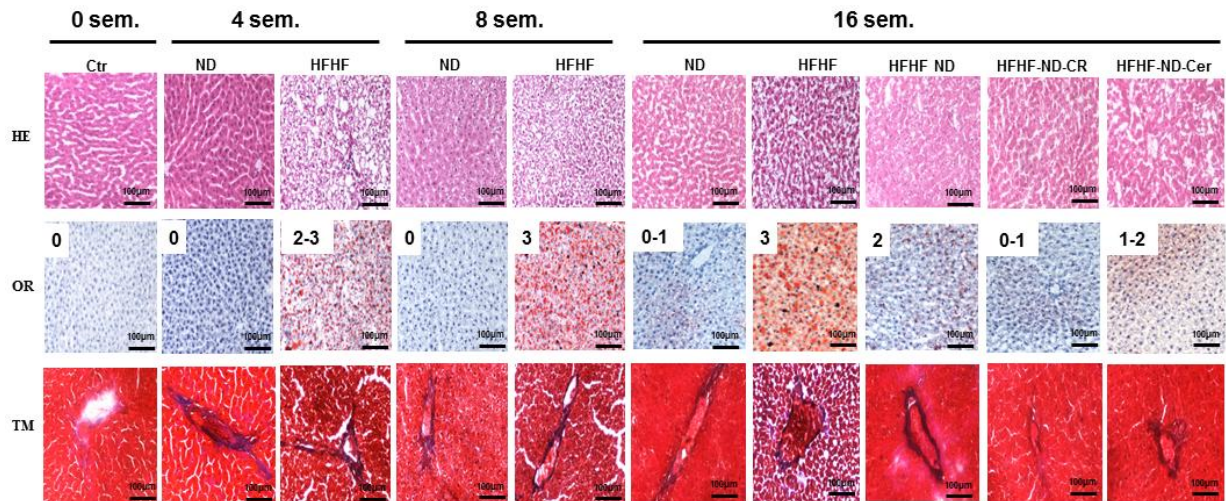
« ND » : normal diet ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF>ND » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND ; « HFHF>ND Chou R. » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Chou R. ; « HFHF>ND Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Cerise.

#### 4.4.2.2.2.4 Observations histologiques

L'analyse histologique des foies de rat montre que le changement du régime HFHF au régime ND permet de réduire le niveau de stéatose hépatique, passant ainsi à un score de 2 à 16 semaines, contre un score 3 pour les rats HFHF (Figure 4-86). Ce phénomène est encore



accéléralé lorsque le régime ND est supplémenté en chou rouge ou en cerise, (scores de 0-1 et 1-2 respectivement pour les rats ND Chou R et ND Cerise à 16 semaines).



**Figure 4-86 : Histologie hépatique - effet de l'approche hygiéno-diététique**

Coupes histologiques de foie de rat après coloration à l'hématoxyline-éosine (HE), au RedOil (OR), et au trichrome de Masson (TM) aux temps 0, 4, 8 et 16 semaines de l'étude.

« ND : normal diet » ; « HFHF » : high fat high fructose ; « HFHF → ND » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND ; « HFHF → ND Chou R. » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Chou R. ; « HFHF → ND Cerise » : T<sub>0</sub>-T<sub>8</sub> = HFHF puis T<sub>8</sub>-T<sub>24</sub> = ND Cerise.

#### 4.4.2.2.2.5 Discussion

**L'approche hygiéno-diététique chez le rat, en permutant le régime hypercalorique HFHF en un régime « normal » ND permet de rétablir une normoglycémie à jeun associée au rétablissement d'une insulinosécrétion comparable aux rats ND de référence.** Bien que la leptinémie soit normalisée à moyen terme par le rééquilibrage alimentaire, elle est augmentée de nouveau significativement à plus long terme. Ceci peut s'expliquer par l'âge des animaux au début de l'étude. Agés de 9 semaines, ce qui correspondrait à environ 4 ans en termes de correspondance avec un humain. A ce stade, le nombre d'adipocytes ne serait pas défini. Ainsi, la capacité des préadipocytes de proliférer et de se différencier serait plus importante au cours de l'enfance (Ailhaud et Guesnet, 2004). Ainsi, une alimentation hypercalorique à un jeune âge induirait une augmentation du nombre d'adipocytes (hyperplasie). Ainsi, le nombre d'adipocytes des rats nourris au régime HFHF pendant les 8 premières semaines de l'étude aurait donc augmenté, ce qui pourrait expliquer l'incapacité des régimes à diminuer à long terme l'hyperleptinémie.

**La mise en place de mesures hygiéno-diététiques après 8 semaines d'apports caloriques en excès réduit également considérablement le stress oxydant plasmatique et**

**tissulaire.** Au niveau plasmatique, la peroxydation lipidique est normalisée. De plus, à moyen terme, le stress oxydant tissulaire dans le pancréas est également normalisé. Enfin, la production de ROS dans le foie est diminuée, et est associée à la réduction du score de stéatose hépatique. D'autres études ont également démontré les effets bénéfiques d'une meilleure hygiène alimentaire, notamment une alimentation pauvre en AGEs (produits avancés de la glycation), induisent la diminution des marqueurs de stress oxydant chez l'homme (Kellow et Savige, 2013). Par ailleurs, des études ont démontré que la prise de mesures hygiéno-diététiques chez l'homme, résultant en une perte de poids supérieure de 9 % ou plus, induit une diminution de l'inflammation du foie, ainsi qu'une réduction du gonflement hépatocytaire, réduisant ainsi la stéatose non compliquée (Masuoka et Chalasani, 2013).

**L'introduction du chou rouge à ces mesures hygiéno-diététiques n'améliore pas les effets obtenus par le régime ND notamment en termes de régulation glycémique, d'insulino-sécrétion ou encore de tolérance au glucose.** Par contre, le chou rouge permet de normaliser la leptinémie par rapport aux animaux contrôles ND, normalisation qui est associée à une rapide stabilisation du poids des rats. Ces données suggèrent que les composés bioactifs du chou rouge permettent d'inhiber la sécrétion de la leptine par les adipocytes. Des études ont d'ailleurs montré que le resvératrol inhibe la sécrétion de la leptine par les adipocytes isolés de rat *in vitro* (Szkudelska, Nogowski et Szkudelski, 2009), alors que les anthocyanes, notamment présentes dans le chou rouge sous forme de cyanidines, ont au contraire une action stimulant la sécrétion de la leptine par les adipocytes isolés de rat *in vitro* (Tsuda et al., 2004). Ceci est également suggéré par les résultats de l'approche nutraceutique décrite précédemment. Etant donné la réduction de poids, accentuée par la consommation de chou rouge, observée chez le rat, il semble donc que cette action hyperleptinémisante des cyanidines n'a pas lieu *in vivo* en l'absence d'un régime hypercalorique et un développement de l'hypertrophie adipocytaire. Au contraire, dans cette approche hygiéno-diététique, le chou rouge a une action normalisant la leptinémie. Ces résultats sont par ailleurs corrélés à l'absence d'une réduction de la prise alimentaire, et donc l'absence de satiété induite par le chou rouge.

**Les études du stress oxydant plasmatique et tissulaire ont montré que la mise en place du régime ND Chou R réduisait le stress oxydant chez le rat.** En effet, l'étude a montré une diminution importante de la peroxydation lipidique, de la présence de ROS au niveau hépatique et pancréatique, de manière plus marquée que par le simple changement au régime

ND non supplémenté. La consommation de chou rouge, vraisemblablement de par la présence des cyanidines anti-oxydantes, a ainsi permis de lutter contre le stress oxydant initialement induit par le régime HFHF. Ainsi, malgré la biodisponibilité des cyanidines régulièrement décrite comme faible (Galvano et al., 2007), la présence en grandes quantités de ces composés dans le chou rouge, associée aux résultats démontrant la diminution du stress oxydant, suggère qu'ils ont été largement absorbés et distribués dans l'organisme du rat. Leur administration a donc permis de potentialiser la réduction du stress oxydant et de la stéatose hépatique initiée par le rééquilibrage alimentaire.

Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature décrivant une activité réductrice de la peroxydation lipidique par la cyanidine-3-glucoside chez le rat (Tsuda, Horio et Osawa, 1998).

**Les études réalisées avec les lyophilisats de cerise semblent plus contradictoires. On observe également une stabilisation rapide de la masse corporelle associée cependant à une hyper-leptinémie.** Ainsi, la diminution de la prise de poids due à ce régime ne limite pas la sécrétion de leptine. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence de teneurs importantes de fructose dans le lyophilisat de cerise, pouvant induire une résistance à la leptine non associée à l'obésité (Shapiro et al., 2008). De plus, les études d'insulino-sécrétion ont montré que la cerise induit une diminution d'une insulino-sécrétion à jeun, qui est associée à l'élévation de la glycémie. Cet effet pourrait être lié à la présence d'un dérivé de l'apigénine dans la cerise, qui a été rapporté comme inhibiteur du transport de glucose par GLUT-2 (Thomas et Pfeiffer, 2012).

**Le lyophilisat de cerise, associé au rééquilibrage alimentaire, induit qu'une diminution transitoire du stress oxydant plasmatique (peroxydation lipidique) et tissulaire (pancréas).** Etant donné l'index glycémique élevé de la cerise, le surplus de sucres apporté par la cerise dans l'alimentation ND serait cependant un facteur limitant, qui ne permettrait pas aux composés bioactifs de la cerise de jouer pleinement leurs actions anti-oxydantes dans le foie. Toutefois, le lyophilisat de cerise, vraisemblablement de par la présence de polyphénols anti-oxydants comme la cyanidine-3-rutinoside ou les acides caféoylquiniques, permet de lutter localement contre le stress oxydant dans le pancréas, mais également de manière plus généralisée par la réduction de la peroxydation lipidique mesurée dans le sérum. La cerise aurait donc une action limitée notamment en stabilisant la masse corporelle, mais présenterait, à long terme, un risque pour le foie, site de métabolisation du fructose et source

de stress oxydant. En effet, l'implication du stress oxydant dans le foie a été reconnue dans le développement notamment de la stéatose non compliquée, un facteur de risque majeur de complications cardiovasculaires (Bhatia et al., 2012).

Le rééquilibrage alimentaire permet donc de lutter efficacement contre l'obésité, le diabète et ses complications. Associé à ces mesures hygiéno-diététiques, le chou rouge permet d'accentuer ces effets, notamment par la normalisation de la leptinémie, et une diminution plus importante des marqueurs du stress oxydant. La cerise permet également d'améliorer le statut oxydatif du pancréas. Cependant, sa consommation prolongée serait à l'origine d'un stress oxydant hépatique.

# **5 Conclusions et perspectives**

Le stress oxydant est omniprésent chez le sujet obèse et chez le patient diabétique. Il participe à l'installation et la progression du diabète de type 2, mais également à l'apparition des nombreuses complications macro- et micro-angiopathiques très invalidantes pouvant aller jusqu'à la mort prématurée du patient. La lutte contre ces phénomènes oxydatifs délétères semble donc primordiale dans le cadre de cette pathologie. Diverses stratégies sont envisagées pour lutter contre le développement de l'obésité et le stress oxydant. Parmi celles-ci, on peut citer des stratégies basées sur la mise en place de mesures hygiéno-diététiques, c'est-à-dire un rééquilibrage alimentaire associé à l'exercice physique. Mais d'autres approches prennent davantage une dimension de thérapie anti-oxydante, notamment par la supplémentation alimentaire. On parle dans ce contexte souvent d'aliments fonctionnels, c'est-à-dire qui, de par leur composition chimique, procurent un bénéfice santé au consommateur. Cette étude s'est ainsi intéressée aux fruits et légumes susceptibles de contribuer à l'amélioration du statut oxydatif.

Cette thèse a permis d'aborder la problématique des anti-oxydants des aliments sous 4 volets :

- L'évaluation du pouvoir anti-oxydant total des fruits et légumes
- L'analyse des anti-oxydants au niveau moléculaire dans les fruits et légumes
- L'évaluation du potentiel préventif anti-oxydant des fruits et légumes *in vitro*
- L'évaluation de l'effet préventif d'un fruit et d'un légume candidat contre l'obésité et ses complications

Les résultats ont permis de déterminer dans un premier temps que les propriétés anti-oxydantes des aliments sont principalement dues à une composition riche en molécules anti-radicalaires de caractère polaire. L'optimisation d'une méthode permettant la séparation des molécules d'un échantillon, la détection et la quantification de la capacité anti-radicalaire de chacune d'entre elles, a ensuite permis de confirmer la nature polyphénolique des molécules impliquées. C'est ainsi par exemple, que l'importante capacité anti-radicalaire du chou rouge est liée à une grande diversité de cyanidines.

Les fruits et légumes étudiés renferment également des molécules liposolubles dotées de capacités anti-radicalaires, détectées grâce à la méthode HPLC-AOx. En effet, ces résultats s'opposent à ceux obtenus par les méthodes globales TEAC et ORAC, et suggèrent qu'il aurait été plus pertinent de réaliser ces tests en milieu organique malgré l'absence de tampon. Le coing, serait ainsi particulièrement intéressant en matière d'anti-radicalaire, de par la

combinaison de molécules polaires et apolaires. Cependant, ces composés apolaires forment vraisemblablement une classe d'anti-oxydants très méconnue. L'analyse structurale de ces molécules s'est révélée plus difficile que pour les polyphénols, déjà largement décrits dans la littérature. En effet, leur purification par collecte des pics chromatographiques n'a jusqu'à présent pas permis l'obtention d'échantillons en quantité et pureté suffisante pour la caractérisation par spectrométrie RMN. Le mode de purification des analytes doit donc encore être optimisé pour cette classe de molécules, nécessitant probablement le fractionnement préalable des extraits par une technique de SPE (solid phase extraction) ainsi que l'adaptation des conditions séparatives à chacune des sous-fractions. Ainsi, l'étude plus approfondie de l'EG de l'épinard, riche en anti-oxydants, serait intéressante étant donné la très faible capacité anti-radicalaire détectée pour son EPDS.

Le modèle du radical ABTS<sup>•+</sup> s'est révélé être un puissant outil, permettant l'analyse de manière sensible des composés anti-radicalaires des fruits et légumes sur ce système en ligne. Cependant, il est certain que des molécules pouvant être de structures très différentes, n'agissent pas de la même manière pour l'ensemble de radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote. Ainsi, dans le but d'étudier les réactions anti-radicalaires de manière plus spécifique, la méthode HPLC-AOx doit être adaptée à une utilisation de radicaux pertinents en biologie, grâce à une détection par RPE. Les essais préliminaires engagés au cours de ce projet sont encourageants, mais nécessitent encore une importante phase d'optimisation. En effet, un mode de génération de ROS comme le radical hydroxyle compatible avec le couplage chromatographique doit être développé. Pour ce faire, des réactions de Fenton classiques peuvent être envisagées, nécessitant le développement de méthodes séparatives utilisant peu, voir pas, de solvants organiques, frein important à ces réactions. Cependant, il serait préférable d'optimiser et de simplifier le processus de génération de radicaux en ligne, notamment par la réduction du nombre d'agents chimiques (comme le Fe<sup>2+</sup> par exemple) pouvant interagir avec les analytes dont on cherche à détecter une réactivité. Ainsi, des systèmes basés sur la dissociation thermique du peroxyde d'hydrogène, ou encore par photolyse sont à tester. Il serait encore possible d'utiliser un détecteur électrochimique pour HPLC afin de réaliser la dissociation du peroxyde d'hydrogène en flux continu (Monroe et Heien, 2013).

