

UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

IMPACT SANTÉ DES PROCÉDÉS DE PRÉPARATION DES ALIMENTS RICHES EN POLYPHÉNOLS : Chocolat, Vin, Thé, ...

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

Mention : Chimie des Substances Naturelles

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
FORMATION DOCTORALE : Interface Chimie Biologie :
Systèmes Moléculaires à visée Thérapeutique

N° DISCIPLINE : 50, N° DE SECTION DU CNU : 40

SPÉCIALITÉ : Pharmacognosie

PAR

M. Bosson Antoine KOUAME

Maître ès Sciences Pharmacopée Africaine

Soutenue le 31 mars 2006
Devant le jury composé de :

Mr. José CHULIA	Professeur, Université de Limoges	Rapporteur
Mme. Laurence BALAS	Docteur, CNRS Montpellier	Présidente
Mme. Monique ZECHES-HANROT	Professeur, Université de Reims	Rapporteur
Mr. Joseph VERCAUTEREN	Professeur, Université Montpellier 1	Directeur de Thèse

UNIVERSITE MONTPELLIER I

Présidente : Mme le Professeur Dominique DEVILLE de PERIERE

FACULTE DE PHARMACIE

Doyen : Professeur Alain TEROL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Rentrée 2005

M.	ANDARY	Claude	Botanique et Cryptogamie
M.	AUDRAN	Michel	Physique et Biophysique
M.	BATAILLE	Bernard	Energétique et Génie des Procédés
Mme	BILAK	Estelle	Bactériologie et Virologie
M.	BLAISE	Alain	Oenologie
M.	BONNET	Pierre	Chimie Organique
M.	BOUDEVILLE	Philippe	Chimie Générale et Minérale
Mme	BRES	Janine	Pharmacocinétique
M.	BROUILLET	Jean-Paul	Biochimie Générale et Clinique
Mme	CASELLAS	Claude	Sciences de l'Environnement
Mme	CASSANAS	Geneviève	Physique Industrielle et Traitement de l'Information
M.	CHAPAT	Jean-Pierre	Chimie Organique
M.	CROS	Gérard	Pharmacologie
M.	DELARBRE	Jean-Louis	Physique Moléculaire et Structurale
M.	DELONCA	Henri	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	DEVOISSELLE	Jean-Marie	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	ESCALE	Roger	Chimie Organique
Mlle	FABRE	Huguette	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	FULCRAND	Pierre	Chimie Thérapeutique
M.	GALLEYRAND	Jean-Claude	Physique et Biophysique
M.	GIAIMIS	Jean	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	GORENFLOT	André	Biologie cellulaire et Moléculaire
M.	GRASSY	Gérard	Chimie Organique
M.	GRIMMONPREZ	Louis	Biochimie Générale et Clinique
M.	GRIS	Jean-Christophe	Hématologie
Mlle	HANSEL	Sylvie	Pharmacie Clinique
Mme	MAILLOLS	Hélène	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mme	MALLIE	Michèle	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	MARTINEZ	Jean	Pharmacochimie
M.	MAURY	Luc	Physique Moléculaire et Structurale
M.	MICHEL	Alain	Pharmacologie
M.	MODAT	Guy	Physiologie
Mme	MONLEAUD	Jacqueline	Droit et Économie de la Santé
Mme	MULLER	Agnès	Physiologie/Histologie Pathologique
M.	PELISSIER	Yves	Pharmacognosie
Mme	PICOT	Bernadette	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	PRECIGOUT	Éric	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	PUEL	Jean-Luc	Physique et Biophysique - Audioprothèse

M.	RAMBAUD	André	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
Mlle	RAPIOR	Sylvie	Botanique et Cryptogamie
M.	RAYNAUD	Eric	Biochimie
M.	ROSSI	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	ROUMESTAND	Christian	Biochimie Structurale
M.	ROUSSEL	Jean-Louis	Botanique et Cryptogamie
Mme	SIMEONDE BUOCHBERG	Michèle	Bactériologie et Virologie
M.	TEROL	Alain	Chimie Générale et Minérale
M.	VERCAUTEREN	Joseph	Pharmacognosie
Mlle	VIAN	Laurence	Toxicologie
M.	ZINE	Azel	Audioprothèse

UNIVERSITE MONTPELLIER I

Présidente : Mme le Professeur Dominique DEVILLE de PERIERE

FACULTE DE PHARMACIE

Doyen : Professeur Alain TEROL

MAITRES DE CONFERENCES

Rentrée 2005

M.	AKNINE	Achour	Physique Biophysique – Audioprothèse
M.	ALLAIN	Philippe	Pharmacognosie
Mme	ARMYNOT DU CHATELET	Anne-Marie	Bactériologie et Virologie
Mme	ARTIS	Anne-Marie	Chimie Thérapeutique
Mme	AUBERT-POUESSEL	Anne	Pharmacie Galénique
M.	BEGEL	Michel	Didactique Physiologie
Mme	BEGU	Sylvie	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	BERGE	Gilbert	Chimie Thérapeutique
M.	BERTOUT	Sébastien	Immunologie-Parasitologie et Mycologie Médicale
Mme	BICHON	Florence	Pharmacologie
Mlle	BLANCHIN	Marie-Dominique	Chimie Analytique et Bromatologie
Mme	BLONDEL	Mary	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	BOMPART	Jacques	Chimie Organique
M.	BOUDARD	Frédéric	Immunologie
Mme	BOURRET	Évelyne	Physique Moléculaire et Structurale
Mlle	BRESSOLLE	Françoise	Pharmacocinétique
M.	CARCY	Bernard	Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mme	CASADEBAIG	Jacqueline	Pharmacie Galénique
Mme	CASTEX	Françoise	Immunologie
Mlle	CHATEAU	Marie-Thérèse	Biologie Cellulaire
M.	CHAUVET	Alain	Chimie Générale et Minérale
M.	CHAVANIEU	Alain	Biochimie Structurale
Mlle	CHOQUET	Armelle	Toxicologie
Mme	COCIGLIO	Marylène	Pharmacologie
Mlle	COHEN	Pascale	Immunologie
Mme	COSSON	Laurence	Botanique et Cryptogamie
M.	COUDANE	Jean	Chimie des Matériaux
Mme	CUQ	Catherine	Pharmacologie
M.	CUQ	Pierre	Toxicologie
M.	DARMANADEN	Roland	Chimie Thérapeutique
M.	DELBECQ	Stéphane	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	DURAND	Denis	Chimie Générale et Minérale
M.	DURU	Christian	Pharmacie Galénique
Mlle	DUSART	Ghislaine	Bactériologie et Virologie
M.	EL GHZAOUI	Abdelsam	Physique Industrielle et Traitement de l'Information
M.	ENGEL	Robert	Chimie des Matériaux
M.	EVARD	Alexandre	Toxicologie
Mme	FABRE	Françoise	Physiologie
M.	FARINES	Vincent	Chimie analytique, Oenologie

Mme	FAVEREAU	Danièle	Biochimie Générale et Clinique
Mlle	FENET	Hélène	Chimie analytique et Bromatologie
Mme	FINE	Françoise	Toxicologie
Mme	FLORAC	Marie-Elisabeth	Botanique et Cryptogamie
M.	FOULONGNE	Vincent	Bactériologie et Virologie
Mme	FOURCROY	Stella	Physiologie
Mme	FOURNAJOUX	Josyane	Physique et Biophysique
M.	GAGNE	Didier	Biochimie Générale et Clinique
M.	GARREAU	Henri	Chimie des Matériaux
M.	GAUDY	Daniel	Pharmacie Clinique
Mme	GOMEZ HERNANDEZ	Maria Elena	Sciences de l'Environnement
Mme	GOZE	Catherine	Chimie Thérapeutique
Mme	GUIBAL	Jacqueline	Immunologie
Mme	GUIBERT	Marie-Sophie	Physique et Biophysique
Mme	GUIDICELLI	Claudette	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme	ILLES	Suzanne	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	JEANJEAN	Bernard	Chimie Générale et Minérale
M.	LAGET	Jean-Pierre	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mlle	LAMBERT	Karen	Biochimie Générale et Nutrition
M.	LARROQUE	Michel	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	LASSERRE	Yves	Pharmacie Galénique
M.	LISOWSKI	Vincent	Chimie Thérapeutique
Mme	MARION	Chantal	Pharmacognosie
Mme	MARY	Sophie	Biochimie Générale et Clinique
Mme	MASQUEFA	Carine	Chimie Organique
Mme	MENAGE	Karina	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	MERCIER	Eric	Hématologie
M.	MESTRES	Jean-Paul	Chimie Analytique
Mme	MESTRES	Gilberte	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mme	MILHAU	Jacqueline	Pharmacologie
M.	MILHAVET	Jean-Claude	Chimie Organique
Mme	NIELLOUD	Françoise	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mlle	NURIT	Josyane	Chimie Générale et Minérale
Mlle	PERRIN	Catherine	Chimie Analytique
M.	PERSONNE	Christian	Bactériologie et Virologie
Mlle	PEYRIERE	Hélène	Pharmacie Clinique
Mme	PHAM	Tuyet Nga	Physique et Biophysique
M.	POUCHERET	Patrick	Pharmacologie
M.	SABATIER	Robert	Physique Moléculaire et Structurale
Mme	SALHI	Sharon	Immunologie
M.	SUBRA	Gilles	Pharmacochimie
M.	SUSPLUGAS	Paul	Pharmacognosie
Mlle	TEYSSIER	Corinne	Bactériologie et Virologie
M.	TEISSEDRE	Pierre-Louis	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	VACHOUD	Laurent	Physique Moléculaire et Structurale
Mlle	VIE	Marie-Thérèse	Physique et Biophysique
Mlle	VIGOR	Claire	Pharmacognosie
Mlle	VIVIEN	Myrtille	Physique Industrielle et Traitement de l'Information
Mlle	VO HOANG	Yen	Chimie Organique

Remerciment

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements, aux quatre membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Madame le Professeur Monique ZECHES-HANROT et Monsieur le Professeur José CHULIA, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Madame le Docteur Laurence BALAS, d'examiner ce mémoire, et pour votre disponibilité, sans oublier toute l'équipe de chimie.

Monsieur le professeur Joseph VERCAUTEREN, je voudrais vous dire merci de tout cœur pour m'avoir intégré dans votre équipe durant ces années. Merci pour tout.

Je tiens à laisser une trace écrite de mes remerciements à l'endroit de toute l'équipe de Pharmacognosie, avec laquelle j'ai partagé ces trois années de sciences et relations très enrichissantes : de

Chantal, je garde une idée de douceur et d'efficacité déconcertante.

Jocelyn, un bon travailleur humoristique

David, une personnalité posée,

Sylvie, Une très bonne collègue de Thèse

Claire, pour ton sens de la responsabilité.

Je tiens aussi à remercier la république de Côte d'Ivoire pour son soutien financier à toute la jeune diaspora Ivoirienne ici et ailleurs

Une pensée pour tous les camarades de l'AMEEIM, de France et de Belgique.

Une pensée pour Dominique, Clément, Emmanuel et toute ma grande famille KOUAME et belle famille AMANZOU en Côte d'Ivoire sans oublier AKA Eba et enfin KOUAKOU Bla, toi qui possède la connaissance des plantes pour l'utilité commune.

Déborah, ma fille je t'aime et toi Brigitte « minbouet » Que Dieu vous bénisse et vous élève.

Table des matières

I. Première partie : Étude bibliographique.....	6
I.1 Généralités sur les polyphénols.....	7
I.2 Les procédés de traitement des aliments	15
I.3 Les propriétés santé des polyphénols	26
I.4 L'impact des transformations sur les structures et propriétés biologiques des polyphénols	30
II. Deuxième partie : Travaux personnels	35
II.1 Introduction	35
II.2 Extraction des polyphénols du cacao et de pépins de raisins	37
II.3 Réactivité des polyphénols C1, C2 et C3 en milieu alcalin	44
II.4 Étude des polyphénols d'un chocolat commercial	61
II.5 Activité biologique sur des cellules isolées	67
II.6 Conclusion et perspective	82
III. Partie expérimentale.....	84
III.1 Matériels et méthodes.....	85
III.2 Extraction du dimère B2 à partir de l'extrait de pépins de raisin.....	93
III.3 Epimérisation et réarrangement en milieu basique	94
III.4 Méthode d'extraction et de caractérisation des polyphénols du chocolat commercial	97
III.5 Investigation de l'activité biologique des composés isolés	99
III.6 Analyse RMN 1D et 2D des composés isolés.....	105
IV. Liste des publications	111
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	114

Abréviations

^{13}C	carbone 13	HDL	High Density Lipoprotein
^1H	proton	Hex	Hexane
Abs	absorbance	HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
AcOEt	acétate d'éthyle	IL	Interleukine
AcOH	acide acétique	IP	Iodure de propidium
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	IP3	Inositol tri phosphate
API	Atmospheric Pressure Ionization	J (Hz)	constante de couplage en hertz
CCM	Chromatographie sur Couche Mince	LDL	Low Density Lipoprotein
CD₃OD	méthanol deutéré	LIF	Liaison Interflavanique
CH₂Cl₂	dichlorométhane	m/z	masse/charge
CI₅₀	Concentration Inhibant 50 % des cellules	m	multiplet
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance	Me₂CO	acétone
CoA	Coenzyme A	MeCN	acétonitrile
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge	MeOH	méthanol
d	doublet	MHz	Mega Hertz
dd	doublet dédoublé	mM	Millimolaire
DHT	dihydrotestostérone	mn	Minute
dl	doublet large	mV	millivolt
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle	n-BuOH	Butan-1-ol
EOR	Espèce Oxygénée Réactive	O₂	oxygène
EPT	Extrait Polyphénolique Total	PBS	Phosphate Buffer Saline
ESI	Electrospray ionisation	PDA	Photodiode array
Et₂O	éther diéthylique	Rf	rapport frontal
EtOH	éthanol	RLO	Radicaux Libres Oxygénés
FAB	Fast Atom Bombardement	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
FC	Folin-Ciocalteu	RPM	Rotation Par Minute
FRAP	Ferric Reducing-Antioxidant Power	S	singulet
H₂O	eau	SAB	Sérum Albumine Bovine
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène	SM	Spectrométrie de Masse
		SOD	Superoxyde Dismutase
		SVF	Sérum de Veau Foetal
		TFA	Acide Trifluoroacétique
		UV	UltraViolet
		δ (ppm)	déplacement chimique exprimé en partie par million du champ
		VITE	Vitamine E

Avertissement

Pour désigner les composés isolés ou réarrangés décrits dans ce travail, nous avons utilisé la lettre C (pour Composé) suivie d'un numéro (**C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6** et **C7**). Cette nomenclature est sans rapport avec celle habituellement utilisée pour désigner les polyphénols de cette série, ni même celle officielle[1].

INTRODUCTION

L'alimentation est « vitale » pour l'homme, mais plus encore que sa quantité, sa composition est certainement le facteur qui a l'impact le plus important sur son état de santé. Cette conviction, forgée par l'expérience accumulée sur des millénaires, l'homme l'a acquise depuis fort longtemps. On en retrouve même des traces écrites plus de 400 ans avant JC. « *Que ton alimentation soit ta première médecine* » est un des nombreux aphorismes rapportés par Hippocrate dans son *Corpus Hippocraticum*. Le plus étonnant, c'est sûrement que cette sentence n'ait jamais été remise en cause.

Du temps où il prélevait ses aliments directement dans la « Nature », et qu'il ne leur faisait subir que des transformations « naturelles » (fermentation, salaison, ...), cette affirmation ne faisait probablement aucun doute. De nombreuses études épidémiologiques[2, 3] ont cherché à confirmer, s'il en était besoin, cet impact de l'alimentation sur la santé[4-8]. Elles ont permis d'observer qu'une alimentation « équilibrée », de type méditerranéen[9-11], est fortement associée à un bénéfice santé maximal[12, 13]. Les études visant à trouver les explications scientifiques à ces observations se comptent par milliers. Elles ont clairement montré que certaines catégories de « nutriments », dont celle des antioxydants très particulièrement[14, 15], sont reliées à une forte diminution de l'incidence des principales pathologies (cardiovasculaires[16, 17], inflammatoires[18, 19], dégénératives[20, 21], cancéreuses[22-25]).

Ces dernières décennies, il est surtout constaté une hausse spectaculaire de la longévité[26, 27] qui gagne près d'un trimestre par an. Une personne qui naît aujourd'hui en France, par exemple, a une espérance de vie d'environ 87 ans, si c'est une femme, et 79, si c'est un homme. Il est légitime de penser qu'elle serait due aux progrès de la médecine et à l'amélioration de l'hygiène de vie, mais **ne serait-elle pas due** aussi, et même en grande partie, **à l'augmentation de la qualité de l'alimentation ?**

Vers une alimentation « raisonnée ». Pour répondre à cette question, et savoir dans quels sens la faire progresser encore, les scientifiques ont eu comme objectif principal ces dernières années, de mieux connaître la composition des aliments en métabolites secondaires et autres vitamines qui font l'objet de recherches approfondies en termes tant de diversité structurale (des « tables de compositions alimentaires » recensent le contenu de centaines de

légumes et fruits[28]) que de propriétés biologiques individuelles[29-31]. Ces connaissances permettent aux enquêtes épidémiologiques d'établir des « corrélations » plus fines, entre abondance ou qualité de certains composés des légumes ou des fruits et « bénéfice santé »[32]. Leurs conclusions, presque univoques, suggèrent que les polyphénols et, plus généralement les antioxydants, mis à la disposition de l'homme à travers son alimentation, sont d'un intérêt considérable pour sa santé[31, 33]. De nouvelles hypothèses sur les mécanismes d'action des métabolites végétaux sont élaborées, à partir desquelles des tests nouveaux permettent d'évaluer plus finement l'impact d'aliments « calibrés », « enrichis » en métabolites actifs, sur la santé[21, 34, 35]. Parmi les facteurs d'amélioration potentielle des aliments figurent les « procédés de traitement ». Aujourd'hui, il ne s'agit plus seulement de cuisson, de salaison ou de fermentation. L'homme prépare des produits de « quatrième gamme » (fruits et légumes frais préemballés : salades classiques ou mélangées, crudités râpées ou découpées) ; voire même, de « cinquième gamme » : plats crus ou cuisinés à l'avance, puis tout de suite congelés et conservés ainsi jusqu'à leur utilisation par le consommateur (procédé dit « de liaison froide ») ! À moyen et long terme, quelles répercussions peuvent avoir sur notre santé de telles pratiques ? De nouvelles recherches sont initiées avec pour objectif de fournir des données précises sur « l'origine » et la valeur du bénéfice santé de ces nouveaux aliments et d'en apprécier l'utilité. La découverte et la mise au point de tels aliments constituent un enjeu capital de santé publique pour l'ensemble des nations. Il en va ainsi des « recommandations » pour un « comportement alimentaire sain » qui auraient un effet direct sur la maîtrise des dépenses de santé, qui est même déjà évalué[36] !