Les études *in vitro* sur le modèle cellulaire RINm5F ont montré que les extraits, dont l'activité chimique a été mise en évidence, permettent une protection vis-à-vis d'un stress



oxydant induit par un hyperinsulinisme. Les polyphénols, qui composent les extraits polaires désués, sont ainsi, capable, en partie du moins, d'entrer dans la cellule et d'y être accumulés, pour y exercer ultérieurement une action anti-radicalaire. L'EPDS de chou rouge ne présente pourtant pas la plus forte activité anti-oxydante cellulaire (CAA), son rendement d'extraction très important en fait l'aliment présentant le meilleur potentiel préventif vis-à-vis de phénomènes oxydatifs. Les résultats ont ainsi montré que l'activité anti-radicalaire due aux molécules polaires du chou rouge ou de la cerise peuvent substituer les mécanismes anti-oxydants endogènes, comme la surexpression des enzymes anti-oxydantes, la superoxyde dismutase et la catalase. D'autres extraits, comme la carotte, pourtant presque dépourvue de molécules anti-radicalaires, pourraient agir comme anti-oxydants en stimulant les défenses endogènes. L'étude des mécanismes pharmacologiques par lesquels l'extrait de carotte agit comme anti-oxydant doit donc encore être élucidé. Il s'agira donc de déterminer quelle molécule au sein de cet extrait est responsable de son effet anti-oxydant, et par quelle voie elle agit : activation directe/indirecte de la voie ARE (Antioxidant Response Element) ; expression des enzymes pro/anti-oxydantes ; voie de signalisation de l'inflammation...

L'analyse des EG par HPLC-AOx ayant démontré la présence de composés anti-oxydants liposolubles, il est cependant nécessaire de pouvoir évaluer leur capacité anti-oxydante cellulaire. L'obstacle de leur insolubilité dans le milieu de culture, n'a jusqu'à présent pas permis de compléter cette étude. En effet, pour ce faire, des procédés de solubilisation adaptés spécifiquement à ce type d'extrait doivent être mis au point. C'est dans ce contexte qu'un projet annexe, NanoEG, a démarré, ayant pour finalité la réalisation de nano-émulsions d'anti-oxydants liposoluble permettant les études *in vitro*. Par ailleurs, les composés lipophiles, comme les caroténoïdes, sont fréquemment décrits comme faiblement biodisponibles. Cependant, il a été rapporté que la consommation de matières grasses, comme l'huile d'olive dans le cas du régime méditerranéen, serait un élément favorisant la biodisponibilité de cette classe moléculaire (Fernández-García et al., 2012). La réalisation de nano-émulsions d'extraits gras de fruits et légumes pourraient ainsi également représenter une approche d'intérêt dans un contexte nutraceutique.

L'étude *in vivo* des effets du chou rouge et de la cerise sur la santé a pu révéler une réelle action préventive. Le chou rouge a démontré des effets anti-diabétiques à court terme, et anti-oxydants à court et à plus long terme. Ces effets ne sont néanmoins pas suffisants pour empêcher la progression de l'obésité et ses complications, soulignant l'importance d'un

rééquilibrage alimentaire. En effet, les résultats ont démontré que pour lutter contre l'obésité, un changement d'hygiène alimentaire est indispensable. De plus, le chou rouge accentue l'amélioration de la majorité des paramètres suivis, et particulièrement le stress oxydant. La consommation de chou rouge permet donc de potentialiser les bienfaits des mesures hygiéno-diététiques. Des effets anti-oxydants sont aussi observés pour la cerise, mais restent moins marqués que pour le chou rouge. De plus, l'important index glycémique de ce fruit serait à l'origine à long terme d'effets délétères, dont un stress oxydant hépatique, contrebalançant ainsi le bénéfice santé initialement induit par une meilleure hygiène alimentaire.

L'action hyperleptinémisante induite par le chou rouge lorsque associée à une alimentation hypercalorique serait à l'origine des effets anti-obésité observés. Il en résulte une diminution de la prise alimentaire due à l'induction des phénomènes de satiété liée à la leptine. Cet aspect reste néanmoins à être vérifié par le calcul exact des différences en termes d'apports caloriques. Le chou rouge associé au rééquilibrage alimentaire n'induit pourtant pas d'hyperleptinémie, et au contraire normalise l'hyperleptinémie observée lors du rééquilibrage alimentaire seul. Une étude approfondie du tissu adipeux doit donc être réalisée afin de mieux comprendre l'hyperleptinémie observée à long terme, malgré les mesures hygiéno-diététiques. Elle permettrait de vérifier l'hypothèse que le nombre d'adipocytes est augmenté par l'exposition à un régime hypercalorique à un jeune âge, et serait à l'origine d'une prise de poids et donc une hyperleptinémie à long terme. Il s'agira, dans cette étude, aussi de mieux comprendre le rôle apparent du chou rouge, et vraisemblablement des cyanidines, en tant que régulateur de la leptinémie en fonction du statut nutritionnel de l'organisme.

Des études sont par ailleurs en cours, afin de déterminer si il existe des sites mieux préservés contre le stress oxydant par les apports de chou rouge ou de cerise. Ainsi, l'étude histologique et la mesure des marqueurs de stress oxydant seront réalisées sur le pancréas, le muscle squelettique, et les vaisseaux, en plus de l'étude de la dysfonction endothéliale.

Au cours de cette étude, aucune analyse de la biodisponibilité des molécules actives du chou rouge ou de la cerise n'a été réalisée. Même si, dans le cas du chou rouge une large distribution des effets anti-oxydants a été mise en évidence, suggérant l'absorption et la distribution des molécules qu'il contient, l'étude de la biodisponibilité et du devenir métabolique de ces composés permettrait de mieux comprendre leurs effets observés. La complexité de la composition chimique de ces aliments, et tout comme la multiplicité des métabolites pouvant être générés *in vivo*, serait cependant un important obstacle à cette étude

de biodisponibilité. Ainsi, l'administration des molécules majoritaires purifiées sera sans doute envisagée.

En parallèle de l'étude *in vivo* présentée dans ce manuscrit, nous avons cherché à constituer un bagage anti-oxydant au rat en les alimentant avec un régime normal supplémenté en cerise ou en chou rouge pendant une première période, puis en les soumettant par la suite au régime HFHF. L'analyse des résultats de cette étude permettra peut-être de mieux comprendre, de confirmer et de compléter l'étude des effets liés à la consommation de ces aliments.

Enfin, les effets bénéfiques du chou rouge ont donc pu être démontrés sur la base de l'aliment cru. Cependant, le profil moléculaire du chou rouge après cuisson, ou tout autre procédé de transformation est certainement différent de celui observé dans cette étude. L'analyse des extraits polaires désués du chou rouge cuit (et de son eau de cuisson), du chou rouge fermenté (et du jus de fermentation) sera donc également réalisé dans une prochaine étape du projet EVA, afin de suivre l'évolution du potentiel anti-oxydant de ce légume.

Certains fruits ou légumes, de par leur composition chimique unique, peuvent ainsi avoir un réel impact bénéfique sur la santé. Les molécules naturelles, présentes au sein de ces aliments exerçant l'ensemble de ses effets, ne peuvent cependant pas substituer une alimentation générale saine.

# **6 Références bibliographiques**

**Aaby K., Ekeberg D. et Skrede G. (2007)**, « Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, n°11, pp. 4395-4406.

**Ailhaud G. et Guesnet P. (2004)**, « Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion », *Obesity Reviews*, vol. 5, n°1, pp. 21–26.

**Alasalvar C., Grigor J.M., Zhang D., Quantick P.C. et Shahidi F. (2001)**, « Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, n°3, pp. 1410-1416.

**Alfonso-Prieto M., Biarnés X., Vidossich P. et Rovira C. (2009)**, « The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, n°33, pp. 11751-11761.

**Andlauer W., Martena M.J. et Fürst P. (1999)**, « Determination of selected phytochemicals by reversed-phase high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection », *Journal of Chromatography A*, vol. 849, n°2, pp. 341-348.

**Anttonen M.J. et Karjalainen R.O. (2006)**, « High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Phenolics Grown either Conventionally or Organically », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n°20, pp. 7530-7538.

**Arapitsas P., Sjöberg P.J.R. et Turner C. (2008)**, « Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry », *Food Chemistry*, vol. 109, n°1, pp. 219-226.

**Atmaca G. (2004)**, « Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids », *Yonsei medical journal*, vol. 45, n°5, pp. 776-788.

**Azam S., Hadi N., Khan N. et Hadi S. (2004)**, « Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties », *Toxicology in Vitro*, vol. 18, n°5, pp. 555-561.

**Azuma K., Ippoushi K., Nakayama M., Ito H., Higashio H. et Terao J. (2000)**, « Absorption of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid in Rats after Oral Administration », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, n°11, pp. 5496-5500.

**Ball G.F.M. (2006)**, *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability*, Boca Raton, FL, Taylor & Francis.

**Basu A., Wilkinson M., Penugonda K., Simmons B., Betts N.M. et Lyons T.J. (2009)**, « Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects », *Nutrition Journal*, vol. 8, n°1, pp. 43.

**Baynes J.W. et Thorpe S.R. (1999)**, « Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. », *Diabetes*, vol. 48, n°1, pp. 1-9.

**Beckman K.B. et Ames B.N. (1998)**, « The Free Radical Theory of Aging Matures », *Physiological Reviews*, vol. 78, n°2, pp. 547-581.

**Bell S. (2012)**, « Souci – Fachmann – Kraut, food composition and nutrition tables », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 24, n°1, pp. 60.

**Bhatia L.S., Curzen N.P., Calder P.C. et Byrne C.D. (2012)**, « Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? », *European Heart Journal*, vol. 33, n°10, pp. 1190-1200.

**Biehler E., Mayer F., Hoffmann L., Krause E. et Bohn T. (2010)**, « Comparison of 3 Spectrophotometric Methods for Carotenoid Determination in Frequently Consumed Fruits and Vegetables », *Journal of Food Science*, vol. 75, n°1, pp. C55-C61.

**Birkner E., Kasperczyk S., Kasperczyk A., Zalejska-Fiolka J., Zwirska-Korczała K., Stawiarska-Pieta B. et Grucka-Mamczar E. (2005)**, « Metabolic and antioxidative changes in liver steatosis induced by high-fat, low-carbohydrate diet in rabbits », *Journal of physiology and pharmacology*, vol. 56, pp. 45.

**Bravo L. (1998)**, « Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance », *Nutrition Reviews*, vol. 56, n°11, pp. 317-333.

**Brownlee M. (2001)**, « Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications », *Nature*, vol. 414, n°6865, pp. 813-820.

**Brownlee M. (2005)**, « The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism », *Diabetes*, vol. 54, n°6, pp. 1615-1625.

**Buendía B., Gil M.I., Tudela J.A., Gady A.L., Medina J.J., Soria C., López J.M. et Tomás-Barberán F.A. (2010)**, « HPLC-MS Analysis of Proanthocyanidin Oligomers and Other Phenolics in 15 Strawberry Cultivars† », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, n°7, pp. 3916-3926.

**Buettner G.R. (1993)**, « The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate », *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 300, n°2, pp. 535-543.

**Burton-Freeman B., Linares A., Hyson D. et Kappagoda T. (2010)**, « Strawberry Modulates LDL Oxidation and Postprandial Lipemia in Response to High-Fat Meal in Overweight Hyperlipidemic Men and Women », *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 29, n°1, pp. 46-54.

**Caro J.F., Kolaczynski J.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Opentanova I., Goldman W.H., Lynn R.B., Zhang P.-L., Sinha M.K. et Considine R.V. (1996)**, « Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance », *The Lancet*, vol. 348, n°9021, pp. 159-161.

**Carter P., Gray L.J., Troughton J., Khunti K. et Davies M.J. (2010)**, « Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis », *BMJ: British Medical Journal*, vol. 341.

**Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M. de L., Páez-Hernández M.E., Rodríguez J.A. et Galán-Vidal C.A. (2009)**, « Chemical studies of anthocyanins: A review », *Food Chemistry*, vol. 113, n°4, pp. 859-871.

**Castillo M.D. del, Ames J.M. et Gordon M.H. (2002)**, « Effect of Roasting on the Antioxidant Activity of Coffee Brews », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, n°13, pp. 3698-3703.

**Ceriello A. (2003)**, « New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a “Causal” Antioxidant Therapy », *Diabetes Care*, vol. 26, n°5, pp. 1589-1596.

**Ceriello A., Giugliano D., Quatraro A., Donzella C., Dipalo G. et Lefebvre P.J. (1991)**, « Vitamin E Reduction of Protein Glycosylation in Diabetes: New Prospect for Prevention of Diabetic Complications? », *Diabetes Care*, vol. 14, n°1, pp. 68-72.

**Chan T., Shimizu Y., Pospisil P., Nijo N., Fujiwara A., Taninaka Y., Ishikawa T., Hori H., Nanba D., Imai A., Morita N., Yoshioka-Nishimura M., Izumi Y., Yamamoto Y., Kobayashi H., Mizusawa N., Wada H. et Yamamoto Y. (2012)**, « Quality Control of Photosystem II: Lipid Peroxidation Accelerates Photoinhibition under Excessive Illumination », *PLoS ONE*, vol. 7, n°12.

**Chaovanalikit A. et Wrolstad R.E. (2004)**, « Anthocyanin and Polyphenolic Composition of Fresh and Processed Cherries », *Journal of Food Science*, vol. 69, n°1, pp. FCT73–FCT83.

**Chaovanalikit A., Thompson M.M. et Wrolstad R.E. (2004)**, « Characterization and Quantification of Anthocyanins and Polyphenolics in Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, n°4, pp. 848-852.

**Chuah A.M., Lee Y.-C., Yamaguchi T., Takamura H., Yin L.-J. et Matoba T. (2008)**, « Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers », *Food Chemistry*, vol. 111, n°1, pp. 20-28.

**Chung S.S.M., Ho E.C.M., Lam K.S.L. et Chung S.K. (2003)**, « Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress », *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 14, n°suppl 3, pp. S233-S236.

**Cunha W.R., Silva M.L.A. e, Sola R.C., Veneziani S.R.A. et Bastos J.K.**, « Lignans: Chemical and Biological Properties », *Phytochemicals - A global Perspective of their Role in Nutrition and Health*. Chap.10, pp. 213-234.

**Czernichow S., Couthouis A., Bertrais S., Vergnaud A.-C., Dauchet L., Galan P. et Hercberg S. (2006)**, « Antioxidant supplementation does not affect fasting plasma glucose in the Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals (SU.VI.MAX) study in France: association with dietary intake and plasma concentrations », *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 84, n°2, pp. 395-399.

**Dal-Ros S., Oswald-Mammosser M., Pestrikova T., Schott C., Boehm N., Bronner C., Chataigneau T., Gény B. et Schini-Kerth V.B. (2010)**, « Losartan Prevents Portal Hypertension-Induced, Redox-Mediated Endothelial Dysfunction in the Mesenteric Artery in Rats », *Gastroenterology*, vol. 138, n°4, pp. 1574-1584.



**Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J., Lin J.K., Farzadfar F., Khang Y.-H., Stevens G.A., Rao M., Ali M.K., Riley L.M., Robinson C.A. et Ezzati M. (2011)**, « National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants », *The Lancet*, vol. 378, n°9785, pp. 31-40.

**Daval M., Ferré P. et Foufelle F. (2006)**, « L'AMPK : une enzyme au coeur de l'homéostasie énergétique », *Journal de la Société de Biologie*, vol. 200, n°1, pp. 99-105.

**Defraigne J.-O. (2005)**, « Un mecanisme physiopathologique central a l'origine des complications du diabete? », *Revue médicale de Liège*, vol. 60, n°5-6, pp. 472-478.

**Devaraj S. et Jialal I. (2000)**, « Alpha tocopherol supplementation decreases serum C-reactive protein and monocyte interleukin-6 levels in normal volunteers and type 2 diabetic patients », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 29, n°8, pp. 790-792.

**Dewanto V., Wu X., Adom K.K. et Liu R.H. (2002)**, « Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, n°10, pp. 3010-3014.

**Domitrovic R. (2011)**, « The Molecular Basis for the Pharmacological Activity of Anthocyanins », *Current Medicinal Chemistry*, vol. 18, n°29, pp. 4454-4469.

**Ben-Dor A., Steiner M., Gheber L., Danilenko M., Dubi N., Linnewiel K., Zick A., Sharoni Y. et Levy J. (2005)**, « Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system », *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 4, n°1, pp. 177-186.