Notre contribution : Certaines techniques de préparation des aliments reproduisent des conditions que nous savons favorables à des réactions et/ou réarrangements chimiques des composés naturels initialement présents dans nos aliments. Cependant, ces transformations peuvent avoir de profonds retentissements sur les propriétés biologiques et donc, un impact insoupçonné sur la qualité « santé » des aliments les plus riches en polyphénols, tels que le chocolat, le vin ou le thé. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à apporter des éléments de réponse dans ce domaine, en nous restreignant à la question du devenir des polyphénols (tanins catéchiques) dans ces principaux aliments et boissons au cours de leur préparation et dans leurs contributions réelles dans les vertus attribuées à ces mêmes aliments.

Au cours de la fabrication des produits chocolatés, par exemple, un traitement en milieu alcalin de la masse de cacao sert à produire la couleur plus ou moins intense du

chocolat. Au cours de cette étape, épimérisation et réarrangements peuvent survenir. Notamment, les flavanols (catéchine, épicatechine et de leurs polymères) sont des molécules chirales susceptibles de s'épimériser ou de subir des réarrangements dans de telles conditions de température ou de pH, mais les modifications structurales induites ne sont pratiquement pas détectables par les moyens d'analyse « conventionnels » (les monomères forment leurs homologues de la série antipodale...).

Pour mener à bien cette étude, nous avons dû considérer, tout d'abord :

- les **aspects structuraux** relatifs aux « réarrangements », en préparant les composés de référence issus des polyphénols naturels (les deux flavan-3-ols monomères et un de leurs oligomères, le dimère B2), par un « traitement » simulant les procédés agroalimentaires. Nous les avons alors utilisés pour rechercher leur présence dans les différents produits commerciaux (chocolat, vin),
- Puis le **bénéfice santé** qui peut en découler, en étudiant *in vitro* les propriétés différentielles avec les produits naturels. Les composés épimérisés et réarrangés ont fait aussi l'objet d'une évaluation de leur activité biologique, antioxydante, antiproliférative et de leur mécanisme d'action sur certains récepteurs membranaires aux androgènes, impliqués dans le cancer de la prostate.

I. Première partie : Étude bibliographique

I.1. Généralités sur les polyphénols

I.2. Les procédés de traitement des aliments

I.3. Les propriétés biologiques des polyphénols

I.4. L'impact des transformations sur les structures et propriétés biologiques des polyphénols

I.1 Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols sont des composés qui comportent plusieurs fonctions **hydroxyles** sur des noyaux **aromatiques** qui ont, bien souvent, une appellation consacrée par l'usage et qui sont décrits dans la Figure 1.

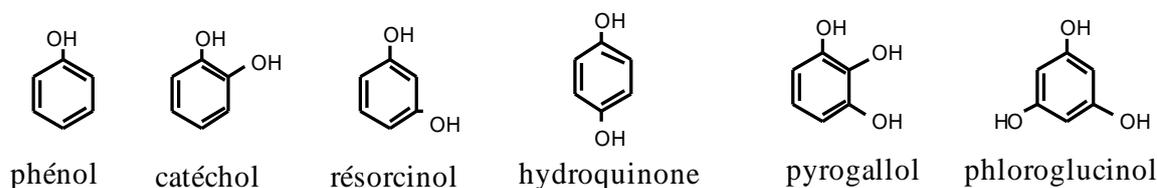


Figure 1 Les noms consacrés par l'usage des principaux noyaux phénoliques

La fonction hydroxyle peut être libre ou engagée dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside). Par extension, on entend aussi par polyphénols, tous leurs dérivés esters, éthers, hétérosides etc. Une classification, basée sur la biogenèse, est la meilleure approche pour une description de cette famille de composés naturels[37-39].

I.1.1 Biosynthèse des polyphénols

Dans la nature, la synthèse du noyaux aromatique est le fait des seuls végétaux et micro-organismes. Les polyphénols sont des molécules fabriquées exclusivement par les plantes. La Figure 2 présente un schéma simplifié de cette biosynthèse. La synthèse des polyphénols majoritaires, suit les deux premières voies A et B de l'aromagenèse et surtout la première. Leur biogenèse procède de ces deux voies métaboliques à savoir celle de l'acide **shikimique** et des **polyacétates**. Il existe cependant une **voie mixte** : shikimates + acétates qui est à l'origine de la classe des **flavonoïdes** au sens large[40].

Première partie : Etude bibliographique

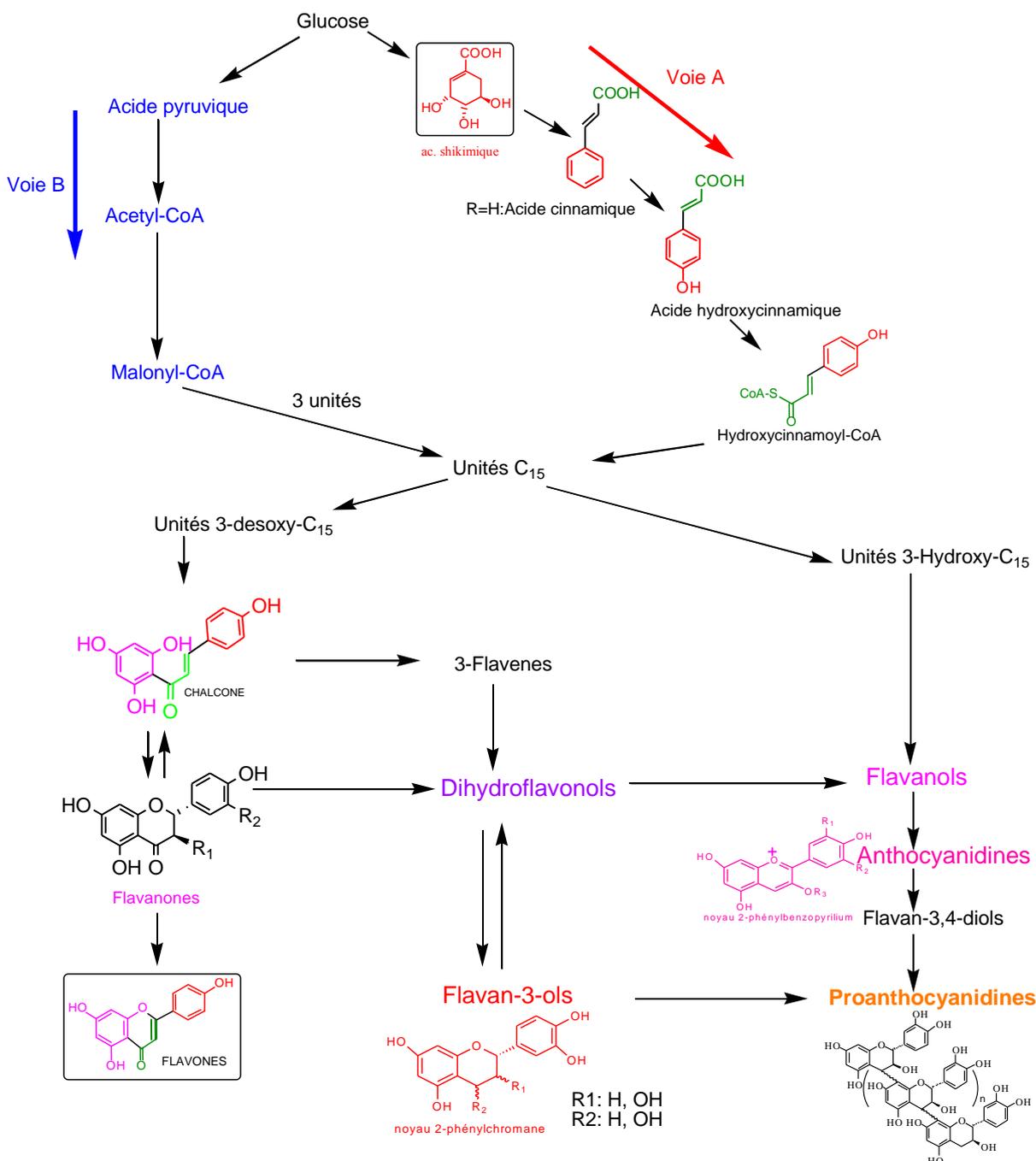


Figure 2 : Schéma simplifié de la biosynthèse des flavanoides (R1= H, OH et R2= H, OH)

Les preuves de leur présence chez les végétaux sont nombreuses : couleur des fleurs jaunes (flavonoïdes), rougissement des feuilles à l'automne et couleur des fruits rouges (anthocyanes) mais, le brunissement d'une plante lésée ou attaquée par la pourriture est sûrement l'un des signes les plus visibles de l'intervention des polyphénols dans sa protection.

Les polyphénols sont les principales substances de défense dans les plantes (phytoalexines). Par exemple, dans des baies de raisins botrytisées (pourriture noble), des

polyphénols, dont le resvératrol, sont synthétisés en plus grande quantité pour lutter contre l'invasion du champignon.

I.1.2 Structures des polyphénols

Les phénols et acides phénols

Ils rassemblent les composés organiques possédant au moins un hydroxyle phénolique et éventuellement une fonction acide. On distingue :

- **les phénols simples** (catéchol, gâïacol, phloroglucinol, l'hydroquinone voir figure 1) ;
- **les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque** ce sont des composés en C₆-C₁, issus de l'hydroxylation de l'acide benzoïque ;
- **les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique** ce sont des composés en C₆-C₃ (acide 4-coumarique, caféique, férulique, sinapique). Ils sont souvent estérifiés **en esters d'alcools** (acides mono- et dicaféyl-tartrique, la féruloyl-tartrique).

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes *lato sensu* sont des pigments quasi universels des végétaux, hydrosolubles. On distingue :

- les flavones et les flavonols voir tableau 1, cette classe représente la majorité des flavonoïdes *stricto sensu* connus. Le cycle A est, dans la majorité des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés ;
- le squelette flavonoïde est composé de 15 carbones organisés en C₆-C₃-C₆. Il comporte deux noyaux aromatiques, reliés par un chaînon dit propanoïde. Selon la position des cycles aromatiques sur ce chaînon, on peut distinguer trois familles de composés : les **flavonoïdes** proprement dits (organisés en 1,3-diarylpropane), les **isoflavonoïdes** (1,2-diarylpropanes) et les **néoflavonoïdes** (1,1-diarylpropanes). Le tableau 1 résume les principales structures des flavonoïdes et quelques classes de composés et des exemples qui en découlent.

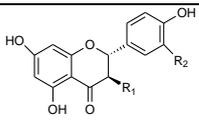
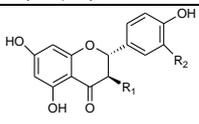
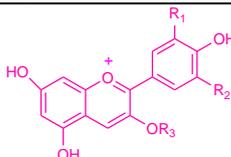
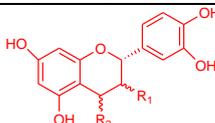
structure	classe	Exemple			
 <p>noyau 2-phénylchromanone</p>	R ₁ =H, flavone R ₁ =OH, flavonol		R ₁	R ₂	
		Apigénine	H	H	
		quercétine	OH	OH	
 <p>noyau 2-phénylchromanone</p>	R ₁ =H, flavanone, chalcone R ₁ =flavanonol		R ₁	R ₂	
		Naringénine	H	H	
		taxifoliol	OH	OH	
 <p>noyau 2-phénylbenzopyrylium</p>	Anthocyanes		R ₁	R ₂	R ₃
			OH	H	Glc
			OCH ₃	H	Glc
 <p>noyau 2-phénylchromane</p>	R ₁ =OH, R ₂ =H, flavan-3-ol R ₁ =OH, R ₂ =OH flavan-3,4-diol		R ₁	R ₂	
		(-)-Épicatéchine	·····OH	H	
		(+)-Catéchine	—OH	H	

Tableau 1 : Structure des flavonoïdes

Les stilbénoides

Ce sont des polyphénols constitués de deux cycles aromatiques séparés par un pont éthane ou éthène, en l'occurrence les benzyles et les stilbènes, ainsi que les produits qui leur sont biosynthétiquement rattachés : phénanthrènes, 9,10-dihydrophénanthrènes, phényldihydroisocoumarines. Les stilbènes peuvent être libres ou hétérosidiques. Le *trans*-resvératrol est une phytoalexine caractéristique du vin.

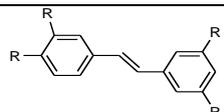
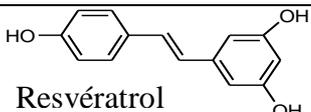
classe	squelette	structure	Nature de R	exemple
Stilbène	C6-C2-C6		H, OH ou OGlc	 Resvératrol

Tableau 2 : Structure des principaux stilbénoides

Les tanins

Les tanins sont des polyphénols dont l'unité de base est plusieurs fois représentée. La nature de cette unité permet de les classer en deux familles : les tanins hydrolysables[41] (ou tanins galliques) qui sont des esters de l'acide gallique et du glucose, et les tanins catéchiques ou proanthocyanidoliques. Pour ces derniers, l'unité monomère est un flavan-3-ol dont le carbone 3 peut exister sous les deux configurations 3(*R*) dans le cas de la (+)-catéchine et 3(*S*)

pour la (-)-épicatéchine. Ces monomères peuvent s'oligomériser par formation de liaisons covalentes entre les centres nucléophiles (positions 6 et 8), et le carbone 4 qui devient électrophile (cationique) à partir de son précurseur biogénétique, le flavan-3,4-diol (voir tableau 1). La liaison entre deux unités monomères, encore appelée liaison interflavanique, est en général de type 4-6 ou 4-8 par référence aux atomes de carbones à l'origine de cette liaison (figure 3).

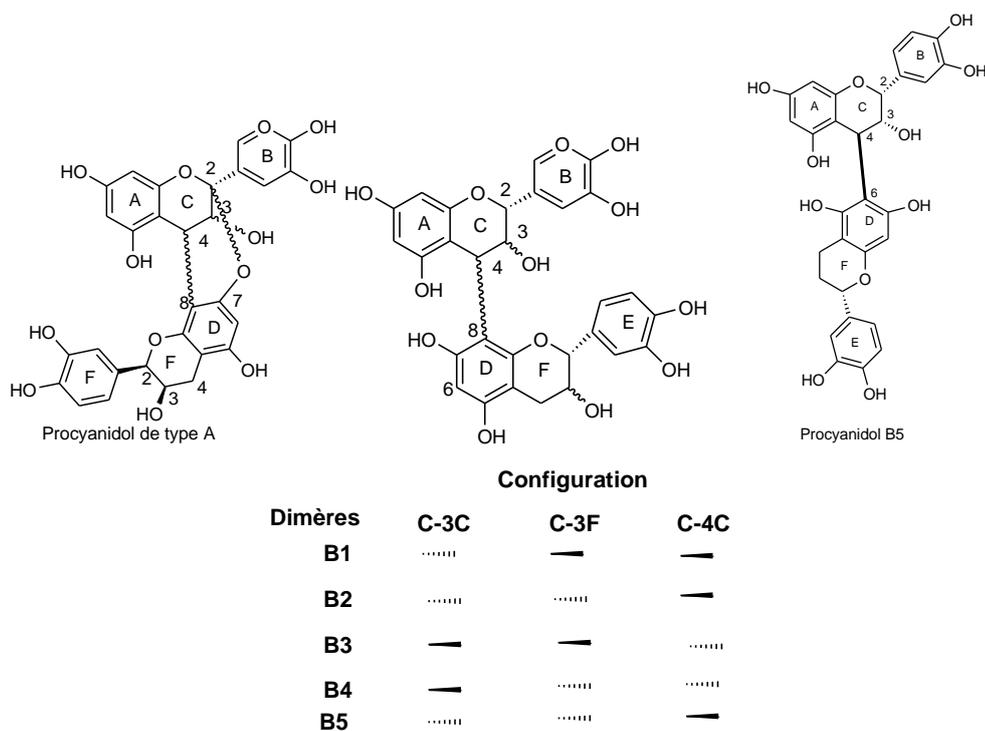


Figure 3 : Différent types de dimères de type A et B avec liaison interflavanique 4-8 et 4-6 et différentes configurations au niveau des carbones 3 et 4 des cycle C et F selon les dimères

L'ouverture des cycle C ou F avec formation d'une méthylène quinone intermédiaire et la refermeture des cycle C ou F par attaque de cette méthylène quinone par l'un des différents groupes hydroxyles situés à proximité peut conduire à différents réarrangements et par conséquent différentes structures. La configuration du groupe hydroxyle 3(R) ou 3(S) est susceptible d'orienter la réaddition du groupe hydroxyle sur la face *re* ou *si* de la double liaison de la méthylène quinone intermédiaire. En milieu acide ou basique comme lors des opérations d'alcalinisation et de vinification, l'ouverture du cycle C peut se produire facilement et par conséquent conduire à plusieurs possibilités de re-additions.

I.1.3 Les principales sources alimentaires de polyphénols

En s'alimentant par les végétaux, l'organisme humain sélectionne les vitamines antioxydantes (E et C) qui le protègent[42]. Cependant, notre alimentation renferme d'autres substances tout autant actives en l'occurrence les polyphénols. Certains végétaux sont très riches en polyphénols, et ceux-ci sont la base de nos aliments comme le thé, le raisin et ses boissons, le cacao qui feront l'objet de cette étude.

Certains aliments et boissons comme les pommes, le raisin, le thé, le chocolat et le vin rouge sont particulièrement riches en tanins catéchiques[43].

Le chocolat et la poudre de cacao

Produit principal à forte valeur ajoutée issu de la transformation du cacao, le chocolat peut se définir comme une dispersion quasi anhydre de très fines particules non grasses (saccharose, protéine, minéraux ...) dans une phase grasse issue exclusivement du cacao dans le cas d'un chocolat noir, mais provenant également du lait dans le cas du chocolat blanc ou au lait[44].

Outre les qualités gustatives et nutritionnelles du chocolat, les fèves de cacao, matière de base dans la fabrication du chocolat (beurre de cacao ou poudre de cacao suivant le procédé industriel [45, 46]), présentent de nombreux constituants parmi lesquels on trouve les protéines (20 %) et les polyphénols (de 15 à 20%). Ainsi, près d'une quarantaine de polyphénols ont été identifiés ou isolés du cacao à ce jour [47-79]. Parmi les plus abondant on trouve la (-)-épicatéchine, la (+)-catéchine, et leurs oligomères dont les dimères B2, B5, et ceux de type A[70].

Le vin

Les polyphénols sont très abondants aussi bien dans le jus de raisin que dans le vin. Ce sont des monomères, des dimères et surtout, des polymères de la catéchine, de l'épicatéchine et des dérivés galloylés. Ils sont accompagnés, selon les variétés de vin, d'anthocyanosides et de flavonoïdes. Dans les vins rouges, la composition varie selon le mode de préparation (la plus grande partie restant dans les marcs) et selon le vieillissement qui induit des transformations chimiques diverses. Cépage, année, site de production, et degré de maturité interviennent également pour modifier la composition initiale en polyphénols[41].

Le vin issu d'une longue fermentation peut contenir des quantités importantes de polyphénols (des flavonoïdes, des stilbénoloïdes et autres acides phénols). Certains vins rouges

en renferment plus de 4 g/l et d'une grande variété dont l'impact positif sur la santé s'accorde parfaitement avec les propriétés intrinsèques de certaines de ses constituants[42].

Parmi les constituants on trouve des tanins condensés ou hydrolysables, des anthocyanosides, des stilbénoides et différents autres polyphénols.[80].