**Droge W. (2002)**, « Free radicals in the physiological control of cell function », *Physiological Reviews*, vol. 82, n°1, pp. 47-95.

**Du X.-L., Edelstein D., Rossetti L., Fantus I.G., Goldberg H., Ziyadeh F., Wu J. et Brownlee M. (2000)**, « Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, n°22, pp. 12222-12226.

**Duthie G. et Crozier A. (2000)**, « Plant-derived phenolic antioxidants », *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, vol. 3, n°6, pp. 447-451.

**Elmqvist J.K., Elias C.F. et Saper C.B. (1999)**, « From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight », *Neuron*, vol. 22, n°2, pp. 221-232.

**Erlund I. (2004)**, « Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology », *Nutrition Research*, vol. 24, n°10, pp. 851-874.

**Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A. et Grodsky G.M. (2002)**, « Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes », *Endocrine Reviews*, vol. 23, n°5, pp. 599-622.

**Evcimen N. Das et King G.L. (2007)**, « The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes », *Pharmacological Research*, vol. 55, n°6, pp. 498-510.

**Eyles A., Jones W., Riedl K., Cipollini D., Schwartz S., Chan K., Herms D.A. et Bonello P. (2007)**, « Comparative Phloem Chemistry of Manchurian (*Fraxinus mandshurica*) and Two North American Ash Species (*Fraxinus americana* and *Fraxinus pennsylvanica*) », *Journal of Chemical Ecology*, vol. 33, n°7, pp. 1430-1448.

**Facchini F.S., Hua N.W., Reaven G.M. et Stoohs R.A. (2000)**, « Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases? », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 29, n°12, pp. 1302-1306.

**Faller A.L.K. et Fialho E. (2009)**, « The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking », *Food Research International*, vol. 42, n°1, pp. 210-215.

**Farah A., Paulis T. de, Trugo L.C. et Martin P.R. (2005)**, « Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, n°5, pp. 1505-1513.

**Fernández-García E., Carvajal-Lérida I., Jarén-Galán M., Garrido-Fernández J., Pérez-Gálvez A. et Hornero-Méndez D. (2012)**, « Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities », *Food Research International*, vol. 46, n°2, pp. 438-450.

**Figuroa-Romero C., Sadidi M. et Feldman E.L. (2008)**, « Mechanisms of disease: The oxidative stress theory of diabetic neuropathy », *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, vol. 9, n°4, pp. 301-314.

**Forbes J.M. et Cooper M.E. (2013)**, « Mechanisms of Diabetic Complications », *Physiological Reviews*, vol. 93, n°1, pp. 137-188.

**Ford E.S. et Mokdad A.H. (2001)**, « Fruit and Vegetable Consumption and Diabetes Mellitus Incidence among U.S. Adults », *Preventive Medicine*, vol. 32, n°1, pp. 33-39.

**Foti M.C., Daquino C. et Geraci C. (2004)**, « Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions », *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 69, n°7, pp. 2309-2314.

**Fulle S., Pietrangelo T., Mancinelli R., Saggini R. et Fanò G. (2008)**, « Specific correlations between muscle oxidative stress and chronic fatigue syndrome: a working hypothesis », *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, vol. 28, n°6, pp. 355-362.

**Galic S., Oakhill J.S. et Steinberg G.R. (2010)**, « Adipose tissue as an endocrine organ », *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 316, n°2, pp. 129-139.

**Galvano F., Fauci L. La, Vitaglione P., Fogliano V., Vanella L. et Felgines C. (2007)**, « Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides », *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, vol. 43, n°4, pp. 382-393.

**Ge X., Yu Q., Qi W., Shi X. et Zhai Q. (2008)**, « Chronic insulin treatment causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through oxidative stress », *Free Radical Research*, vol. 42, n°6, pp. 582-591.

**Ghedira K. (2005)**, « Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique », *Phytotherapie*, vol. 3, n°4, pp. 162-169.

**Ghouleh I.A., Khoo N.K.H., Knaus U.G., Griendling K.K., Touyz R.M., Thannickal V.J., Barchowsky A., Nauseef W.M., Kelley E.E., Bauer P.M., Darley-Usmar V., Shiva S., Cifuentes-Pagano E., Freeman B.A., Gladwin M.T. et Pagano P.J. (2011)**, « Oxidases and Peroxidases in Cardiovascular and Lung Disease: New Concepts in Reactive Oxygen Species Signaling », *Free radical biology & medicine*, vol. 51, n°7, pp. 1271-1288.

**Girard-Lalancette K., Pichette A. et Legault J. (2009)**, « Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices », *Food Chemistry*, vol. 115, n°2, pp. 720-726.

**Goldstein B.J., Mahadev K., Wu X., Zhu L. et Motoshima H. (2005)**, « Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway », *Antioxidants & redox signaling*, vol. 7, n°7-8, pp. 1021-1031.

**Gouveia S. et Castilho P.C. (2011)**, « Antioxidant potential of Artemisia argentea L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition », *Food Research International*, vol. 44, n°6, pp. 1620-1631.

**Guo H., Xia M., Zou T., Ling W., Zhong R. et Zhang W. (2012)**, « Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1 », *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 23, n°4, pp. 349-360.

**Ha H. et Kim K.H. (1999)**, « Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C », *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 45, n°2-3, pp. 147-151.

**Hager T.J., Howard L.R., Liyanage R., Lay J.O. et Prior R.L. (2008)**, « Ellagitannin Composition of Blackberry As Determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, n°3, pp. 661-669.

**Halliwel B. et Chirico S. (1993)**, « Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. », *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 57, n°5, pp. 715S-724S.

**Halliwel B. (2008)**, « Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 476, n°2, pp. 107-112.

**Halliwel B. et Gutteridge J.M.C. (1999)**, *Free radicals in biology and medicine*, 3rd Edition.

**Hamauzu Y., Yasui H., Inno T., Kume C. et Omanyuda M. (2005)**, « Phenolic Profile, Antioxidant Property, and Anti-influenza Viral Activity of Chinese Quince (*Pseudocarya sinensis* Schneid.), Quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and Apple (*Malus domestica* Mill.) Fruits », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, n°4, pp. 928-934.

**Harding A, Wareham NJ, Bingham SA et al (2008)**, « Plasma vitamin c level, fruit and vegetable consumption, and the risk of new-onset type 2 diabetes mellitus: The european prospective investigation of cancer–norfolk prospective study », *Archives of Internal Medicine*, vol. 168, n°14, pp. 1493-1499.

**He Z. et Xia W. (2008)**, « Preparative separation and purification of phenolic compounds from *Canarium album* L. by macroporous resins », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 88, n°3, pp. 493-498.

**Hernandez-Ledesma B., Davalos A., Bartolome B. et Amigo L. (2005)**, « Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, n°3, pp. 588-593.

**Hof K.H. van het, West C.E., Weststrate J.A. et Hautvast J.G.A.J. (2000)**, « Dietary Factors That Affect the Bioavailability of Carotenoids », *The Journal of Nutrition*, vol. 130, n°3, pp. 503-506.

**Huang B.-W., Chiang M.-T., Yao H.-T. et Chiang W. (2004)**, « The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats », *Diabetes, Obesity and Metabolism*, vol. 6, n°2, pp. 120-126.

**Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A. et Deemer E.K. (2002)**, « Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, n°7, pp. 1815-1821.

**Huang D., Ou B. et Prior R.L. (2005)**, « The chemistry behind antioxidant capacity assays », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, n°6, pp. 1841-1856.

**Igarashi K., Kimura Y. et Takenaka A. (2000)**, « Preventive Effects of Dietary Cabbage Acylated Anthocyanins on Paraquat-induced Oxidative Stress in Rats », *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 64, n°8, pp. 1600-1607.

**Jaiswal R. et Kuhnert N. (2011)**, « Identification and characterization of five new classes of chlorogenic acids in burdock (*Arctium lappa* L.) roots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry », *Food & Function*, vol. 2, n°1, pp. 63-71.

**Jiang Q., Christen S., Shigenaga M.K. et Ames B.N. (2001)**, «  $\gamma$ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention », *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 74, n°6, pp. 714-722.