Parmi les polyphénols des vins rouges les plus riches en éléments nutritifs, il y a les **tanins condensés** ou oligomères procyanidoliques qui dérivent de la (+)-catéchine ou de la (-)-épicatéchine (1-2,5 g/l) ; contenus essentiellement dans les marcs. Dans le cas où un passage en barrique aurait lieu pendant son élevage, le vin s'enrichit d'un autre type de tanins, ceux apportés par le chêne, mais qui sont alors des tanins hydrolysables et qui correspondent à des esters galliques ou ellagiques de glucose.

La couleur des vins rouges est due aux **anthocyanosides** (0,5 g/l) comme le glucoside de malvidol contenus dans les pellicules. Ils sont extractibles que lorsque l'alcool issu de la fermentation alcoolique est présent en proportions suffisantes.

Le resvératrol, un stilbénol est présent en quantité de 2 à 5 mg/l dans le vin, aussi bien blanc que rouge. Il possède des propriétés remarquables contre la prolifération cellulaire [42].

Des recherches récentes ont montré la présence de nouveaux composés tels que des **oligomères de stilbènes** ou encore, des **hétérosides**, comme le picéide[81], mais surtout l'astringine[82, 83]. Il est remarquable de découvrir qu'un tel dérivé du resvératrol puisse être présent parfois, à des teneurs bien supérieures au resvératrol lui-même, puisque qu'on l'a dosé jusqu'à 70 mg/l dans certains vins. Des dérivés des anthocyanes tels que les **castavinols** ont également été identifiés[80, 84].

Le thé

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze, voici l'un des plus beaux cadeaux de la nature à l'homme. Vert ou noir, oolong, en feuilles, en sachets, soluble, nature, à la menthe ou au citron, le thé est l'une des boissons les plus consommées et appréciées dans le monde avant d'être une plante médicinale[41]. Il existe de très nombreuses sortes de thés commerciaux parmi lesquels on distingue :

- le thé vert, stabilisé par la chaleur sèche ou par la vapeur, roulé, séché rapidement et plus ou moins torréfié. Il est consommé en Chine, au Japon, en Afrique et au Moyen-Orient ;

- le thé noir, flétri une vingtaine d'heures, roulé, fermenté en atmosphère humide puis séché à l'air chaud. Il représente 80 % du marché mondial ;
- le thé oolong est peu connu. Il n'est que partiellement fermenté.

La feuille de théier non fermentée contient des protéines, des acides aminés (théanine, l'éthylamine et l'acide glutamique), des glucides, de l'acide ascorbique, des vitamines du groupe B et des bases puriques (caféine). On note également la présence d'hétérosides d'alcools terpéniques, aliphatiques et aromatiques dont l'hydrolyse libère des constituants qui contribuent à l'arôme de l'infusion. Les composés phénoliques sont particulièrement abondants (plus de 20 % de la masse sèche) mais leur teneur varie selon la variété, l'âge de la feuille et la saison (une teneur plus élevée en été qu'au printemps). On note la présence d'acides phénols (acide chlorogénique, acide caféique), d'esters galliques de glucose (tanins galliques) et de flavonoïdes (*O*-hétérosides de flavonols et, dans certaines variétés, *C*-hétérosides). Les constituants majoritaires sont de nature flavanique : (-)-épigallocatechine gallate (12 %), (-)-épicatéchine gallate (1-5 %), 3,5-digallates des mêmes, (-)-épicatéchine (0,2-2%), (+)-catéchine, (+)-gallocatechine. Plusieurs proanthocyanidols ont été caractérisés (B-2, B-4, C-1, 3-*O*-gallates et 3,3'-*O*-digallates de prodéphinidines, théasinensines). Une tasse de thé vert apporterait 300 à 400 mg de polyphénols[28, 85].

I.2 Les procédés de traitement des aliments

Le chocolat, la poudre de cacao, le raisin et le thé subissent différentes méthodes de préparation qui peuvent influencer la composition chimique de leurs produits finis à vocation alimentaires. L'industrie du chocolat fait intervenir, la fermentation, l'alcalinisation, et la torréfaction. La fabrication du vin emploie en particulier la fermentation acide et malolactique. L'obtention du thé nécessite la fermentation puis une infusion.

La fermentation des fèves de cacao est l'étape primordiale du traitement après récolte[86]. Dans le cadre de la fabrication du chocolat, l'objectif de la fermentation est d'induire les réactions biochimiques responsables du brunissement des fèves et de la formation des précurseurs de l'arôme du chocolat. La fermentation dure en moyenne de 5 à 7 jours[87].

Elle se déroule selon les étapes suivantes:

- 1) fermentation alcoolique en anaérobie sous l'action des levures;
- 2) fermentation lactique. La liquéfaction de la pulpe entraîne une micro aération, la transformation des sucres en alcool et l'augmentation du pH, ce qui induit une transformation des sucres en acide lactique puis en éthanol par les bactéries;
- 3) fermentation acétique qui a pour but l'oxydation de l'éthanol en acide acétique et en eau.

Les opérations de fermentation se concluent par une opération de séchage des fèves fermentées pour en diminuer la teneur en eau de 55 % à 7 % afin d'assurer une meilleure conservation durant le stockage. Cette technique se pratique le plus souvent au soleil en pleine air.

La torréfaction des fèves fermentées et séchées correspond à un traitement thermique intense entre 100°C et 150°C pendant 20 à 40 minutes suivi d'un refroidissement par ventilation pour stopper les réactions thermiques et conserver l'arôme du cacao. L'opération de torréfaction permet également :

- de séparer l'amande de la coque;
- d'éliminer une partie de l'acide acétique du cacao;
- d'abaisser le taux d'humidité du cacao à environ 2,5 %;
- de conduire à la formation de l'arôme du cacao final[44].

L'opération d'**alcalinisation** est effectuée sur le grain provenant de la torréfaction à une température de 90°C pendant 1h30mn dans une solution alcaline de carbonate de potassium. La masse du cacao sec est reprise par la moitié de son poids en eau et additionné de 5 % de carbonate de potassium. Cette opération permet ainsi de développer la couleur rouge brun voire sombre des poudres, d'un pH plus élevé, d'un cacao ayant une plus grande mouillabilité et d'un goût caractéristique[44].

Tous ces traitements successifs pour optimiser les qualités marchandes du chocolat et de la poudre de cacao ne sont pas sans effets sur l'évolution des constituants et en particulier des polyphénols.

L'élaboration d'un vin fait appel à deux fermentations, une lactique puis une malolactique suivies d'un vieillissement en fût ou en bouteille au cours duquel les qualités gustatives du vin vont se développer et les polyphénols se transformer et ce plus particulièrement pour les vins rouges riches en polyphénols.

La «fermentation» des feuilles de thé fait évoluer sa composition, son aspect, son odeur ainsi que le goût et son arôme après infusion. Après fermentation, la composition change : l'infusé passe du jaune pâle (thé vert) au rouge brun (thé noir), l'odeur devient nettement aromatique. Outre le développement de l'arôme par la formation des produits volatils (dérivés cétoniques par dégradation de carotènes, hexénal par oxydation d'acides gras insaturés, hétérocycles divers par oxydation et réarrangement de monoterpènes), on remarque une oxydation des polyphénols (d'où la couleur de l'infusé) en particulier la formation de benzotropolones, théaflavine et ses esters 3-*O*- ou 3'-*O*-mono-3,3'-*O*-digallates (1-2 %), mais aussi théaflagalline et épithéaflagalline. Les produits les plus abondants sont des produits d'oxydation et des polymérisations des théaflavines, les théarubigines et leurs dérivés (10-20 %). Le thé partiellement fermenté, renferme aussi des produits d'oxydation tel la théaflavine et aussi la présence de plusieurs théasinensines et celle de bisflavanes.

L'infusion du thé réalisée par le consommateur est encore à l'origine de l'évolution de certains constituants. Apparition des flavan-3-ols initialement non présents dans les feuilles de thé séchées, réactions d'épimérisation qui seront abordées plus loin.

I.2.1 Les différentes modifications de structure des polyphénols

Des modifications structurales majeures se produisent avec les différents procédés de préparation du chocolat, du vin et du thé. Nous allons les aborder brièvement dans le chapitre suivant.

Modification de structure pendant la fermentation, l'alcalinisation et la torréfaction du cacao

Pendant les procédés de fabrication du chocolat, les polyphénols natifs, subissent des modifications aussi bien qualitative (structure) que quantitative (concentration).

Au cours de la fermentation et de la torréfaction des fèves de cacao, la concentration en polyphénols baisse considérablement, près de 75 % [88]. Cette baisse s'explique par des réactions d'oxydation puis de condensation des monomères de flavan-3-ols en tannins de hauts poids moléculaires (Figure 4). Ces réactions font intervenir la formation de liaisons interflavaniques (LIF) 4-6 et 4-8 c'est-à-dire entre le carbone 4 d'une unité et les carbones 6 ou 8 de l'unité suivante. L'insolubilité de ces polymères réduit considérablement la quantité de polyphénols détectables.

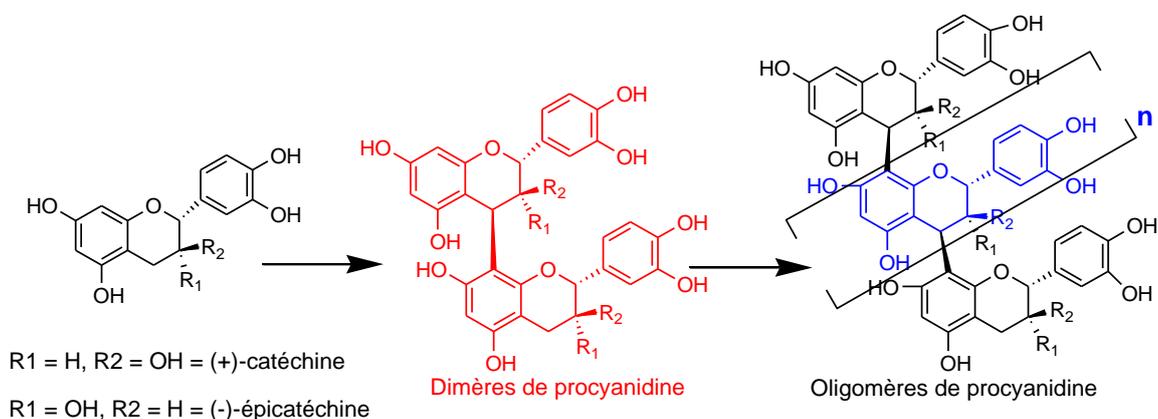


Figure 4 Exemple de polymérisation des flavan-3-ols avec formation de liaison interflavanique

Pendant les opérations d'alcalinisation, des réactions d'épimérisations se produisent au niveau du carbone C2. Elles font appel à l'ouverture du cycle C et à la formation d'une méthylène quinone intermédiaire (Figure 5). La fermeture du cycle C se produit en faisant

appel aux hydroxyles portés par les carbones 5 et 8a. Dans le cas de la Figure 5 les carbones 5 et 8a de la forme intermédiaire sont équivalents et conduisent au même composé final avec éventuellement isomérisation au niveau du carbone 2 suivant que l'attaque de la double liaison par l'un des groupes hydroxyles se fait par la face supérieure ou inférieure.

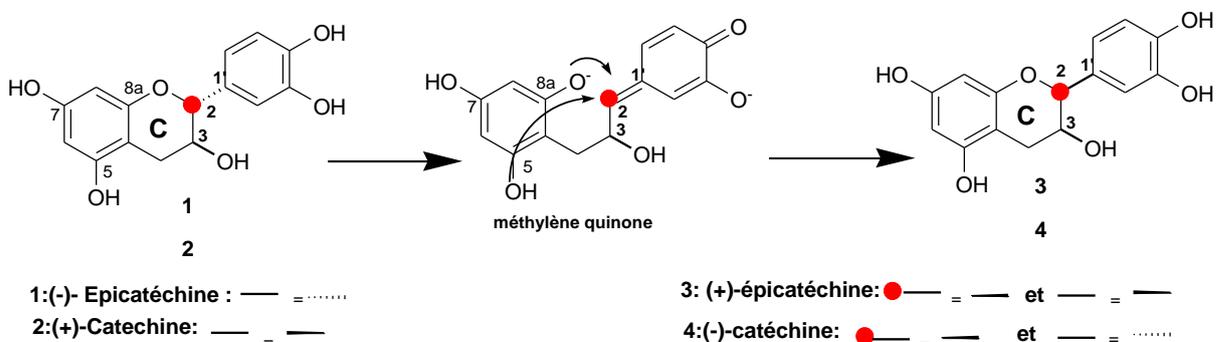


Figure 5 Mécanisme d'épimérisation des flavan-3-ols en milieu alcalin avec formation d'une méthylène quinone intermédiaire

Les anthocyanes (voir figure 2) présents dans les fèves de cacao disparaissent quasi totalement pendant les 4 premiers jours de la fermentation [40, 88].

Modification de structure pendant la fermentation et vieillissement du vin

Les polyphénols constituant le vin sont de loin les premiers responsables de sa couleur, son astringence et voire de son arôme. Ils varient et se transforment au cours du processus de vinification. Ainsi, pendant la fermentation et le processus de vieillissement du vin, il se produit une polymérisation des flavan-3-ols induite par de l'acétaldéhyde produit dans le vin (Figure 6). Les esters tartriques de l'acide caftarique et de l'acide *p*-coumarique disparaissent également. De ce fait, on voit apparaître dans le vin, une forte présence d'acide *trans*-caféïque, *trans-p*-coumarique et *cis-p*-coumarique (acides hydroxycinnamiques) qui étaient présents initialement à l'état de trace dans le vin[89].

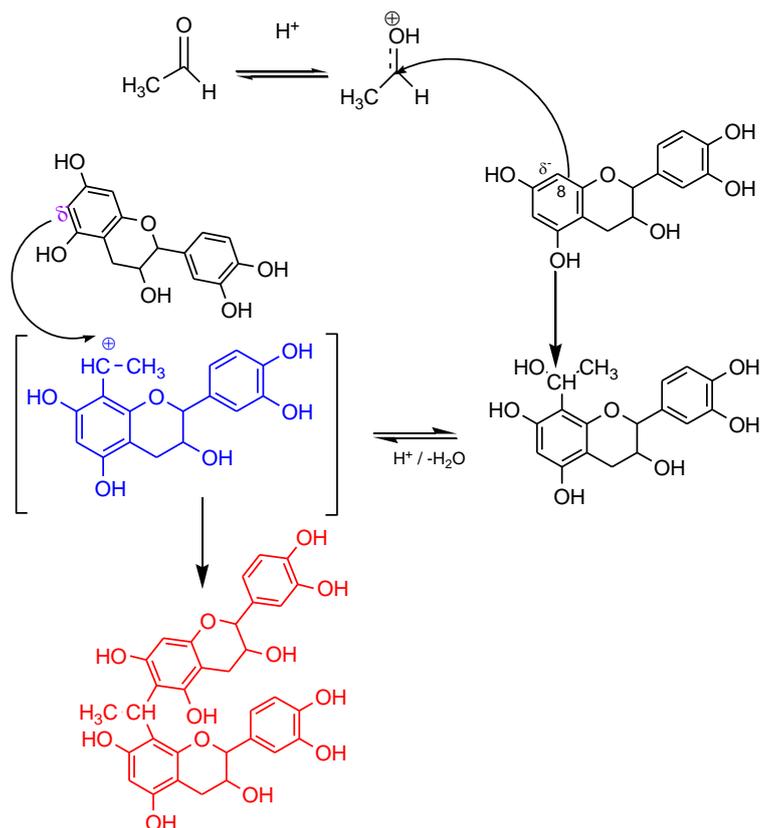


Figure 6 Mécanisme induit par l'acétaldéhyde conduisant à la polymérisation des flavan-3-ols

L'une des modifications les plus spectaculaires au cours de la fabrication du vin a lieu pendant le vieillissement. Cette modification implique plusieurs facteurs dont le type de cultivar (*toute variété végétale résultant d'une sélection, d'une mutation ou d'une hybridation naturelle ou provoquée – et cultivée pour ses qualités agronomiques*), la méthode de fabrication du vin, le contenu polyphénolique, le pH, le potentiel redox, la présence d'acétaldéhyde et de dioxyde de soufre. Avec le temps, le facteur coloration est affecté, les composés se transforment en polymères. Les nouveaux pigments formés sont plus stables que ceux des génines anthocyaniques. Plusieurs composés seraient à l'origine de cette coloration, nous décrivons ici les plus couramment cités.

Un composé responsable de la stabilité de la couleur du vin grâce à son dioxyde de soufre qui a des propriétés similaires au cation flavylium, il s'agit des **vitisines A et B** (Figure 7) qui sont retrouvées en petite quantité dans le vin rouge mais à l'état de trace dans le raisin[90, 91].

Première partie : Etude bibliographique

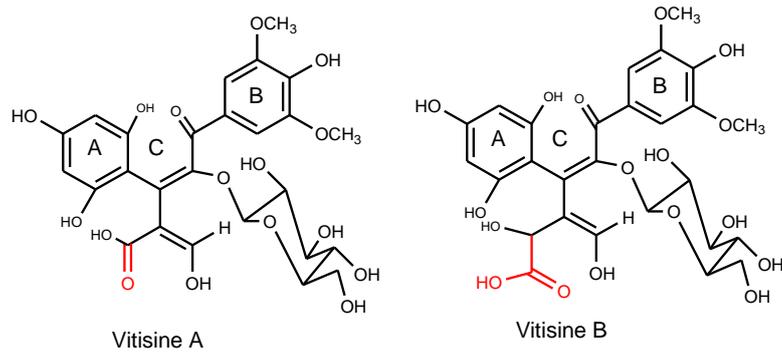


Figure 7 Structures des vitisines A et B

A partir de flavan-3-ol et de C-glycoside ellagittannins comme la (-)-vescalagine et son épimère en C-1, la (-)-castalagine se forme en milieu acide dans le vin rouge (Figure 8).