**Jiménez-Monreal A.M., García-Diz L., Martínez-Tomé M., Mariscal M. et Murcia M.A. (2009)**, « Influence of Cooking Methods on Antioxidant Activity of Vegetables », *Journal of Food Science*, vol. 74, n°3, pp. H97-H103.

**Jovanovic S.V., Steenken S., Boone C.W. et Simic M.G. (1999)**, « H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 121, n°41, pp. 9677-9681.

**Kähkönen M.P. et Heinonen M. (2003)**, « Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, n°3, pp. 628-633.

**Kaneto H., Xu G., Song K.-H., Suzuma K., Bonner-Weir S., Sharma A. et Weir G.C. (2001)**, « Activation of the Hexosamine Pathway Leads to Deterioration of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function through the Induction of Oxidative Stress », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n°33, pp. 31099-31104.

**Kashiwagi A., Shinozaki K., Nishio Y., Maegawa H., Maeno Y., Kanazawa A., Kojima H., Haneda M., Hidaka H., Yasuda H. et Kikkawa R. (1999)**, « Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats », *The American journal of physiology*, vol. 277, n°6 Pt 1, pp. E976-983.

**Kellow N.J. et Savige G.S. (2013)**, « Dietary advanced glycation end-product restriction for the attenuation of insulin resistance, oxidative stress and endothelial dysfunction: a systematic review », *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 67, n°3, pp. 239-248.

**King G.L. et Loeken M.R. (2004)**, « Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications », *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 122, n°4, pp. 333-338.

**Koleva I.I., Niederländer H.A.G. et Beek T.A. van (2001)**, « Application of ABTS Radical Cation for Selective On-Line Detection of Radical Scavengers in HPLC Eluates », *Analytical Chemistry*, vol. 73, n°14, pp. 3373-3381.

**Kramer C.M., Prata R.T.N., Willits M.G., Luca V. De, Steffens J.C. et Graser G. (2003)**, « Cloning and regiospecificity studies of two flavonoid glucosyltransferases from *Allium cepa* », *Phytochemistry*, vol. 64, n°6, pp. 1069-1076.

**Kryston T.B., Georgiev A.B., Pissis P. et Georgakilas A.G. (2011)**, « Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis », *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 711, n°1-2, pp. 193-201.

**Lachin T. et Reza H. (2012)**, « Anti Diabetic Effect of Cherries in Alloxan Induced Diabetic Rats », *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, vol. 6, n°1, pp. 67-72.

**Landete J.M. (2013)**, « Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols », *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 53, n°7, pp. 706-721.

**Lapidot T., Harel S., Granit R. et Kanner J. (1998)**, « Bioavailability of Red Wine Anthocyanins As Detected in Human Urine† », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, n°10, pp. 4297-4302.

**Leopoldini M., Marino T., Russo N. et Toscano M. (2004)**, « Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism », *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, n°22, pp. 4916-4922.

**Leung F.Y. (1998)**, « Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition », *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 9, n°6, pp. 304-307.

**Lewis G.F., Carpentier A., Adeli K. et Giacca A. (2002)**, « Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes », *Endocrine Reviews*, vol. 23, n°2, pp. 201-229.

**Lima V.V., Spitler K., Choi H., Webb R.C. et Tostes R.C. (2012)**, « O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? », *Clinical Science (London, England : 1979)*, vol. 123, n°Pt 8, pp. 473-486.

**Liu S., Serdula M., Janket S.-J., Cook N.R., Sesso H.D., Willett W.C., Manson J.E. et Buring J.E. (2004)**, « A Prospective Study of Fruit and Vegetable Intake and the Risk of Type 2 Diabetes in Women », *Diabetes Care*, vol. 27, n°12, pp. 2993-2996.

**Ma Y.-L., Cuyckens F., Heuvel H.V. den et Claeys M. (2001)**, « Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric O-diglycosyl flavonoids », *Phytochemical Analysis*, vol. 12, n°3, pp. 159-165.

**Magalhães A.S., Silva B.M., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentão P. et Carvalho M. (2009)**, « Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes », *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, n°6, pp. 1372-1377.

**Magnan C. (2006)**, « Lipotoxicité et insulino-résistance », *Nutrition Clinique et Métabolisme*, vol. 20, n°2, pp. 108-113.

**Maiani G., Periago Castón M.J., Catasta G., Toti E., Cambrodón I.G., Bysted A., Granada-Lorenzo F., Olmedilla-Alonso B., Knuthsen P., Valoti M., Böhm V., Mayer-Miebach E., Behnlian D. et Schlemmer U. (2009)**, « Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans », *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 53, n°S2, pp. S194-S218.

**Malaguarnera M., Rosa M.D., Nicoletti F. et Malaguarnera L. (2009)**, « Molecular mechanisms involved in NAFLD progression », *Journal of Molecular Medicine*, vol. 87, n°7, pp. 679-695.

**Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. et Jiménez L. (2004)**, « Polyphenols: food sources and bioavailability », *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, n°5, pp. 727-747.

**Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A. et Rémésy C. (2005)**, « Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies », *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, n°1, pp. 230S-242S.

**Marc F., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. et Fritsch P. (2004)**, « Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments », *M/S: médecine sciences*, vol. 20, n°4, pp. 458-463.

**Martinez-Gonzalez M.A., Fuente-Arrillaga C. d. I., Nunez-Cordoba J.M., Basterra-Gortari F.J., Beunza J.J., Vazquez Z., Benito S., Tortosa A. et Bes-Rastrollo M. (2008)**,

« Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study », *BMJ*, vol. 336, n°7657, pp. 1348-1351.

**Masella R., Benedetto R. Di, Vari R., Filesi C. et Giovannini C. (2005)**, « Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes », *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 16, n°10, pp. 577-586.

**Masuoka H.C. et Chalasani N. (2013)**, « Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals: Nonalcoholic fatty liver disease », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1281, n°1, pp. 106-122.

**McGhie T.K. et Walton M.C. (2007)**, « The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding », *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 51, n°6, pp. 702-713.

**Meerwaldt R., Links T., Zeebregts C., Tio R., Hillebrands J.-L. et Smit A. (2008)**, « The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes », *Cardiovascular Diabetology*, vol. 7, pp. 29.

**Milman U., Blum S., Shapira C., Aronson D., Miller-Lotan R., Anbinder Y., Alshiek J., Bennett L., Kostenko M., Landau M., Keidar S., Levy Y., Khemlin A., Radan A. et Levy A.P. (2008)**, « Vitamin E Supplementation Reduces Cardiovascular Events in a Subgroup of Middle-Aged Individuals With Both Type 2 Diabetes Mellitus and the Haptoglobin 2-2 Genotype A Prospective Double-Blinded Clinical Trial », *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, n°2, pp. 341-347.

**Monroe E.B. et Heien M.L. (2013)**, « Electrochemical Generation of Hydroxyl Radicals for Examining Protein Structure », *Analytical Chemistry*, vol. 85, n°13, pp. 6185-6189.

**Moraes S.L. de, Gregório L.E., Tomaz J.C. et Lopes N.P. (2009)**, « Rapid Screening and Identification of Polar Constituents from Brazilian Arnica Lychnophora sp. by LC-UV/DAD-ESI-MS and LC-UV/DAD-ESI-MS/MS Analysis », *Chromatographia*, vol. 69, n°2, pp. 157-165.

**Müller H. (1997)**, « Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection », *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, vol. 204, n°2, pp. 88-94.

**Neri S., Signorelli S.S., Torrisi B., Pulvirenti D., Mauceri B., Abate G., Ignaccolo L., Bordonaro F., Cilio D., Calvagno S. et Leotta C. (2005)**, « Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: A single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls », *Clinical Therapeutics*, vol. 27, n°11, pp. 1764-1773.

**Nicoli M., Anese M. et Parpinel M. (1999)**, « Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 10, n°3, pp. 94-100.

**Nishikawa T., Edelstein D. et Brownlee M. (2000)**, « The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications », *Kidney International*, vol. 58, n°S77, pp. S26-S30.