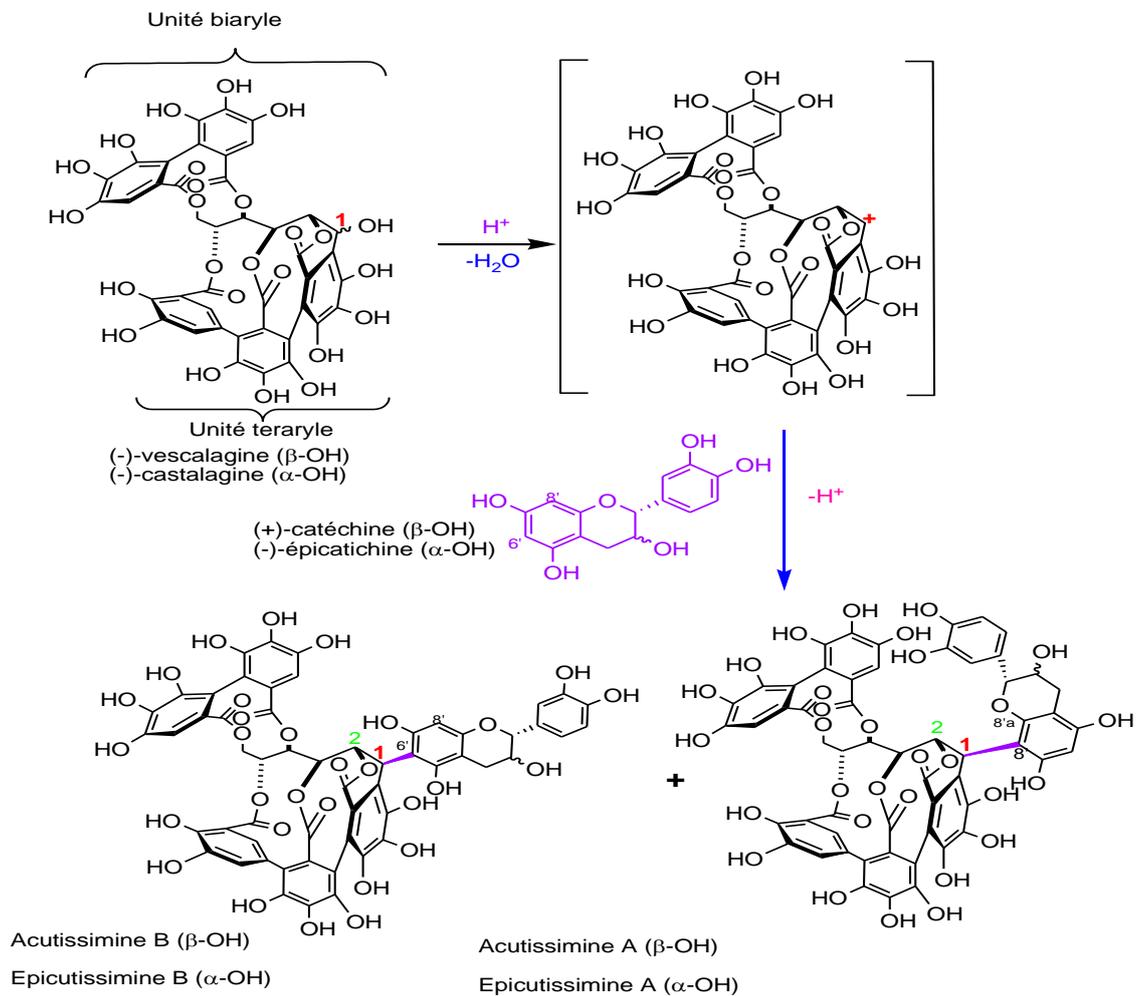


Figure 8 Formation des acutissimine A et B en milieu acide à partir de la (-)-vescalagine et de la (-)-castalagine avec rétention de la configuration du centre C-1

Les **acutissimines A** et **B** s'avèrent avoir des propriétés biologiques très intéressantes [92].

Les **castavinols**, polyphénols glucosylés issus de la condensation des pigments anthocyaniques avec la butan-2,3-dione selon le mécanisme proposé à la Figure 9, possèdent des propriétés colorantes sous forme masquée, participant ainsi à l'évolution de la couleur des vins rouges[80].

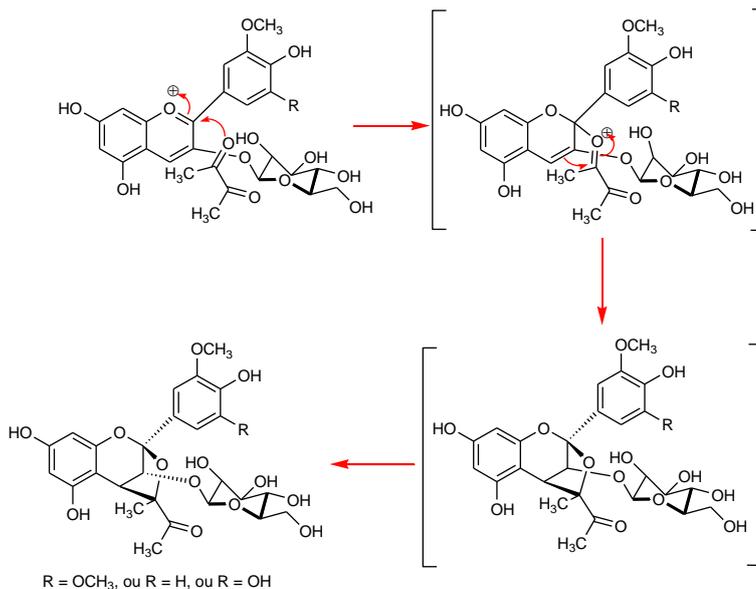


Figure 9 Mécanisme possible de la formation des castavinols dans le vin

Les anthocyanes de nature instable ont tendance à se polymériser. L'adduit de la malvidin-3-monoglucoside-acide pyruvique issu de la réaction entre l'acide pyruvique et de la malvidin-3-monoglucoside pendant le vieillissement du vin (Figure 10). Leur modification chimique fait virer le jeune vin du rouge vif au rouge fauve du vin vieilli[91].

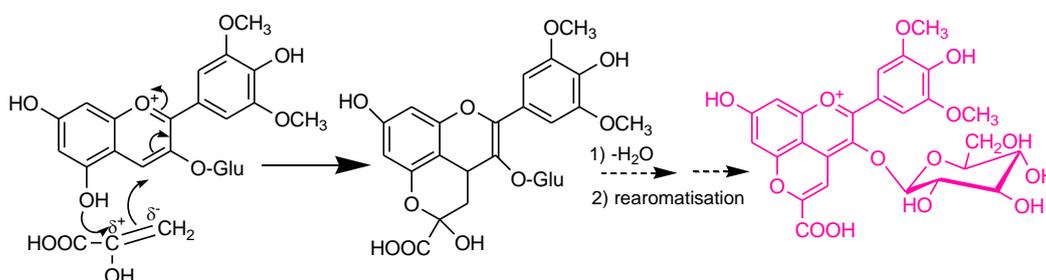


Figure 10 Proposition de mécanisme de réaction entre l'acide pyruvique et la malvidin-3-monoglucoside.

Dans le cas où un passage en barrique aurait lieu pendant son élevage, le vin s'enrichit également d'un autre type de tanins, ceux apportés par le chêne, mais qui sont alors des **tanins hydrolysables** et qui correspondent à des esters galliques ou ellagiques de glucose (Figure 11).

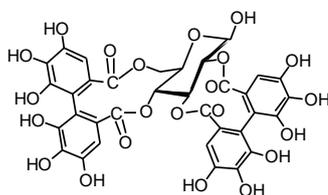


Figure 11 : Tanin ellagique

L'industrie du vin, utilise le dioxyde de soufre comme protecteur alimentaire (arrêt de l'activité enzymatique responsable de la fermentation). Dans ces conditions, le dioxyde de soufre est susceptible de réagir avec les flavan-3-ols, en présence d'une solution normale de H_2SO_3 à 40°C pendant 36 heures. Il se forme des **gambiriines** (Figure 12) auparavant isolés de *Uncaria gambir* ROXB (Rubiaceae).

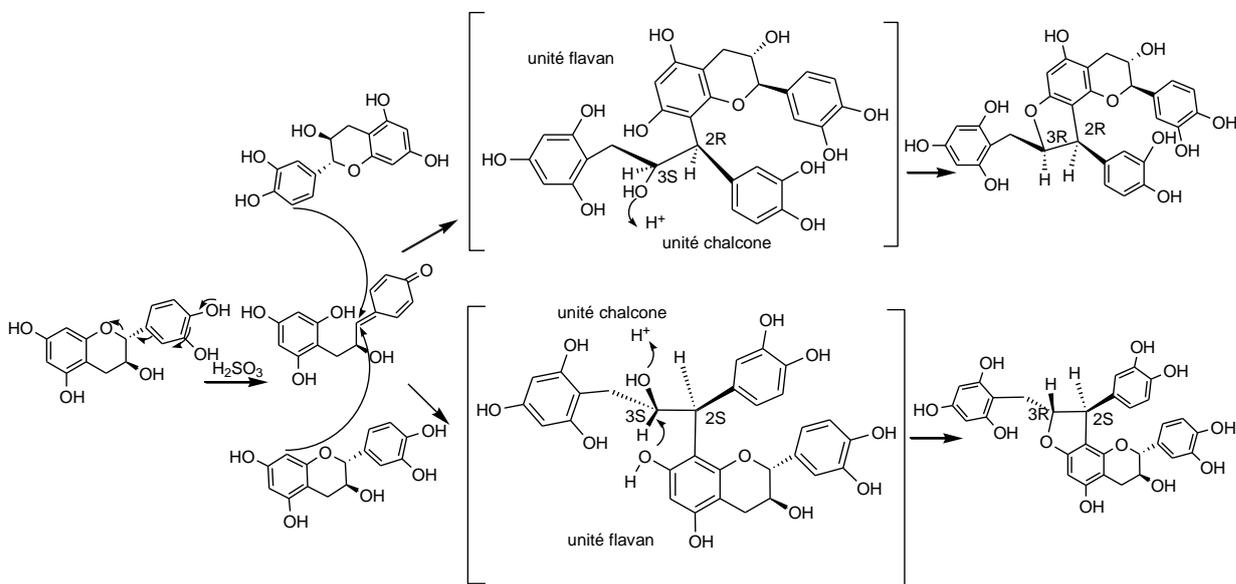


Figure 12 Mécanisme de formation des gambiriines à partir des flavan-3-ols en présence de H_2SO_3

Modification de structure pendant la fermentation et l'infusion du thé

Pendant la fermentation du thé, environ 75 % des flavan-3-ols sont transformés par des réactions d'oxydations et de polymérisation partielle[93]. Le contact avec l'oxygène de l'air est essentiel dans cette réaction. Durant la fermentation, la (+)-catéchine entre en contact avec la polyphénol oxydase. Cette enzyme est le premier responsable de l'oxydation de la (+)-catéchine en sa forme quinonique d'espèce oxygénée réactive qui par la suite donne des dimères et des polymères caractéristiques du thé fermenté (Figure 13) [85].

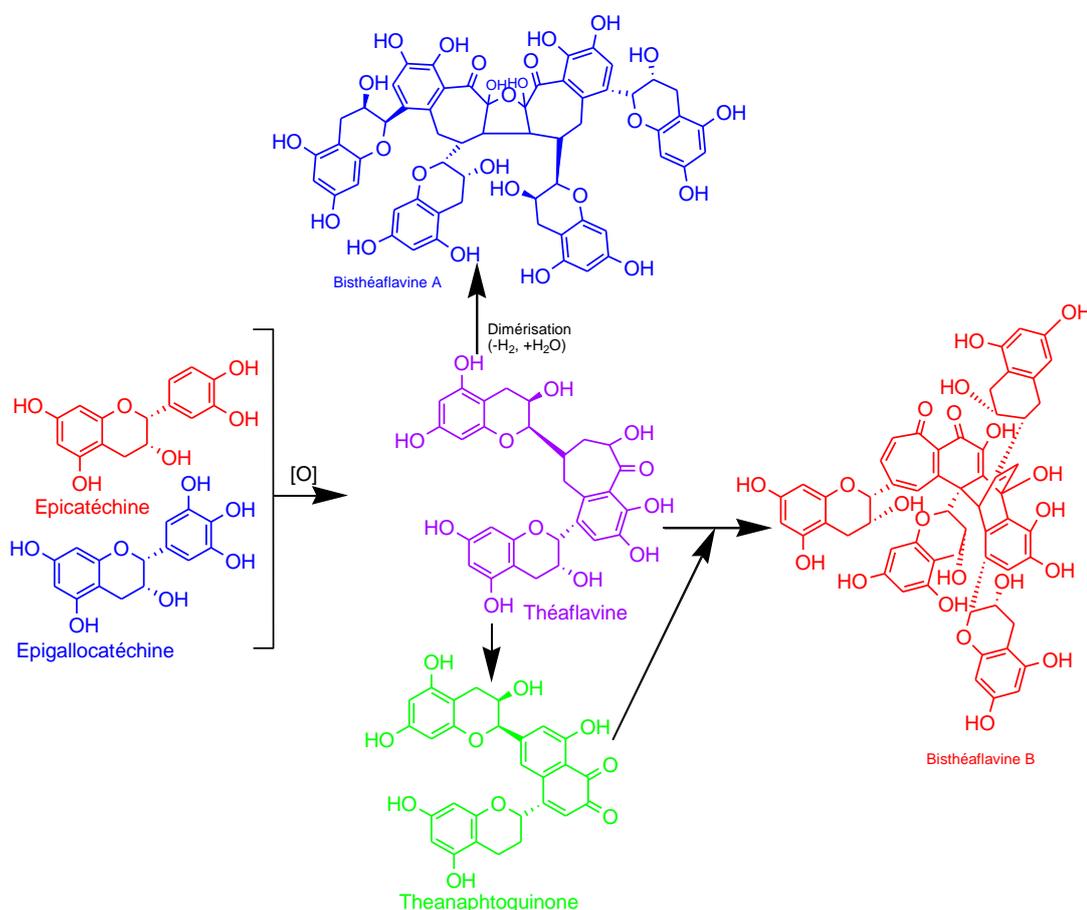


Figure 13 Oxydation et polymérisation possibles durant la fermentation du thé[94].

Il est difficile de relier la composition chimique définitive du thé noir suite à la fermentation. Cela dépend du type de technologie utilisée. Il se produit également, l'oxydation du cycle B de la (-)-épigallocatechine ou de la (-)-épigallocatechine gallate avec une perte d'un CO₂ et une fusion avec le cycle B de la (-)-épicatechine ou de la (-)-épicatechine gallate. Quatre théaflavines sont formés au cours de ses transformations : la

théaflavine, théaflavine 3-gallate, théaflavine 3'-gallate et la théaflavine 3,3'-gallate (Figure 14). Des composés benzotropolones sont aussi formés mais en quantité infinie. Il y a aussi l'acide théaflavique, formé à partir de la catéchine quinonique et de l'acide gallique quinonique. L'acide gallique n'est pas un substrat pour le polyphénol-oxydase.

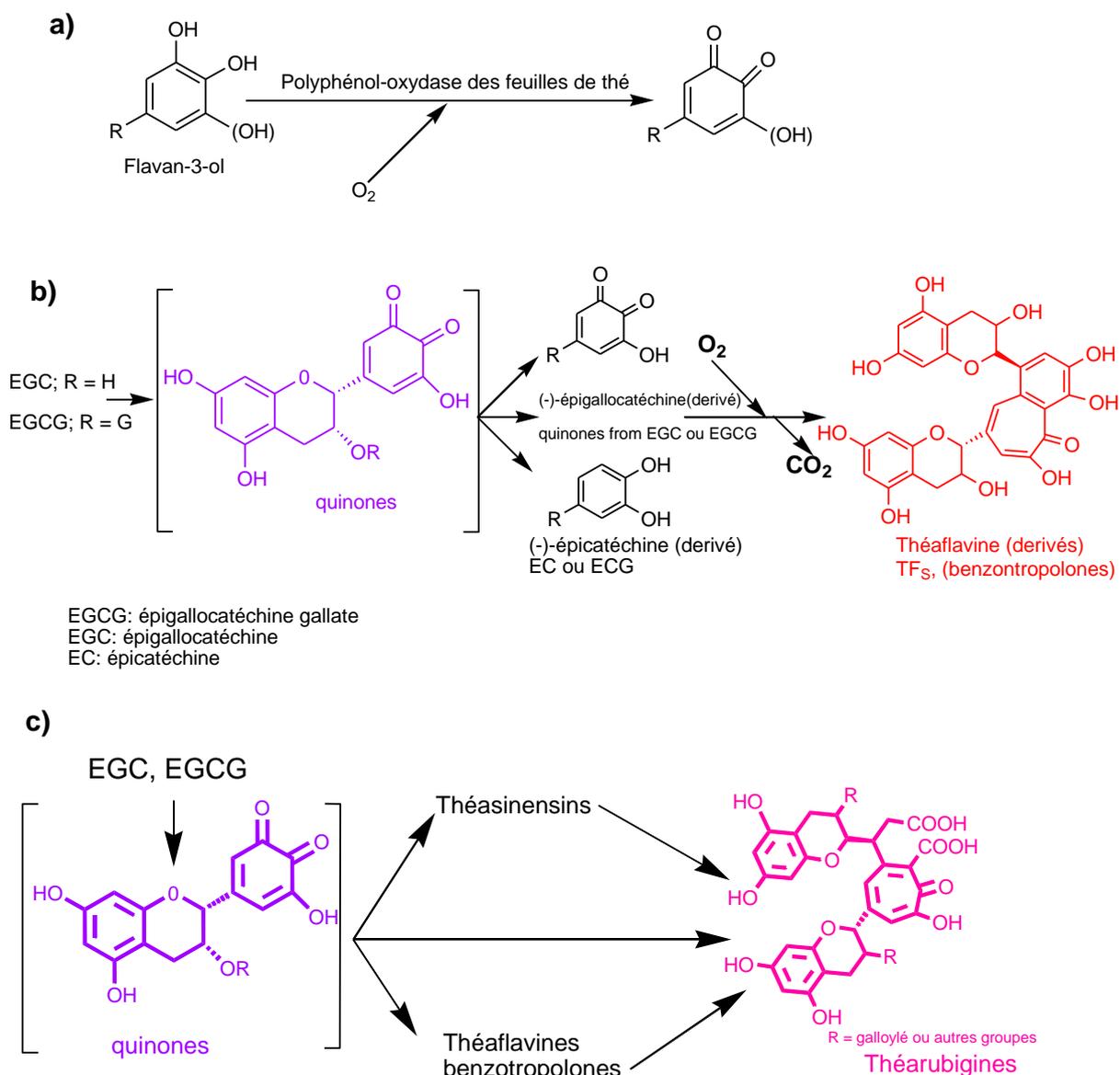


Figure 14 Voies de mécanismes possibles pour la formation de théaflavine et de théarubigine[93]

Pendant l'infusion du thé, les modifications majeures qui ont lieu sont celles liées à l'épimérisation en C-2 des flavan-3-ols naturels en leurs épimères non naturels[95]. La (-)-épicatechine (2 α 3 α), la (-)-épicatechine gallate et la (+)-catéchine s'épimérisent au niveau du carbone 2, le cycle catéchol passant de la position 2 α à la position 2 β (Figure 15). Ainsi,

lors de l'infusion du thé vert il y a une augmentation de la quantité de flavanols non naturels (avec cycle catéchol en position 2β) aux dépens des flavanols naturels[96].

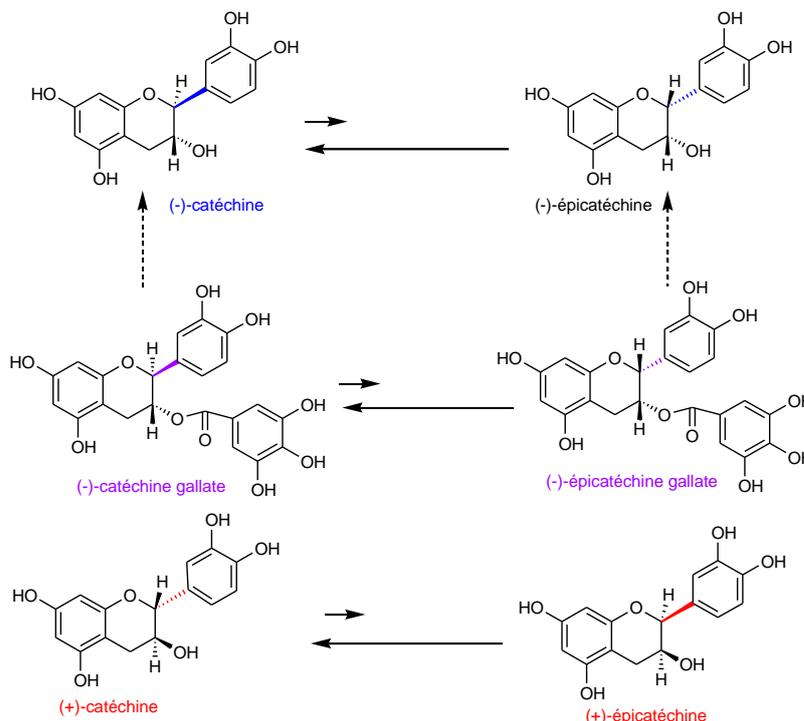


Figure 15 Mécanisme d'épimérisation de quelques flavan-3-ols pendant l'infusion du thé

Il a été montré que cette épimérisation est facilitée par l'utilisation de l'eau de robinet de préférence à de l'eau purifiée. Cela pourrait s'expliquer par la complexité ionique de l'eau de robinet et de son pH. Il a aussi été démontré qu'une longue conservation du thé vert à 40°C, est susceptible de déclencher cette réaction d'épimérisation. Les températures au delà de 40 °C, favorisent cette réaction de même que les pH supérieurs à 6. Les pH inférieurs à 5 inhiberaient cette réaction d'épimérisation[97].

Les effets conjugués de la concentration en flavanols (1%), du pH (5), de la température (120°C), et du temps (30mn) ont une incidence positive sur la réaction d'épimérisation[98].

I.3 Les propriétés santé des polyphénols

I.3.1 Introduction

Les polyphénols bénéficient d'un intérêt croissant auprès des consommateurs, intérêt justifié par des études épidémiologiques[40] et par de nombreux travaux scientifiques[45, 66]. Ces études, attestent les bienfaits d'une alimentation riche en polyphénols qui serait en relation directe avec la diminution de la mortalité. Cette baisse de la mortalité seraient liées à la réduction des accidents cardiovasculaires[40, 45, 99-102], des ulcères gastriques[103], de certains types de cancers[43, 67, 104] de certaines complications du diabète et de l'immunorégulation des immunoglobulines[66].

Toutes ces données scientifiques indiquent que les polyphénols, par leurs propriétés anti-oxydante et réductrice combinées à d'autres réducteurs tels les vitamines (C, E et A), contribuent à protéger le corps contre des dommages liés au stress oxydant, en luttant contre les pathologies associées à ce stress oxydant. Ainsi, les polyphénols figurent en première place parmi les molécules d'intérêt thérapeutique[42, 43, 105].

Les réactivités observées au niveau biologique, dues aux polyphénols, sont liées aux nombreuses propriétés physico-chimiques[106, 107] qui peuvent être résumées comme suit:

Propriétés **anti-oxydantes et anti-radicalaires**, la fonction hydroxyle phénolique, par son aptitude à délivrer un électron, confère aux polyphénols des propriétés réductrices. Ceux-ci peuvent ainsi facilement former des radicaux stabilisés par délocalisation électronique, donc peu réactifs. Les polyphénols sont donc anti-oxydants[108] et constituent de bons piègeurs de radicaux libres, notamment de radicaux oxygénés comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le radical hydroxyle OH^{\cdot} ;

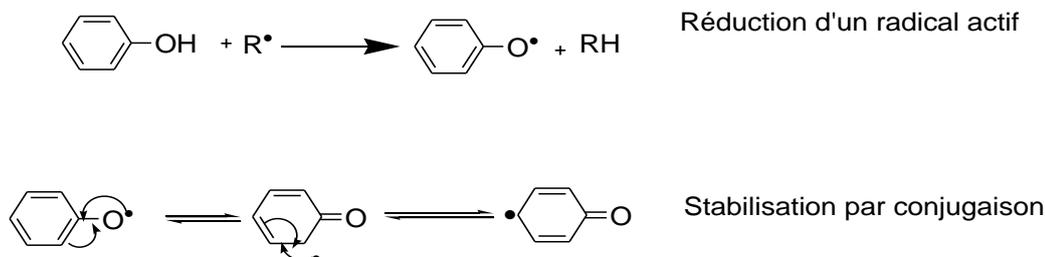


Figure 16 : Propriétés réductrices des polyphénols

Les espèces oxygénées réactives (EOR) réagissent différemment, avec les acides gras saturés (AGS) et avec les acides gras poly-insaturés (AGPI). Une différence de réactivité supplémentaire apparaît encore entre les polyphénols et les AGPI. Les polyphénols sont environ 1000 fois plus réactifs et réagiront les premiers. Ainsi, dans une bicouche lipidique qui contient un polyphénol pour 1 million d'AGS, un radical a statistiquement autant de chance d'oxyder le polyphénol que les acides gras[42].

Les polyphénols peuvent exercer leur propriété de « piègeurs de radicaux libres » avant même que les EOR n'entreprennent leur élimination. Ils bloquent alors la chaîne d'oxydation radicalaire et empêchent la formation des cytokines, des LDL-OOH et donc toute réponse inflammatoire. De même, les polyphénols (et les vitamines E) en piégeant les radicaux libres, luttent dans le règne vivant, contre toutes les causes de vieillissement.

I.3.2 Épidémiologie

Au début des années 90, et notamment depuis les travaux du Dr. S. RENAUD sur le « Paradoxe Français »[109], le vin semble jouer un rôle important dans la diminution des accidents cardiovasculaires et des cancers[110]. Quand le vin est pris en compte dans l'alimentation d'une population donnée pendant une même période, les corrélations sont encore plus convaincantes[111-114].

Certains polyphénols du vin montrent *in vitro* ont de remarquables propriétés biologiques. Leur seule présence pourrait expliquer la plupart des faits constatés par les épidémiologistes.

Il est fortement suspecté, au travers des études épidémiologiques, que les variations du contenu en polyphénols des différentes alimentations soient les plus importantes causes des différences de protection de la santé observées[42, 115].

Des études épidémiologiques[116] ont montré, ces vingt dernières années, qu'il existe une incidence positive de la consommation d'aliments riches en flavonoïdes sur le système cardiovasculaire. Les pathologies cardiovasculaires sont en étroite relation avec le métabolisme lipidique. Les LDL oxydées sont captées par les macrophages qui s'accumulent dans la paroi vasculaire sous forme de cellules chargées de cholestérol, tandis que l'oxydation physiologique des acides gras polyinsaturés induit les processus inflammatoires. Tous ces processus se déroulent sans excès dans les conditions physiologiques normales, mais deviennent pathologiques dans certains cas (hyperlipidémie, inflammation, par exemple).

Les flavan-3-ols (catéchine, épicatechine et leurs oligomères procyanidoliques) ont été testés pour leur habilité à décroître la susceptibilité oxydative des LDL tout en augmentant le potentiel anti-oxydant du sérum total[117].

Ils agissent en inhibant : la peroxydation des LDL notamment dans les cellules hépatiques ; l'accumulation du calcium et du phosphate inorganique dans le rein et l'aorte ; l'activation plaquettaire ; la modulation de la synthèse d'eicosanoïdes.

Les flavonoïdes ont des effets cardioprotecteurs par réduction du stress oxydant sur les LDL. On enregistre ainsi une hausse du « bon » cholestérol (HDL), une baisse de 8 % de l'oxydation causée par le mauvais cholestérol (LDL) et une hausse de 4 % de leur capacité anti-oxydante[16].

1.3.3 Propriétés des polyphénols *in vitro*

Le vieillissement des organismes aérobies est en partie dû aux radicaux libres issus du métabolisme oxydatif, qui interfèrent notamment avec le métabolisme lipidique (lipopéroxydation). L'apparition des maladies dégénératives serait fortement liée au stress oxydatif[118].

Des études réalisées *in vitro* ont confirmé que les propriétés physico-chimiques des flavonoïdes notamment les propriétés anti-oxydante et anti-radicalaire peuvent s'exercer sur les LDL[119]. Les flavonoïdes permettraient de lutter contre le stress oxydatif et le processus de vieillissement cellulaire dus à des entités radicalaires réactives ($\text{HO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$ et $\text{O}_2^{\cdot-}$) responsables de la lipopéroxydation et du processus inflammatoire. De plus, la complexation du fer par les flavonoïdes intracellulaires engagés dans la production de radicaux libres, pourrait inhiber les réactions de Fenton et de Haber Weiss[120], principales sources du radical OH.

Des expériences conduites *in vitro* ont permis de démontrer les puissants effets biologiques des polyphénols qui se comportent comme antiagrégants plaquettaires, anti-inflammatoire, anti-infectieux, anti-Alzheimer. Nous allons commenter brièvement ces propriétés ci-après[42].

Antiagrégants plaquettaires

Par la diminution des formes activées des plaquettes[13, 121-123], tout comme l'alcool, mais sans en avoir toutefois l'effet secondaire délétère, cet effet "rebond"[109], susceptible de causer la mort subite ou des accidents ischémiques graves.

Antiathérombotiques, anti-inflammatoires

Par la protection de l'oxydation des LDL cholestérol[119, 124, 125] et des acides gras polyinsaturés (éicosanoïdes)[126, 127]. Les anthocyanes de cerises ont révélé par exemple avoir de telles actions à un niveau comparable, voire supérieur, à celui obtenu avec des produits commerciaux (médicaments : Ibuprofen®, Aspirine®) directement destinés à conférer ce type de protection[128].

Anti-infectieux

De nombreux travaux font état d'une activité des flavonoïdes mesurée *in vitro*, contre les bactéries, les champignons et les virus. Elles confirment les propriétés anti-microbiennes des polyphénols par ailleurs utilisés par les plantes pour lutter contre les infections[129].

Activité anti-infectieuse possible des flavonoïdes sur :

- les bactéries : Streptocoques, Cariogènes[130, 131], Staphylocoques[132, 133], *Bacillus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*[132, 133].
- les champignons : Actinomycètes[130], *Candida albicans*[132]
- les virus : virus de l'immunodéficience humaine[134-136], virus de la grippe[137].

Anti-Alzheimer

Plus récemment encore, le vin a été impliqué dans la diminution du taux d'apparition de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer[138, 139]. Des débuts d'explication de cette propriété se trouveraient dans la compréhension récente des mécanismes par lesquels les dépôts amyloïdes apparaîtraient chez les personnes atteintes de cette maladie[140]. Les polyphénols "liposolubles", transportés au sein des structures cérébrales, s'opposeraient avec efficacité aux réactions d'oxydation radicalaire, source des réactions de polymérisation conduisant aux dépôts amyloïdes et ralentiraient ainsi la progression de la maladie. Ce concept est à la base des traitements à base de vitamine E et d'anti-inflammatoires[122, 141].

Antiproliférative

Il s'agit d'une propriété majeure de polyphénols, qui n'est pas entièrement liée à leur propriété antioxydante. Les stilbénoides, tel le **resvératrol**, *in vitro*, ont montré une action inhibitrice sur les trois phases principales de cancérisation[142] : initiation, promotion (par diminution du taux d'enzymes caractéristiques de ces états précancéreux : cyclooxygénase-2)

et propagation (par induction de la différenciation de cellules cancéreuses et de l'apoptose). Il a même été montré que ces molécules agissent de façon **préventive** contre certaines formes de cancers, en prévenant l'initiation de cellules cancéreuses, par inhibition de l'expression de gènes de protéine kinase C ou du *mARN* de la COX-2[143].

I.3.4 Les études *in vivo*

Les conséquences biologiques des pouvoirs antioxydants des polyphénols sont difficiles à quantifier et à démontrer *in vivo* même si on soupçonne qu'ils sont d'une considérable importance. C'est encore une fois les observations des épidémiologistes qui autorisent à penser qu'ils sont en partie au moins, capable d'exercer *in vivo*, les propriétés qu'ils démontrent *in vitro*. Il est admis qu'ils augmentent l'espérance et la qualité de vie [42]. Si les peroxydations cellulaires ne conduisent pas à une maladie en tant que telle, elles contribuent au vieillissement des cellules qui perdent progressivement leurs plasticités et capacités à se renouveler. Ce processus est plus ou moins rapide selon les protections mises en œuvre et le stress auquel sont soumises les cellules. Par leur action anti-oxydante, les polyphénols s'opposent, sur le long terme, au vieillissement[27].

I.4 L'impact des transformations sur les structures et propriétés biologiques des polyphénols

De même qu'il existe une relation structures-propriétés organoleptiques des aliments, nous tacherons ici de présenter les propriétés biologiques des polyphénols obtenus dans nos aliments suite aux différents procédés de préparation.

Bon nombre des composés alimentaires sont chiraux. Certains sont présents sous forme énantiomérique pure, d'autre sous forme racémique. Le pourcentage de racémisation de certains composés, en l'occurrence les polyphénols, peuvent être fortement affectés par divers traitements de l'industrie agroalimentaire.

Dans nos aliments de tous les jours, la notion de chiralité est très difficile à cerner. Les composés alimentaires sont naturels et en principe exemptes de toute racémisation. Toutefois la détection de la présence d'énantiomères non naturels, aux propriétés différentes, pose la question de la conséquence des traitements agroalimentaires comme l'élévation de la température, l'irradiation, la fermentation, l'adultération (ajoute d'ingrédients synthétiques

racémiques) et les traitements à pH élevés (alcalinisation). En effet, les énantiomères peuvent avoir des propriétés organoleptiques différentes, qui pourront intéresser les industriels de l'agroalimentaire dont l'objectif premier est de séduire le consommateur à l'aide des dites propriétés organoleptiques et de saveurs[144].

Le scientifique lui, au-delà de cet aspect de plaisir (saveur et organoleptique) de nos aliments, a pour objectif de justifier le bien fondé de telles pratiques alimentaires sur la santé du consommateur. Raison pour laquelle depuis une dizaine d'années, la question du devenir des composés chiraux se trouvant dans nos aliments et leur éventuelle racémisation après les procédés de fabrication, est au cœur d'un nouvel axe de recherche avec de nouveaux moyens techniques que sont la chromatographie gazeuse (GC)[145], la chromatographie gazeuse en deux dimensions couplée à un détecteur de capteur d'électron (GC x GC-DCE)[146], la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec support chiral, la chromatographie liquide en phase inverse, couplée à la (GC) puis à la masse (CLHP-SM)[145], l'électrophorèse capillaire (EC); la chromatographie de partage centrifuge (CPC) avec des solvants chiraux et enfin des méthodes enzymatiques basées sur la stéréosélectivité des enzymes[144]. C'est un véritable challenge pour le chimiste de trouver une méthode de séparation des énantiomères pour la simple raison que ces composés ne diffèrent que par leur orientation spatiale.

Cet intérêt pour les énantiomères s'est accru par le fait de leur différence au niveau nutritionnel, sensoriel et des activités biologiques qui en résultent[147]. Cette différence d'activité biologique est due à la différence d'interaction avec les récepteurs, les systèmes de transports et enzymatiques. Un exemple est le cas de l'acide usnique isolé des lichens en 1844, et utilisé en médecine, en parfumerie et en cosmétique soit comme principe actif, soit comme protecteur. En plus de son activité antimicrobienne, antivirale, antiprotozoaire, antiproliférative, anti-inflammatoire et analgésique, des différences d'activités ont été trouvées entre les deux formes énantiomérique de l'acide usnique[147].

I.4.2 Effets des transformations des polyphénols sur les propriétés biologiques du chocolat

Produits chocolatés (l'alcalinisation et la torréfaction)

- La torréfaction est effectuée pour faire apparaître les meilleures qualités gustatives des produits, les conditions de température et de pH peuvent être responsables de formation de complexes racémiques; Ce phénomène est plus plausible dans le cas particulier de la

fabrication de la poudre de cacao qui nécessite une alcalinisation (opération à chaud et à pH très élevé), ce qui favorise l'épimérisation des carbones C2 des différents flavanols concernés.

Il a été montré que différents types de café ont une activité antioxydante *in vitro*[148], il en est de même pour le chocolat. En effet, le chocolat noir augmente la capacité antioxydante du plasma, suivi d'une hausse du taux de HDL tout en diminuant l'oxydation du LDL. Le chocolat fait baisser la pression artérielle sanguine et entraîne un effet anti-agrégation des plaquettes[60, 149], entraînant ainsi des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire[116]. Il a également été montré l'existence d'un effet opposé entre la (+)-catéchine et la (-)-catéchine sur l'activité de la glycogène synthétase[150].

La majorité des propriétés biologiques conférées aux polyphénols, a été attribuée à partir d'expériences menées *in vitro* ou *ex vivo*. Les premières découvertes ont mis en évidence, un effet «cardioprotecteur» du cacao et du chocolat noir, ainsi que traitement du diabète, des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et de la démence vasculaire. Le Dr Norm Hollenberg, Professeur de Médecine à la Harvard Medical School explique que des résultats cliniques et expérimentaux assez pertinents concernant les polyphénols sont en cours de validation. En effet, on sait aujourd'hui avec certitude que les polyphénols sont responsables de la réduction de l'agrégation plaquettaire, un effet similaire à celui de l'aspirine, qui fluidifie le sang et diminue donc le risque de caillot sanguin, soit le risque de thrombose. Cette découverte a des implications majeures pour des applications pharmaceutiques. Des nouvelles études cliniques ont aussi révélé que les flavanols du cacao augmentent le débit sanguin dans certaines zones clés du cerveau, ce qui constitue une piste potentielle pour le traitement d'affections vasculaires des personnes âgées, notamment la démence vasculaire et l'accident vasculaire cérébral.

Toutes ces découvertes doivent nous interpeller quant à la nécessité de situer les parts des polyphénols naturels ainsi que celle des non naturels issus de modifications.

I.4.3 Effets des transformations sur les propriétés biologiques des polyphénols du vin

Le vin est un aliment exceptionnel en ce sens qu'il peut contenir des quantités importantes de polyphénols. L'acutissimine A isolée en petite quantité dans le vin rouge est un excellent inhibiteur de l'ADN topoisomérase II avec une IC_{100} de 0,2 μ M[92]. L'acutissimine A est ainsi 250 fois plus active que tous les anticancéreux utilisés en clinique (étoposide).

La fermentation du vin et spécialement la fermentation malolactique, en plus d'être cruciale pour ses propriétés organoleptiques comme la coloration, l'astringence et l'amertume, joue un rôle de pourvoyeur de composés antioxydants que sont les polyphénols. De récentes études effectuées indiquent une capacité anti-oxydante qui augmente avec le vieillissement des vins[151].

I.4.4 Effets des transformations sur les propriétés biologiques des polyphénols du thé

Le thé fermenté

Avec une composition du thé issu de la fermentation qui suit : flavan-3-ol (10-12%), théaflavine (3-6%), théarubigine (12-18%), flavonol (6-8%), acides phénols et depsides (10-12%), amino acides (13-15%), il a été montré que ces polyphénols du thé noir ont une activité antioxydante[93].