**Nseir W., Nassar F. et Assy N. (2010)**, « Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease », *World Journal of Gastroenterology : WJG*, vol. 16, n°21, pp. 2579-2588.

**O'Neill M.E., Carroll Y., Corridan B., Olmedilla B., Granado F., Blanco I., Berg H.V. den, Hininger I., Rousell A.-M., Chopra M., Southon S. et Thurnham D.I. (2001)**, « A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study », *British Journal of Nutrition*, vol. 85, n°04, pp. 499-507.

**Obied H.K. (2013)**, « Biography of biophenols: past, present and future », *Functional Foods in Health and Disease*, vol. 3, n°6, pp. 230-241.

**Palmer R.M.J., Rees D.D., Ashton D.S. et Moncada S. (1988)**, « L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 153, n°3, pp. 1251-1256.

**Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Rio D.D., Salvatore S., Bianchi M. et Brighenti F. (2003)**, « Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays », *The Journal of Nutrition*, vol. 133, n°9, pp. 2812-2819.

**Perez-Jimenez J., Neveu V., Vos F. et Scalbert A. (2010)**, « Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database », *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 64, pp. S112-S120.

**Pérez-Jiménez J. et Saura-Calixto F. (2006)**, « Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays », *Food Research International*, vol. 39, n°7, pp. 791-800.

**Pessayre D., Fromenty B. et Mansouri A. (2004)**, « Mitochondrial injury in steatohepatitis », *European journal of gastroenterology & hepatology*, vol. 16, n°11, pp. 1095-1105.

**Peyrat-Maillard M.N., Cuvelier M.E. et Berset C. (2003)**, « Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects », *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 80, n°10, pp. 1007-1012.

**Pietta P.-G. (2000)**, « Flavonoids as Antioxidants », *Journal of Natural Products*, vol. 63, n°7, pp. 1035-1042.

**Prabhakar R., Vreven T., Morokuma K. et Musaev D.G. (2005)**, « Elucidation of the Mechanism of Selenoprotein Glutathione Peroxidase (GPx)-Catalyzed Hydrogen Peroxide Reduction by Two Glutathione Molecules: A Density Functional Study », *Biochemistry*, vol. 44, n°35, pp. 11864-11871.

**Prior R.L., Wu X. et Schaich K. (2005)**, « Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, n°10, pp. 4290-4302.



- Raccach D. (2004)**, « Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré », *EMC - Endocrinologie*, vol. 1, n°1, pp. 29-42.
- Rahman K. (2007)**, « Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors », *Clinical Interventions in Aging*, vol. 2, n°2, pp. 219-236.
- Rao A.V. et Rao L.G. (2007)**, « Carotenoids and human health », *Pharmacological Research*, vol. 55, n°3, pp. 207-216.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. et Rice-Evans C. (1999)**, « Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, n°9-10, pp. 1231-1237.
- Reaven G.M. (1988)**, « Role of Insulin Resistance in Human Disease », *Diabetes*, vol. 37, n°12, pp. 1595-1607.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. et Paganga G. (1996)**, « Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 20, n°7, pp. 933-956.
- Rice-Evans C., Miller N. et Paganga G. (1997)**, « Antioxidant properties of phenolic compounds », *Trends in Plant Science*, vol. 2, n°4, pp. 152-159.
- Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolín I., Herrera F., Martín V. et Reiter R.J. (2004)**, « Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin », *Journal of Pineal Research*, vol. 36, n°1, pp. 1-9.
- Dal-Ros S., Zoll J., Lang A.-L., Auger C., Keller N., Bronner C., Geny B. et Schinik-Kerth V.B. (2011)**, « Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: Role of NADPH oxidase », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 404, n°2, pp. 743-749.
- Rucker R.B. (2007)**, *Handbook of vitamins*, Boca Raton, Taylor & Francis.
- Saiga A., Tanabe S. et Nishimura T. (2003)**, « Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, n°12, pp. 3661-3667.
- Scandalios J.G. (2002)**, « Oxidative stress responses - what have genome-scale studies taught us? », *Genome Biology*, vol. 3, n°7, pp. 1019.1-1019.6.
- Schattenberg J.M. et Schuppan D. (2011)**, « Nonalcoholic steatohepatitis: the therapeutic challenge of a global epidemic », *Current opinion in lipidology*, vol. 22, n°6, pp. 479-488.
- Seeram N.P., Adams L.S., Zhang Y., Lee R., Sand D., Scheuller H.S. et Heber D. (2006)**, « Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n°25, pp. 9329-9339.

**Sekher Pannala A., Chan T.S., O'Brien P.J. et Rice-Evans C.A. (2001)**, « Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 282, n°5, pp. 1161-1168.

**Sellappan S. et Akoh C.C. (2002)**, « Flavonoids and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Vidalia Onions », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, n°19, pp. 5338-5342.

**Seyoum A., Asres K. et El-Fiky F.K. (2006)**, « Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids », *Phytochemistry*, vol. 67, n°18, pp. 2058-2070.

**Shahidi F. (1997)**, *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*, The American Oil Chemists Society.

**Shapiro A., Mu W., Roncal C., Cheng K.-Y., Johnson R.J. et Scarpace P.J. (2008)**, « Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding », *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 295, n°5, pp. R1370-R1375.

**Shen T., Wang X.-N. et Lou H.-X. (2009)**, « Natural stilbenes: an overview », *Natural Product Reports*, vol. 26, n°7, pp. 916-935.

**Sies H. et Stahl W. (1995)**, « Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. », *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 62, n°6, pp. 1315S-1321S.

**Silva B.M., Andrade P.B., Ferreres F., Domingues A.L., Seabra R.M. et Ferreira M.A. (2002)**, « Phenolic Profile of Quince Fruit (*Cydonia oblonga* Miller) (Pulp and Peel) », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, n°16, pp. 4615-4618.

**Silva B.M., Andrade P.B., Valentão P., Ferreres F., Seabra R.M. et Ferreira M.A. (2004)**, « Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Fruit (Pulp, Peel, and Seed) and Jam: Antioxidant Activity », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, n°15, pp. 4705-4712.

**Södergren E. (2000)**, *Lipid peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement*, Uppsala University.

**Song W., Derito C.M., Liu M.K., He X., Dong M. et Liu R.H. (2010)**, « Cellular antioxidant activity of common vegetables », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 58, n°11, pp. 6621-6629.

**Stahl W. et Sies H. (1993)**, « Physical Quenching of Singlet Oxygen and cis-trans Isomerization of Carotenoids », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 691, n°1, pp. 10–19.

**Stahl W. et Sies H. (2003)**, « Antioxidant activity of carotenoids », *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 24, n°6, pp. 345-351.

**Stalmach A., Mullen W., Nagai C. et Crozier A. (2006)**, « On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee », *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 18, n°1, pp. 253-262.

**Stumvoll M., Goldstein B.J. et Haeften T.W. van (2005)**, « Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy », *The Lancet*, vol. 365, n°9467, pp. 1333-1346.

**Suzuki S. et Umezawa T. (2007)**, « Biosynthesis of lignans and norlignans », *Journal of Wood Science*, vol. 53, n°4, pp. 273-284.

**Szkudelska K., Nogowski L. et Szkudelski T. (2009)**, « The inhibitory effect of resveratrol on leptin secretion from rat adipocytes », *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 39, n°10, pp. 899-905.

**Szliszka E., Czuba Z.P., Mazur B., Paradysz A. et Krol W. (2010)**, « Chalcones and Dihydrochalcones Augment TRAIL-Mediated Apoptosis in Prostate Cancer Cells », *Molecules*, vol. 15, n°8, pp. 5336-5353.

**Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.-O. et Dommes J. (2009)**, « Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests », *Food Chemistry*, vol. 113, n°4, pp. 1226-1233.

**Tang W.H., Martin K.A. et Hwa J. (2012)**, « Aldose Reductase, Oxidative Stress, and Diabetic Mellitus », *Frontiers in Pharmacology*, vol. 3.

**Thomas T. et Pfeiffer A.F.H. (2012)**, « Foods for the prevention of diabetes: how do they work? », *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 28, n°1, pp. 25-49.