Thé vert

Il a été montré que les polyphénols naturels du thé vert aussi bien que leurs homologues non naturels inhibent à proportion égale l'activité des protéasomes[152].

Des effets inhibiteurs exercés contre les allergies de type IV induit par l'oxazolone chez la souris sont étudiés. Les épimères de type 2S, 3R en C-2 des flavan-3-ols du thé produits pendant l'infusion ne présentent pas selon les auteurs de différence d'activité significative par rapport à leurs correspondants naturels de type 2R, 3R. Ces résultats montrent que les composés produits pendant l'infusion pourraient être non avantageux pour l'activité antiallergique sur les allergènes de type IV[153].

Les quatre épimères non naturels issus d'une réaction d'épimérisation du thé à savoir: la (-)-gallocatéchine gallate (GCG), la (-)-catéchine gallate (CG), la (-)-gallocatéchine (GC) et la (-)-catéchine ont fait l'objet d'étude de l'activité antioxydante et de leur biodisponibilité. Cette activité a été menée sur trois systèmes in vitro à savoir l'oxydation du LDL humain, le pouvoir de réduction antioxydante ferrique (FRAP), et l'anti-2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) des essais sur les radicaux libres. Tous ces tests montrent que les épimères non naturels ont la même voire une moindre activité que leurs précurseurs. Une prise orale et en intra veineuse des épimères concernés, augmente la capacité antioxydante totale du plasma. La biodisponibilité des différents épimères est très faible (0.08-0.31).

En conclusion de ces travaux, l'ensemble des observations faites montrent que les épimères issus des composés naturels n'ont pas d'activité antioxydante significative[154].

Conclusion

Les différentes approches qui émergent de l'ensemble des travaux font état des activités biologiques des polyphénols en général et en particulier de ceux de nos aliments comme le chocolat, le thé et le vin. Il ressort que différentes modifications possibles de structures liées aux différentes techniques de préparations de nos aliments ont eu lieu.

Une nouvelle approche ne serait-elle pas envisageable, par la nécessité de mieux connaître les structures polyphénoliques pour permettre des études épidémiologiques beaucoup plus fines dans la relation aliments et santé.

En effet la quasi-totalité des travaux effectués en la matière, attribuent les propriétés biologiques aux seuls polyphénols naturels et ce après des dosages discutables en la matière. Est-il donc pertinent de mesurer avec précision les quantités de polyphénols naturels dans nos aliments afin d'évaluer leur propriétés sur la santé?

Ou, ne faut-il pas prendre en compte les composés de la série non naturelle afin d'évaluer leur contribution à la santé du consommateur ?

Au stade actuel, des connaissances, une question se pose à tous les spécialistes de l'industrie alimentaire, chimistes et en nutrition et santé, à savoir premièrement qu'advient-il des composés chiraux que regorgent nos aliments après les différents traitements cités et voir l'épimérisation possible *in vivo* lors du transit intestinal par ces mêmes composés; mais aussi le bénéfice santé pour le consommateur.

Des études épidémiologiques «alimentation/santé» s'avèrent nécessaires pour une plus grande compréhension. Il a par exemple été montré l'existence d'un effet opposé entre la (+)-catéchine et la (-)-catéchine sur l'activité de la glycogène synthétase[150]. C'est à ces questions que nous essayerons d'apporter quelques éléments de réponses dans nos différentes démarches, à savoir l'épimérisation des monomères et du dimère B2 pour isoler les composés non naturels qui en résultent afin d'investiguer leurs éventuelles activités biologiques sur les mécanismes de l'oxydation et de la prolifération cellulaire.

Enfin une étude du chocolat commercial pour connaître la présence ou non de ses différents composés qu'ils soient naturels ou non.

II. Deuxième partie

Travaux personnels

II. 1. Introduction

II. 2. Extraction des polyphénols du cacao et de pépins de raisins

II. 3. Réactivité des polyphénols C1, C2 et C3 en milieu alcalin

II. 4. Étude des polyphénols d'un chocolat commercial

II. 5. Activité biologique sur des cellules isolées

II.6. Conclusion et perspective

II.1 Introduction

Pour répondre à la question visant à situer la part des modifications chimiques des polyphénols suite aux procédés de préparations des aliments, dans le bénéfice santé du consommateur, nous allons procéder en quatre étapes :

-1) Isoler à l'état pur (suivant une méthode brevetée[155]) un certain nombre de polyphénols de cacao pour éventuellement servir de référence.

-2) Traiter en milieu alcalin les monomères isolés du cacao et en isoler les produits de transformation.

-3) Traiter en milieu alcalin, dans des conditions analogues à la fabrication du chocolat, le dimère B2 issu du cacao ou encore extrait de pépins de raisin.

-4) Extraire les polyphénols du chocolat noir commercial pour évaluer leur évolution à partir du cacao lors de la fabrication du chocolat.

Pour conclure, des investigations biologiques seront menées à partir des molécules naturelles isolées et de leurs produits de transformation pour évaluer leurs effets sur les récepteurs membranaires aux androgènes et sur des lignées cancéreuses et apprécier leurs activités antioxydantes, avec les molécules naturelles et non naturelles isolées.

II.2 Extraction des polyphénols du cacao et de pépins de raisins

II.2.1 Polyphénols extraits du cacao

L'extrait polyphénol total (EPT) obtenu à partir des fèves de cacao représente de 5 à 8 % du poids des fèves fraîches. Il est obtenu par macération pendant 24 heures dans un mélange eau-alcool (24/76) des fèves de cacao broyées après avoir été privées de leur coque et de leur pulpe mucilagineuse. La solution obtenue est concentrée à sec et lyophilisée. Pour enrichir cet extrait en polyphénols, le concentré préalablement obtenu est redissout à chaud dans de l'eau distillée puis lavé par de l'hexane pour en extraire les lipides et enfin lavé par du chloroforme ou du chlorure de méthylène pour en extraire les méthylxanthines. Les polyphénols sont alors extraits par de l'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue est concentrée à sec puis lyophilisée pour éliminer toute trace d'eau.

Séparation par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

Parmi les différentes méthodes permettant d'isoler les polyphénols des fèves de cacao, la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)[156] nous paraît la plus adaptée pour une première phase de préparation. La technique est basée sur le partage du soluté entre deux phases non miscibles, préparées en mélangeant deux ou plusieurs solvants. Le soluté se répartit entre une phase stationnaire maintenue par la force centrifuge et une phase mobile pompée à travers la phase stationnaire.

Parmi les différents systèmes de solvants décrits dans la littérature pour l'extraction et la purification des grandes familles de substances naturelles dont les flavonoïdes et les anthocyanes[157], nous avons choisi un système de solvants quaternaire mis au point au Laboratoire et dont la composition est la suivante: hexane/acétate d'éthyle/ éthanol/ eau dans les proportions suivantes : 1-8-2-7; (v/v, conditions I) et 4-5-3-3;(v/v, conditions II) [158].

Le regroupement des fractions issues de la CPC se fait à partir des profils d'analyse obtenus par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) sur toutes les fractions obtenues. La Figure 17 présente l'ensemble des profils CCM obtenus à partir d'un extrait EPT de fèves de cacao. Les fractions sont regroupées par blocs comme indiqué sur la figure 17. Les blocs

numérotés de V à XII correspondent aux anthocyanes, ils ne font pas fait l'objet de la présente étude. Les blocs I à IV ont été retenus pour une analyse par CLHP. Le bloc I qui ne contient pas de polyphénol est écarté.

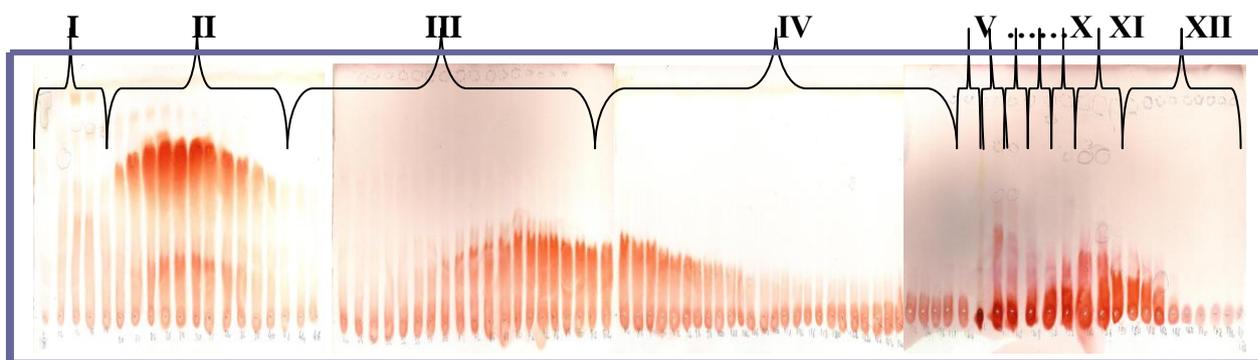


Figure 17 : le profil CCM de la CPC à partir de 4g d'un extrait EPT de fèves de cacao dans les conditions Hex/AcOEt/EtOH/H₂O en proportion 1-8-2-7. 90 fractions de 6 ml ont été collectées et regroupées par blocs

Le bloc II représente 5,9 % du poids de départ. Il contient majoritairement de la (-)-épicatéchine. Les blocs III et IV représentent respectivement: 1,2 et 1,5 % du poids de départ et contiennent majoritairement des oligomères qui nécessitent une purification par CLHP préparative. Le bloc II est soumis à une nouvelle purification par CPC avec le système de solvant précédemment décrit (condition II). Après analyse par CLHP, les nouveaux blocs VIIb et XIIb sont récupérés pour une ultime purification par CLHP préparative.

Les purifications par CLHP sont réalisées sur colonne C18 avec un gradient méthanol-eau variant de 15 % à 100 % (MeOH) sur une durée de 120 mn. L'ensemble de ces opérations est schématisé dans la Figure 18.

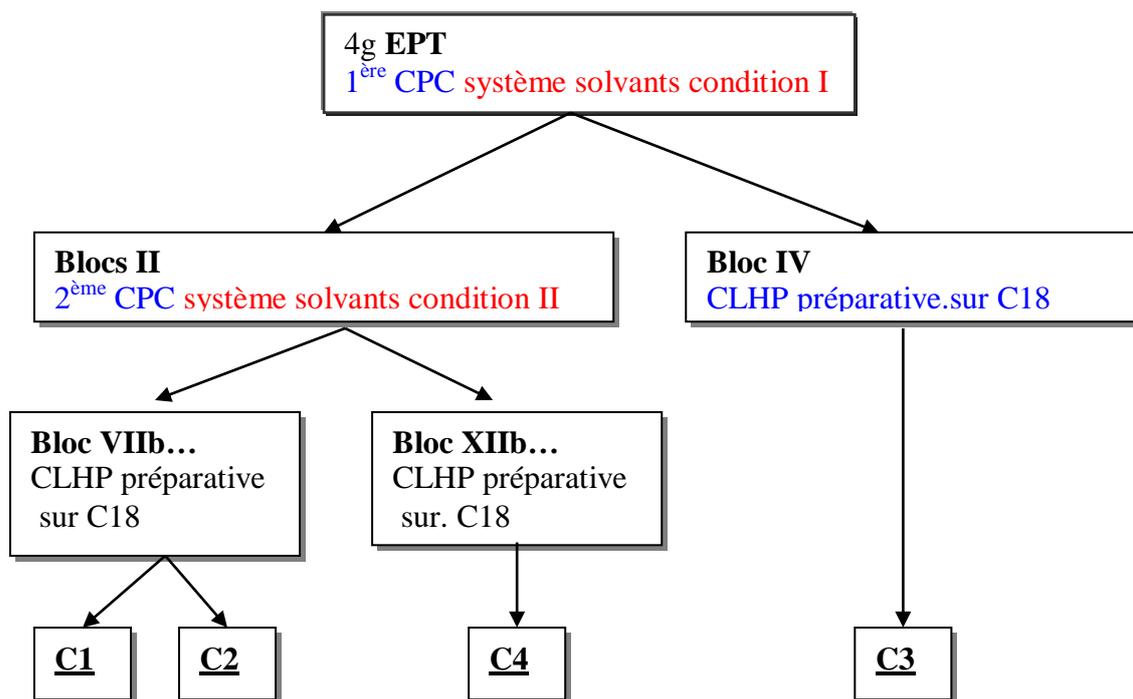


Figure 18 : Schéma de purification des composés C1 à C4 à partir de l'extrait total.

Caractérisation des composés isolés

Quatre molécules majoritaires ont été isolées à l'état pur à partir de l'extrait EPT suivant le protocole présenté dans la figure 18. Leur caractérisation a été effectuée par les méthodes classiques : spectrométrie UV Visible, polarimétrie, spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire.

C1 : (+)-catéchine

Le spectre de masse (FAB) du produit C1 présente un pic moléculaire à $m/z = 291,1$ en mode positif $[M+H]$, correspondant à la formule $C_{15}H_{14}O_6$. Le spectre UV présente un maximum d'absorbance à 279,3nm. Les spectres RMN enregistrés 1H et ^{13}C (1D et 2D) présentent les caractéristiques de la (+)-Catéchine (Tableau 3) [159]. Le pouvoir rotatoire mesuré dans l'acétone donne un $[\alpha]_D^{26^\circ}$ de + 11 proche de celui de la (+)-Catéchine ($[\alpha]_D^{26^\circ} = + 16$). Cette différence peut s'expliquer par la coloration de la solution même après addition de noir animal. Les R_f respectifs observés en CCM pour C1 et la (+)-Catéchine sont identiques de même que les temps de rétention mesurés en CLHP phase inverse sur colonne C18. Les données spectrales RMN ^{13}C obtenues pour C1 et représentées pour comparaison

avec celles de la (+)-catéchine dans le Tableau 3 montrent l'identité des produits dont la structure est présentée dans la Figure 19.

N° de carbone	C1	(+)-catéchine]
C2	82	81,3
C3	67	67
C4	27	24,4
C4a	101	99,3
C5	156	156,4
C6	94	94,8
C7	158	155,8
C8	95	94,1
C8a	155	155,6
C1'	131	130,9
C2'	114	113,9
C3'	145	144,3
C4'	145	144,3
C5'	115	114,4
C6'	118	118,7

Tableau 3 : Déplacements chimiques ^{13}C comparés du composé **C1** (méthanol- d_4) et de la (+)-Catéchine (acétone- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$)

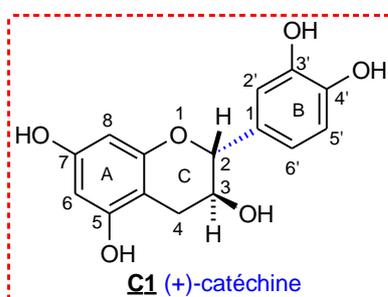


Figure 19 : Structure du composé **C1** (la (+)-catéchine)

C2 : (-)-épicatéchine

Le spectre de masse (FAB) du produit **C2** présente un pic moléculaire à $m/z = 291$ en mode positif $[\text{M}+\text{H}]^+$, correspondant à la formule $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Le spectre UV présente un maximum d'absorbance à 279,3 nm. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C (1D et 2D) enregistrés en solution dans le méthanol- d_4 présentent les caractéristiques de la (-)-épicatéchine[159]. Le pouvoir rotatoire mesuré dans l'acétone donne un $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ de - 47,2 proche de celui de la (-)-épicatéchine ($[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -52$). Les RF respectifs observés en CCM pour **C2** et la (-)-épicatéchine sont identiques de même que les temps de rétention respectifs mesurés en CLHP

phase inverse C18. Le spectre RMN 1D de **C2** est identique à celui connu de la (-)-épicatéchine dont la structure est présentée Figure 20.

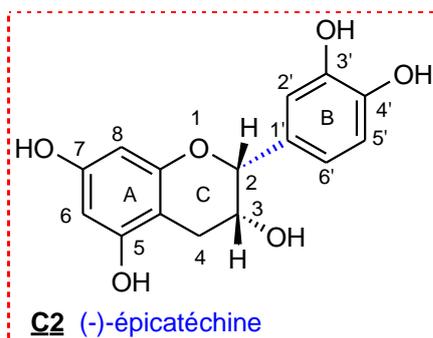


Figure 20 : Structure du composé **C2** (la (-)-épicatéchine)

C3 : procyanidine B2

Le composé **C3** est isolé par CLHP C18 préparative à partir du bloc IV de la 1^{ère} CPC. L'analyse par CCM de **C3** permet d'observer après révélation par l'anisaldéhyde un spot orangé-brun caractéristique des tanins catéchiques. Le R_f est inférieur à celui des monomères et superposable à ceux des dimères de références. Le spectre de masse (FAB) de **C3** présente un pic moléculaire à m/z = 577 en mode négatif [M-H], correspondant à la formule brute C₃₀H₂₆O₁₂. Le spectre UV présente un maximum d'absorbance à 279,3 nm. Les spectres RMN ¹H et ¹³C (1D et 2D) enregistrés en solution dans le méthanol-d₄ donne des raies fortement élargies mais présentent les caractéristiques de la procyanidine B2 [65, 159]. Le pouvoir rotatoire mesuré dans l'acétone donne un [α]_D^{26°} de + 34. La figure de la procyanidine B2 et présentée à la Figure 21.

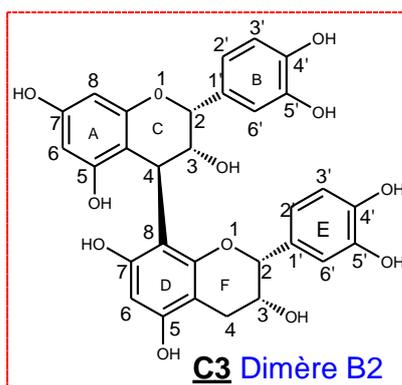


Figure 21 : Structure du composé **C3** (dimère B2)

C4 : procyanidine B5

L'analyse par CCM de **C4** montre après révélation par l'anisaldéhyde un spot orangé-brun caractéristique des tanins catéchiques. Le R_f est inférieur à celui des monomères et

superposable à ceux des dimères de références. Le spectre de masse (FAB) du produit **C4** présente un pic moléculaire à $m/z = 579,1$ en mode positif $[M+H]$, correspondant à la formule brute $C_{30}H_{26}O_{12}$. Le spectre UV présente un maximum d'absorbance à 279,3 nm. Les spectres RMN 1H et ^{13}C (1D et 2D) enregistrés dans le méthanol-d4 présentent les caractéristiques de la procyanidine B5 [160] comme on peut le voir par comparaison dans le Tableau 4.

N° de carbone	C4	procyanidine B5
C2	77,80	78,0
C3	72,5	73,4
C4	38,4	
C4a	99,5	101,4
C5	159,0	158,7
C6	96,9	96,9
C7	160,0	160,3
C8	97,5	97,5
C8a	160,0	160,2
C1'	133,5	133,1
C2'	116,5	116,0
C3'	146,0	146,7
C4'	146,0	146,4
C5'	116,5	116,7
C6'	120,0	120,0
C2	80,0	80,5
C3	67,9	68,2
C4	30,4	
C4a	101,0	101,4
C5	157,0	157,0
C6	109,0	108,9
C7	155,5	156,6
C8	97,5	97,4
C8a	155,5	156,2
C1'	133,5	133,1
C2'	116,5	116,1
C3'	146,0	146,7
C4'	146,0	146,5
C5'	116,5	116,7
C6'	120,0	120,2

Tableau 4 : Comparaison des spectres RMN ^{13}C du composé **C4** et du procyanidine B5 Le spectre ^{13}C du composé **C4** a été enregistré à 100 MHz en solution dans CD_3OD . Les données de la procyanidine B5 proviennent de la référence de Cheng-Ben et al [160]

La structure du dimère de la procyanidine B5 est présentée dans la Figure 22.

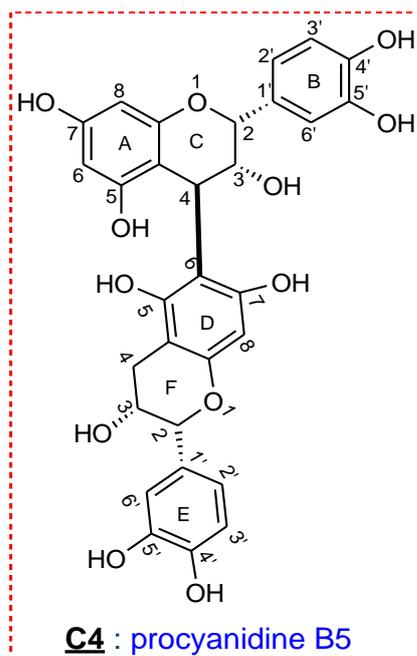


Figure 22: Structure du composé **C4** (dimère B5)

Conclusion

Les quatre composés provenant de l'extrait EPT des fèves fraîches de *Theobroma cacao* ont été obtenus avec des quantités très variables. Le bloc II qui représente 240mg d'extrait à partir des 4g initial d'extrait EPT contient majoritairement de la (-)-épicatéchine, et en quantité nettement plus faible de la (+)-catéchine et du procyanidine B5 (6mg représentant 0,15% de l'extrait EPT). A partir des 60mg du bloc IV (soit 0,015% des 6g de l'extrait EPT), on a extrait 18mg de procyanidine B2. Pour disposer des quantités suffisantes de ces quatre produits, surtout les minoritaires, les opérations de purifications ont été répétées plusieurs fois. Ces quatre composés ont été préparés pour faire l'objet d'études biologiques spécifiques sur les récepteurs membranaires aux androgènes impliqués dans le cancer de la prostate.

II.2.2 Procyanidine B2 extrait à partir de pépins de raisin

Pour augmenter les quantités disponibles de procyanidine B2 dont nous avons besoin pour l'étude des réarrangements chimiques, nous avons procédé à une extraction de ce produit à partir de l'extrait de pépins de raisins.

Pour cette opération d'extraction, nous avons utilisé le protocole mis au point par C. Castagnino[161]. 50g d'extrait sec ont été soumis à séparation, en une seule opération, sur une CPC 5 litres utilisant le système de solvants quaternaire Hex/AcOEt/EtOH/H₂O en proportion

1-8-2-7. Le profil d'élution CCM est présenté (Figure 23). Seuls les blocs VII et VIII (rendements respectifs : 8,9 % et 3 %) contenant le dimère B2 (**C3**) ont retenu notre attention. Le bloc VIII contient deux composés dont le majoritaire est le dimère B2.

VII VIII

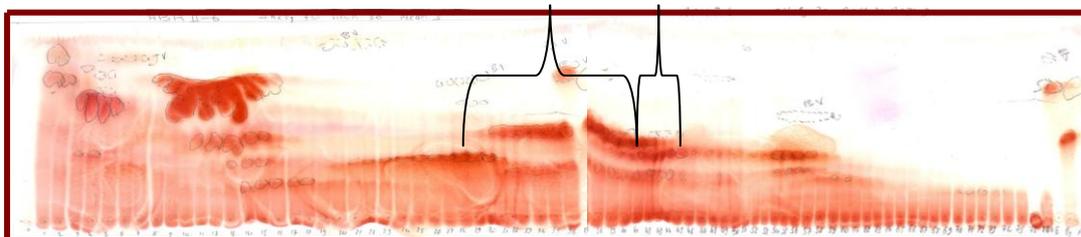


Figure 23 : Profil CCM de la CPC 5L à partir de l'extrait de raisin, Hex/AcOEt/EtOH/H2O : 1-8-2-7.

Cette opération nous a permis de purifier 500 mg de procyanidine B2 qui serviront à l'étude du réarrangement de la procyanidine B2 en milieu alcalin.

II.3 Réactivité des polyphénols **C1**, **C2** et **C3** en milieu alcalin

II.3 Epimérisation : (+)-catéchine et (-)-épicatechine

Les composés polyphénoliques **C1** et **C2** sont connus pour s'épimériser en milieu alcalin. La (+)-catéchine (**C1**) s'équilibre avec la (+)-épicatechine (**C6**) [162, 163] dans les proportions (3-1) et la (-)-épicatechine (**C2**) s'équilibre avec la (-)-catéchine (**C5**) [164, 165] dans les proportions de (1-3). Cette épimérisation implique le carbone C2 qui intervient dans un intermédiaire de type méthylène quinone. Le carbone 3 n'est en aucun cas impliqué dans ce mécanisme d'isomérisation (Schéma 1) et sa stéréochimie n'est en aucun cas affectée.

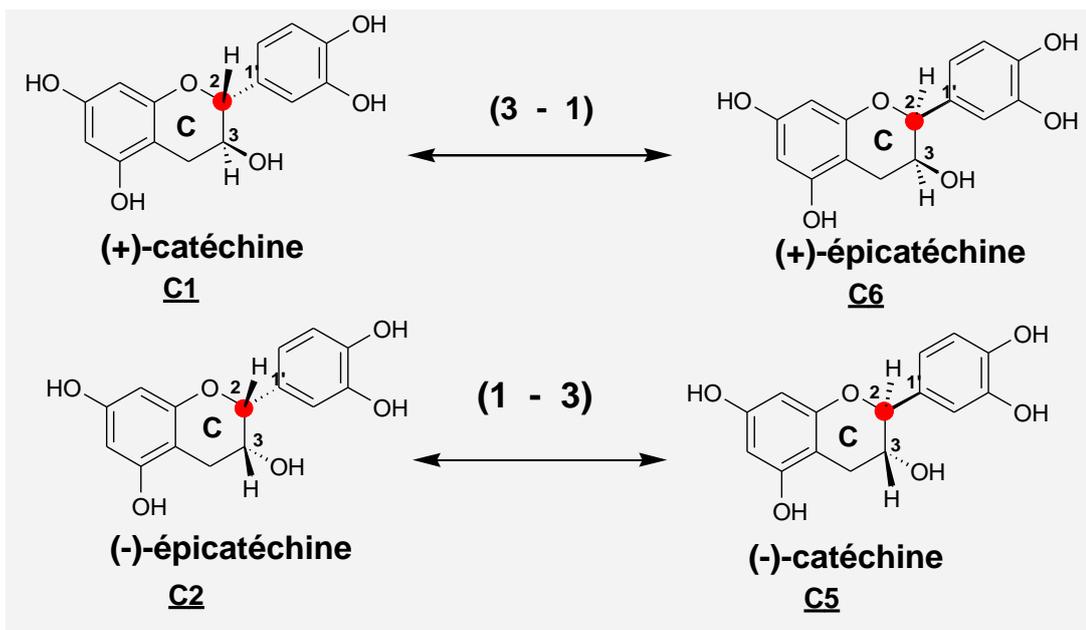


Schéma 1 : Isomérisation des catéchines en épicatechines

Le Schéma 2 illustre le mécanisme d'isomérisation de la (+)-catéchine en (+)-épicatechine. Il fait intervenir un premier intermédiaire phénolique radicalaire et anionique 4[166, 167], qui conduit à ouverture du cycle C et à la formation d'une méthylène quinone intermédiaire. Celle-ci conduit par recyclisation au produit de départ mais aussi à son isomère suivant que l'attaque de la double liaison se fait par la face supérieure ou la face inférieure. L'équilibre de cette réaction se fait en faveur du composé le plus stable. Dans le cas présent c'est la (+)-catéchine qui est le plus stable. Quand on compare les équilibres (-)-épicatechine \leftrightarrow (-)-catéchine et (+)-catéchine \leftrightarrow (+)-épicatechine on constate que ce sont les catéchines qui sont les dérivés les plus stable et les épicatechines les moins stables. Ceci est vraisablement lié à la stéréochimie et à l'encombrement stérique au niveau des carbones 2 et 3 où les substituants se trouvent en position équatoriale.

Dans les conditions limites (pH basique à chaud et en présence trace d'oxygène) la réaction d'épimérisation peut conduire de façon irréversible à l'acide catéchinique 5 par formation d'une liaison covalente entre le carbone 6 ou le carbone 8 et le carbone C2 [165, 168].

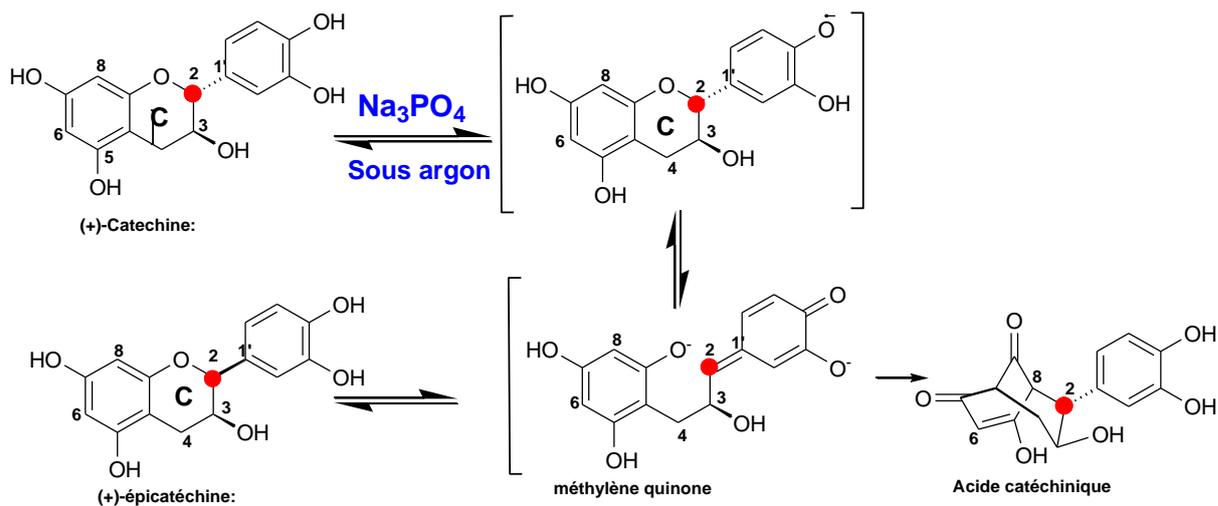


Schéma 2 : Mécanisme d'épimérisation (+)-catéchine ↔ (+)-épicatéchine par l'intermédiaire d'une méthylène quinone

II.3.2 Préparation de C5 et C6 par épimérisation de C2 et C1

L'extrait brut de cacao ne fournit que de la (+)-catéchine C1 et de la (-)-épicatéchine C2. Pour disposer en quantité suffisante des isomères C5 et C6 sur le carbone 2 nous avons procédé à la mise au point des conditions expérimentales nécessaires à la production de ces isomères à partir des produits naturels accessibles C1 et C2. Il faut travailler en absence totale d'oxygène sous atmosphère d'argon, contrôler la quantité de réactif (PO_4Na_3) et le temps de réaction. L'évolution de ces milieux réactionnels a été suivie par CLHP analytique sur colonne C18.

Ainsi la (-)-épicatéchine C2 s'isomérisent en 30 heures à température ambiante et sous atmosphère d'argon dans une solution de 60 mM de phosphate trisodique à pH 11,9. Dans ces conditions nous n'avons pu récupérer que 65% de brut réactionnel contenant le produit de départ et son isomère. La (+)-catéchine C1 s'isomérisent en 30 heures à température ambiante et sous atmosphère d'argon, mais avec une solution moins concentrée (30mM) de phosphate trisodique à pH 11,7. Dans ces conditions on récupère 97% de brut réactionnel contenant le produit de départ et son isomère.

Les produits de la réaction d'isomérisation sont purifiés par chromatographie préparative sur colonne C18 avec le mélange isocratique méthanol-eau dans la proportion 15-85. La Figure 24 présente le diagramme d'élution correspondant à la séparation de la (+)-catéchine C1 et de son isomère C6. Un diagramme identique est observé pour la séparation de la (-)-épicatéchine C2 en (-)-catéchine C5.

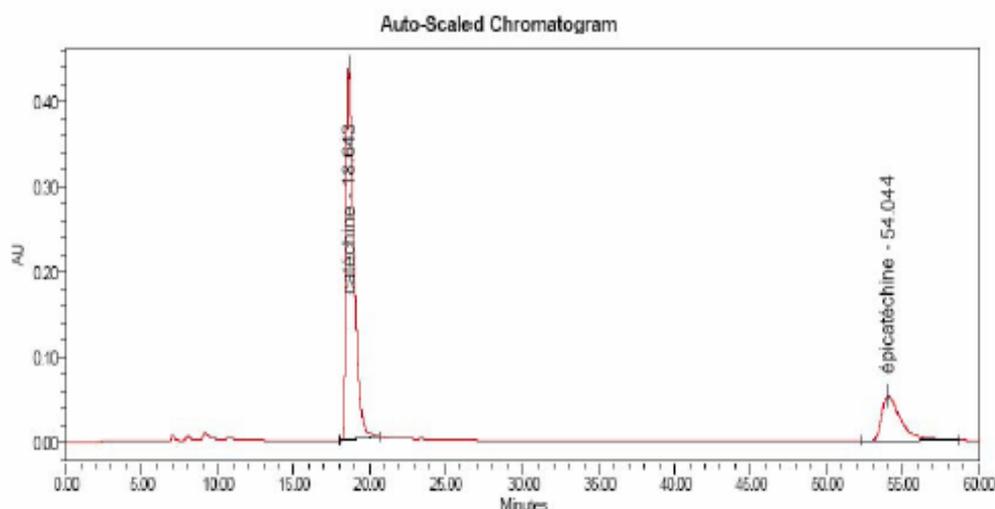


Figure 24 : Chromatogramme CLHP du mélange brut réactionnel. Condition : isocratique H₂O/MeOH 85/15 en 60 min. détection à 280 nm.

Ces réactions d'épimérisation des composés polyphénoliques **C1** et **C2** sont représentatives des réactions les plus simples qui peuvent se produire au cours de la fabrication du chocolat.

La (-)-épicatechine **C2** étant abondante dans notre extrait EPT on doit s'attendre à voir apparaître de la (-)-catéchine **C5** lors de la fabrication du chocolat. Il en est de même pour la (+)-catéchine **C1** qui doit donner de la (+)-épicatechine **C6** dans les mêmes conditions de la fabrication du chocolat.

Les deux énantiomères **C5** et **C6** obtenus en quantité suffisante au cours de cette préparation seront utilisés pour la réalisation de tests biologiques, la mesure de l'activité antioxydante et l'influence de ces produits sur la prolifération des cellules cancéreuses...

II.3.3 Réarrangement en milieu alcalin du dimère **C3**

Traitement de **C3** en milieu alcalin et purification des produits de réaction

On peut s'attendre pour la réaction d'isomérisation du dimère B2 (**C3**) en milieu alcalin à une plus grande complexité en raison du doublement du nombre de centres asymétriques et de l'encombrement stérique lié à la structure tridimensionnelle du dimère.

L'étude de l'épimérisation du dimère B2 en milieu alcalin s'est effectuée en solution de phosphate trisodique, sous atmosphère d'argon et à température ambiante. La mise au point des conditions de l'expérience a été effectuée à partir de petites quantités de produits en

variant la quantité de phosphate trisodique et le temps de réaction. L'évolution de la réaction au cours du temps étant suivie par CLHP analytique sur colonne C18 comme précédemment.

Le diagramme d'éluion CLHP de la Figure 25, correspond à l'analyse du brut réactionnel obtenu à partir de 200mg de procyanidine B2 mis à réagir dans 400ml d'une solution de phosphate trisodique 7,6 mM à pH 11,1. Pendant le temps de la réaction (150 minutes [169, 170]) on voit apparaître dans les diagrammes d'éluion CLHP de nouveaux pics précédant ou suivant le produit de départ. Le diagramme de la Figure 25 correspond à la fin de la réaction. Le pic le plus important correspond au dimère B2. Le deuxième pic en intensité est identifié à la (-)-épicatéchine **C2** par coinjection en CLHP avec le produit de référence. Le pic correspondant à la (-)-catéchine **C5** est identifié de la même façon par co-injection du produit de référence. Un 4^{ème} pic élué dans l'ordre, après la (-)-catéchine **C5** le dimère B2 et la (-)-épicatéchine **C2** correspond suivant la spectrométrie de masse à un dimère (**C7**) de masse identique à celle du produit de départ mais avec un temps d'éluion beaucoup plus long. Cinq autres composés correspondants à des pics de plus faibles intensités n'ont pu être analysés [94, 169-174].

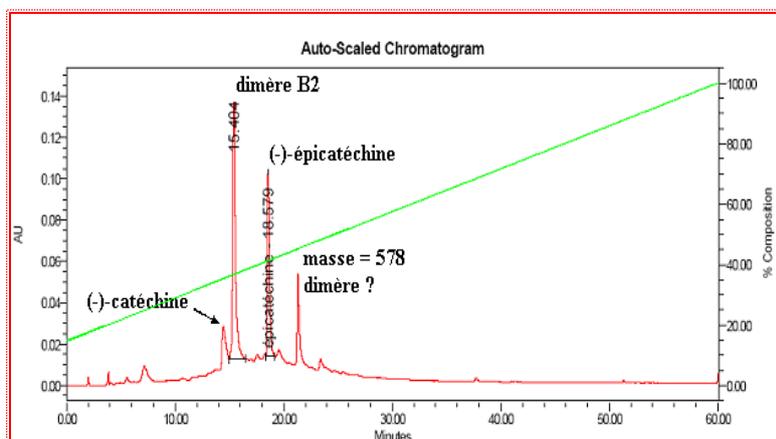


Figure 25 : Chromatogramme du brut réactionnel du composé **C3** dimère (B2) en milieu alcalin.

La (-)-épicatéchine **C2** est le constituant de base du dimère. Sa présence dans le milieu réactionnel est donc très attendue. Par contre, la faible quantité isolée de (-)-catéchine **C5** doit être reliée au temps de réaction très court qui ne permet pas l'épimérisation complète de la (-)-épicatéchine **C2** en (-)-catéchine **C5** dans les proportions décrites précédemment (Schéma 1) [175]. Le Schéma 3 présente de manière synthétique les différents produits obtenus dans la purification des produits dérivés du dimère **C3**.