**Traustadóttir T., Davies S.S., Stock A.A., Su Y., Heward C.B., Roberts L.J. et Harman S.M. (2009)**, « Tart Cherry Juice Decreases Oxidative Stress in Healthy Older Men and Women », *The Journal of Nutrition*, vol. 139, n°10, pp. 1896-1900.

**Tsao R. (2010)**, « Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols », *Nutrients*, vol. 2, n°12, pp. 1231-1246.

**Tsuda T., Horio F. et Osawa T. (1998)**, « Dietary cyanidin 3-O-β-d-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats », *Lipids*, vol. 33, n°6, pp. 583-588.

**Tsuda T., Horio F., Uchida K., Aoki H. et Osawa T. (2003)**, « Dietary Cyanidin 3-O-β-d-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice », *The Journal of Nutrition*, vol. 133, n°7, pp. 2125-2130.

**Tsuda T., Ueno Y., Aoki H., Koda T., Horio F., Takahashi N., Kawada T. et Osawa T. (2004)**, « Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 316, n°1, pp. 149-157.

**Turkmen N., Sari F. et Velioglu Y.S. (2005)**, « The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables », *Food Chemistry*, vol. 93, n°4, pp. 713-718.

**Upritchard J.E., Sutherland W.H. et Mann J.I. (2000)**, « Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. », *Diabetes Care*, vol. 23, n°6, pp. 733-738.

**Usenik V., Fabčič J. et Štampar F. (2008)**, « Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) », *Food Chemistry*, vol. 107, n°1, pp. 185-192.

**Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. et Telser J. (2007)**, « Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, n°1, pp. 44-84.

**Vallverdú-Queralt A., Medina-Remón A., Martínez-Huélamo M., Jáuregui O., Andres-Lacueva C. et Lamuela-Raventos R.M. (2011)**, « Phenolic Profile and Hydrophilic Antioxidant Capacity as Chemotaxonomic Markers of Tomato Varieties », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, n°8, pp. 3994-4001.

**Vermerris W. et Nicholson R.L. (2006)**, *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer.

**Weinreb O., Amit T., Mandel S. et Youdim M.B.H. (2009)**, « Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties », *Genes & Nutrition*, vol. 4, n°4, pp. 283-296.

**Wilson J.X. (2002)**, « The physiological role of dehydroascorbic acid », *FEBS Letters*, vol. 527, n°1-3, pp. 5-9.

**Wolfe K.L., Kang X., He X., Dong M., Zhang Q. et Liu R.H. (2008)**, « Cellular antioxidant activity of common fruits », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 56, n°18, pp. 8418-8426.

**Wolfe K.L. et Liu R.H. (2007)**, « Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 55, n°22, pp. 8896-8907.

**Wu L.L., Chiou C.-C., Chang P.-Y. et Wu J.T. (2004)**, « Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics », *Clinica Chimica Acta*, vol. 339, n°1-2, pp. 1-9.

**Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E. et Prior R.L. (2004)**, « Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, n°12, pp. 4026-4037.

**Wu X., Gu L., Holden J., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Beecher G. et Prior R.L. (2004)**, « Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study », *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 17, n°3-4, pp. 407-422.

**Zhang D. et Hamauzu Y. (2004)**, « Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking », *Food Chemistry*, vol. 88, n°4, pp. 503-509.

Publications :

- Nathalie REIX, Audery PARAT, Elodie SEYFRITZ, Rimmelt VAN DER WERF, Virginie EPURE, Nicolas EBEL, Louis DANICHER, Eric MARCHIONI, Nathalie JEANDIDIER, Michel PINGET, Yves FRERE, Séverine SIGRIST. *In vitro* uptake evaluation in Caco-2 cells and *in vivo* results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 437, n°1–2, pp. 213-220.
- Rimmelt VAN DER WERF, Séverine SIGRIST, Stéphanie ROS, Dalal AOUDE-WERNER, Julie LEGRANDOIS, Saïd ENNAHAR, Fabien DIGEL, Eric MARCHIONI. Chromatographic on-line detection of bioactives in food. *Functional Foods in Health and Disease* 2013; 3(8):323-331

Publication soumise :

- Rimmelt VAN DER WERF, Christophe MARCIC, Ali KHALIL, Séverine SIGRIST, Eric MARCHIONI. Antioxidant capacity in green and roasted coffee extracts. *LWT – Food Science and Technology*

En cours de rédaction :

- Rimmelt VAN DER WERF, Stéphanie ROS, Julie LEGRANDOIS, Fabien DIGEL, Saïd ENNAHAR, Séverine SIGRIST, Eric MARCHIONI. Determination of active radical scavenging compounds in polar fruit and vegetable extracts by an on-line HPLC method.
- Rimmelt VAN DER WERF, Stéphanie ROS, Julie LEGRANDOIS, Séverine SIGRIST, Eric MARCHIONI. In vitro and cellular anti-oxidant capacity against insulin-induced oxidative stress in common fruit and vegetables.

Poster :

- Rimmelt VAN DER WERF, Christophe MARCIC, Ali KHALIL, Séverine SIGRIST, Eric MARCHIONI. Impact of the roasting process on antioxidant compounds in coffee. *International conference : Chemical Reactions in Foods VII. Novembre (12-14) 2012, Prague, Czech Republic.*



## Evaluation du pouvoir anti-oxydant des aliments. Recherche de leurs effets modulateurs sur le stress oxydant dans le cas du diabète.

L'obésité et le diabète de type 2 s'accompagne généralement d'un stress oxydant chronique, participant à l'installation et la progression du diabète, mais également à l'apparition de nombreuses complications dont les macro- et micro-angiopathies. Certains aliments, comme les fruits et légumes naturellement riches en molécules anti-oxydantes, représentent ainsi un réel potentiel de prévention dans ce contexte. Cette étude s'est intéressée au pouvoir anti-oxydant des fruits et légumes. Nous avons démontré que la majorité des fruits et légumes doivent leur capacité anti-radicalaire à des composés polaires. Leur étude par une méthode séparative (HPLC) couplée à une détection spécifique de capacité anti-radicalaire, a permis de révéler quelles sont les molécules réellement actives. Le chou rouge a été révélé comme aliment à fort potentiel anti-oxydant, de par la présence de nombreuses cyanidines dotés de capacités anti-radicalaires. L'étude *in vitro* sur un modèle cellulaire (RINm5F) a confirmé l'action anti-radicalaire des polyphénols des fruits et légumes. L'extrait de chou rouge a ainsi permis la suppression du stress oxydant induit par un hyperinsulinisme. Enfin, une étude *in vivo*, sur le modèle de rat diabétique, a permis de confirmer les effets anti-oxydants et anti-diabétiques du chou rouge, même lorsque sa consommation est associée à un régime hypercalorique. Cependant, le chou rouge doit être associé à une alimentation équilibrée afin d'être bénéfique à long terme.

Mots clés : anti-oxydant, polyphénols, aliments, HPLC, diabète, obésité, stress oxydant

Obesity and type 2 diabetes is generally accompanied by a chronic state of oxidative stress, implicated in the development of complications such as macro- and micro-angiopathies. Food, and particularly fruit and vegetables naturally rich in radical scavenging compounds, represent a real preventive potential. This study was focused on the antioxidant capacity of fruit and vegetables. We demonstrated that the majority of fruit and vegetables owe their anti-oxydant capacity to a class of polar compounds. The study by means of a separative technique (HPLC) hyphenated with specific radical scavenging capacity detection, allowed to reveal the real active compounds. Red cabbage has shown amongst the highest antioxidant potential through the presence of numerous radical scavenging cyanidins. *In vitro* studies, using the RINm5f cell line, confirmed the radical scavenging activity of fruit and vegetables polyphenols. The red cabbage extract suppressed the hyperinsulinemic-induced oxidative stress. Finally, an *in vivo* study, using a diabetic rat model, confirmed the antioxidant and antidiabetic effects of red cabbage, even when its consumption is associated to a hypercaloric diet. However, the red cabbage must be associated with an equilibrated diet in order offer beneficial effects in the long term.

Keywords : antioxidant, polyphenols, food, HPLC, diabetes, obesity, oxidative stress