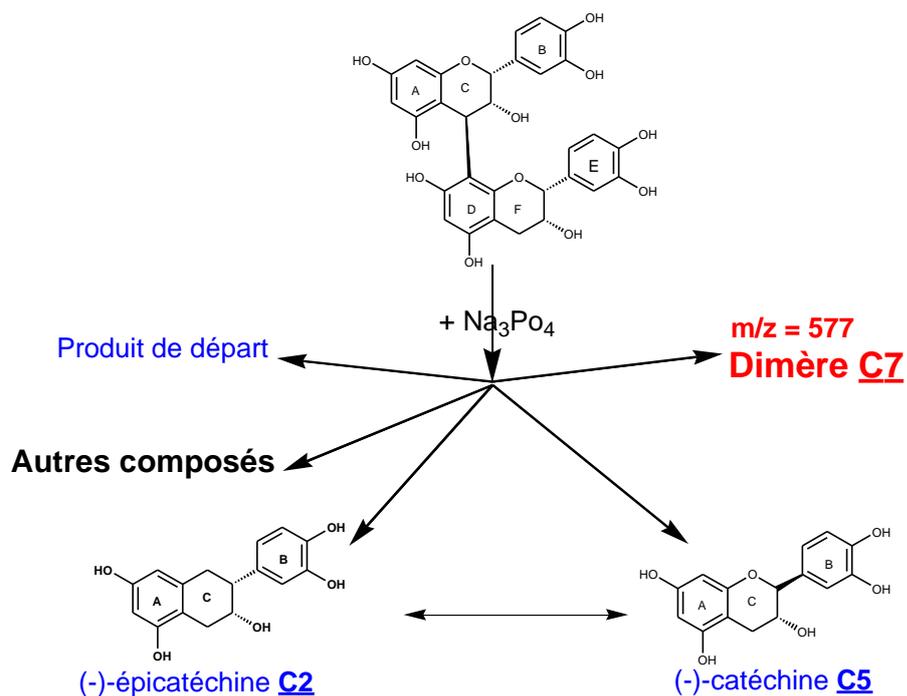


Schéma 3 Différents réarrangements réactionnels du dimère B2 C3 en milieu alcalin

Etudes spectroscopiques du composé C7 par spectrométrie de masse et de RMN

Etude de C7 par spectrométrie de masse

Le spectre de masse (FAB) présenté dans la Figure 26 donne un pic moléculaire à $m/z = 577$ en négatif $[M-H]$, correspondant à la formule brute $C_{30}H_{26}O_{12}$. Il s'agit donc toujours d'un dimère.

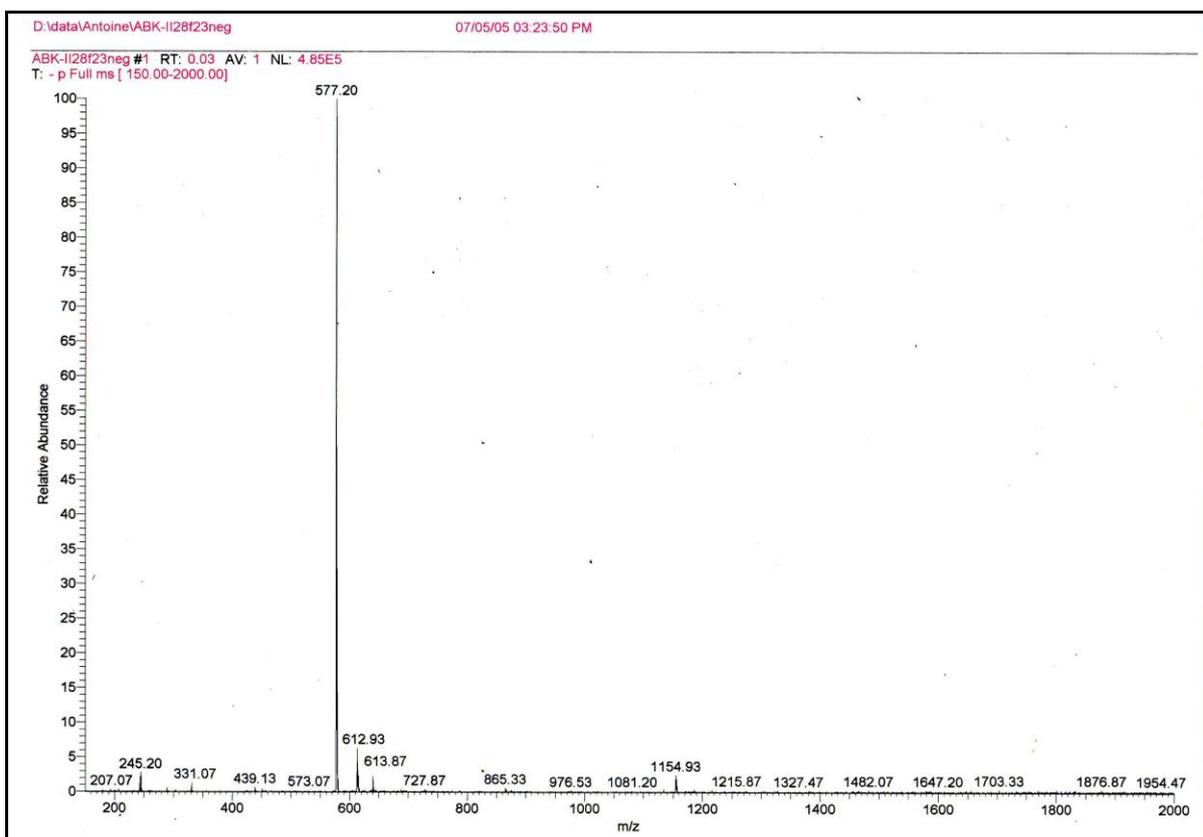


Figure 26 Spectre de masse du composé **C7** en mode négatif.

Le spectre de masse enregistré en mode *MS/MS* (Figure 27) permet d’observer différents fragments à m/z 245,15, 289,12, 331,10, 407,21, 425,10, 449,10 451, 00, 467,08, 559,09 et 577,05. Ce dernier correspond au pic moléculaire en mode négatif [M-H].

Deux pics intenses à $m/z = 451,00$ et à $m/z = 467,09$ sont caractéristiques de la perte d’une unité phloroglucinol de masse 125 ($C_6H_5O_3\bullet$) et de la perte d’une unité catéchol de masse 109 ($C_6H_5O_2\bullet$). Il nous faudra donc retrouver ces deux unités dans la structure du dimère.

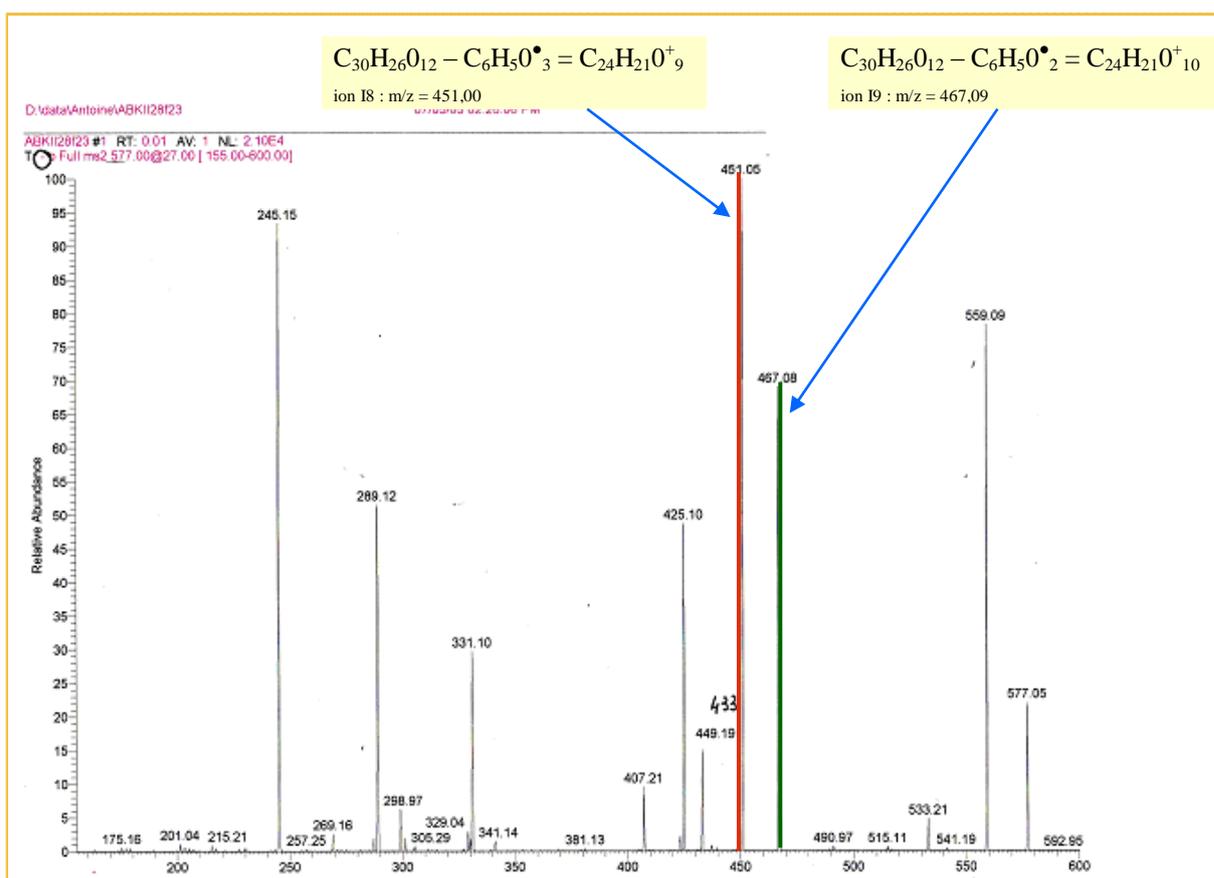


Figure 27 : Spectre de masse du composé **C7**, fragmenté MS/MS. Coupure de l'unité phloroglucinol → ion I8 puis du catéchol → ion I9.

Etude du dimère **C7** par spectrométrie de RMN

Les spectres de RMN du composé **C7** en solution dans le méthanol deutérié (CD₃OD) ont été enregistrés en mode homonucléaire 1D et 2D. Les spectres COSY et HMBC sont présentés dans les (Figure 28 et Figure 31).

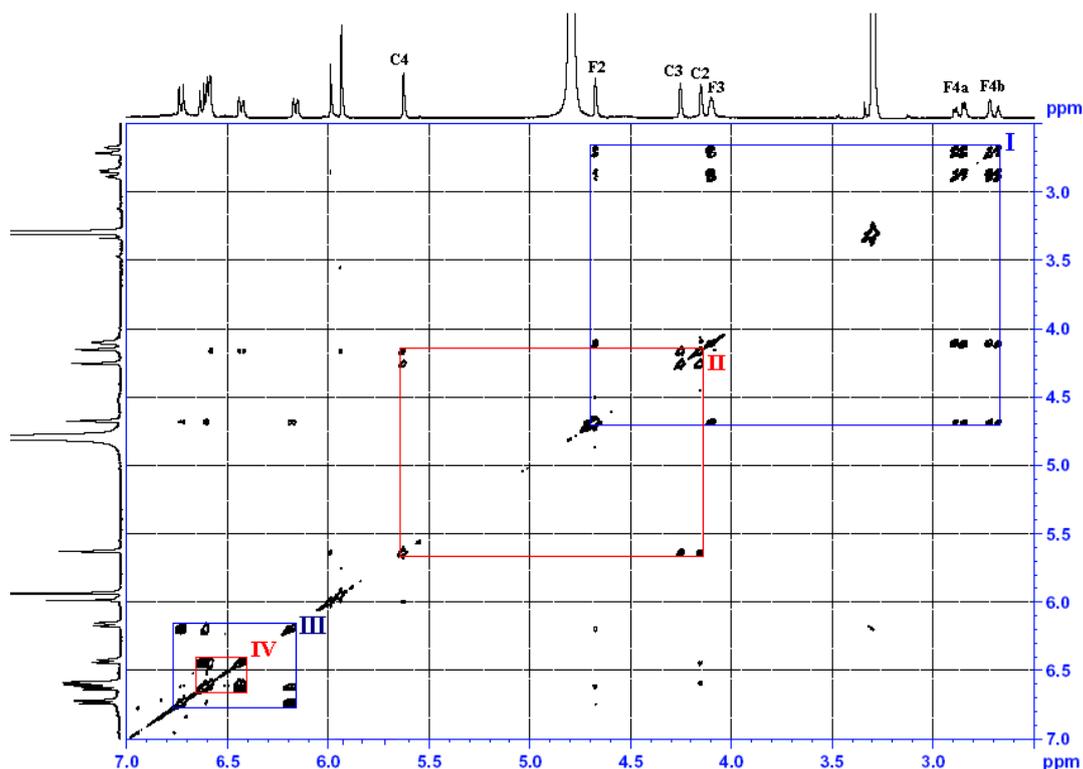


Figure 28: spectre COSY de **C7** enregistré à 400 MHz en solution dans CD₃OD. Quatre systèmes de spin de 3 et 4 protons sont observés et numérotés de I à IV.

Les spectres protons 1D et 2D COSY permettent d'identifier quatre systèmes de spin de 3 et 4 protons numérotés dans la figure 28 de I à IV. Le système de spin I bien identifié par ses deux protons géminaux 4a et 4b à 2,70 et 2,87 ppm permet de caractériser l'unité inférieure du polyphénol. Les protons H3 et H2 du cycle pyranne F de l'unité inférieure sont rapidement repérés dans le spectre COSY à 4,10 ppm et 4,67 ppm et caractérisés par la position de leurs carbones à 68 ppm et 79 ppm dans le spectre HMBC (figure 29). Les couplages longue distance entre le proton H2 du système de spin I et les 3 protons aromatiques du système de spin III (figure 28) permettent de caractériser l'enchaînement du noyau catéchol E et du cycle pyranne F. Les couplages hétéronucléaire entre le proton H2 et les 3 carbones 1, 2 et 6 du cycle F confortent cette attribution. Le spectre HMBC montre également des couplages longue distance $^2J_{CH}$ et $^3J_{CH}$ entre les protons géminaux H4a et H4b avec les carbones 3 et 2 du même cycle pyranne F mais aussi 3 autres couplages avec 2 carbones quaternaires aromatiques hydroxylés entre 155 ppm et 160 ppm et avec un carbone aromatique à 99,9 ppm. Ce dernier correspond au carbone 4a ($^2J_{CH}$) et les 2 précédents aux carbones 5 et 8a ($^3J_{CH}$) (Figure 29).

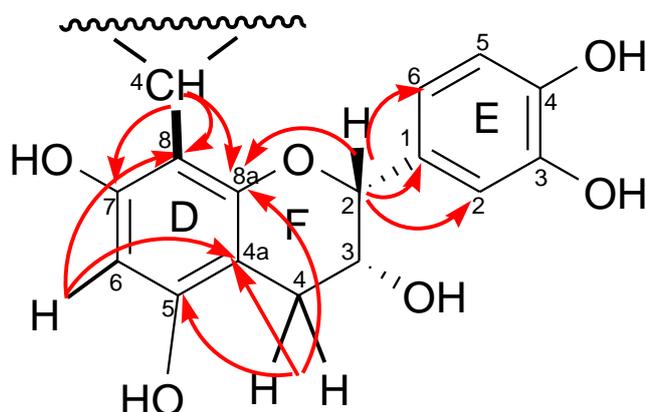


Figure 29 : couplages longue distance H-C observés sur l'unité inférieure

Le proton aromatique à 5,98 ppm présente 2 couplages longue distance $^3J_{CH}$ avec deux carbones quaternaires aromatiques dont le carbone 4a à 99,9 ppm déjà remarqué pour son couplage avec les protons H4a et H4b du cycle F. Le second carbone aromatique correspond au carbone 8 du cycle D impliqué dans la liaison interflavanique (LIF). L'attribution de la résonance à 5,98 ppm au proton H6 du cycle D découle de la présence d'un faible couplage longue distance entre le proton H2 du cycle F et le carbone 8a du cycle D qui permet de caractériser une liaison interflavanique de type 4-8 [176]. Le proton H4 du cycle C de l'unité supérieure à 5,62 ppm est couplé avec les carbones 7, 8 et 8a du cycle D à 156,9 ppm, 104,9 ppm et 154,4 ppm pour lesquels des corrélations ont déjà été observées à partir du proton H6 du cycle D et H4a/H4b du cycle F. Un couplage longue distance est observé dans le spectre COSY entre le proton H6 du cycle D à 5,98 ppm et le proton H4 du cycle C de l'unité supérieure à 5,62 ppm.

Les systèmes de spin II et IV du spectre 2D COSY de la figure 28 correspondent aux 3 protons du cycle pyranne C de l'unité supérieure et aux 3 protons de l'unité catéchol du cycle B. Le proton H2 du cycle pyranne à 4,15 ppm est identifié par ses couplages avec les protons H2 et H6 du cycle catéchol à 6,58 ppm et 6,42 ppm. Le carbone correspondant au proton H2 résonne à 45,3 ppm, ce qui ne correspond pas à la proximité d'un oxygène comme dans le produit de départ. Le proton H3 est identifié à 4,25 ppm et présente une constante de couplage de 2,2 Hz avec le proton H2. Le proton H4 du cycle C déjà identifié à 5,62 ppm, présente une constante de couplage de 1,2 Hz avec le proton H3. Le carbone correspondant au proton H4 est observé à 69,9 ppm ce qui traduit la proximité du carbone 4 du cycle C avec un oxygène.

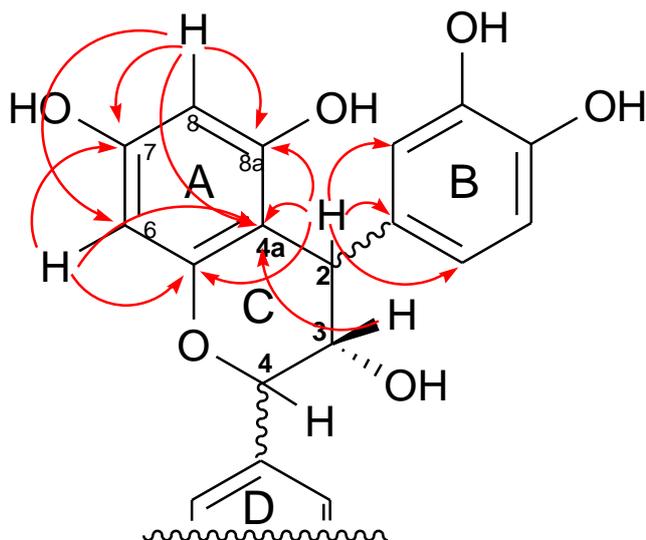


Figure 30 : Couplages longue distance $2J_{CH}$ et $3J_{CH}$ observés à partir des protons H2, H3 du cycle C et H6, H8 du cycle A dans le spectre HMBC de la figure 30

Les deux protons du cycle A présentent une seule résonance de deux protons à 5,93 ppm mais avec 2 carbones inéquivalents à 95,1 ppm et à 96,4 ppm comme on peut le voir sur le spectre HMBC de la Figure 31. Trois couplages longue distance $^3J_{CH}$ sont observés entre les deux protons aromatiques H6 et H8 et les carbones aromatiques 8, 6 et 4a du même cycle à 104,9 ppm, 97,7 ppm et 99,9 ppm. Trois autres couplages sont observés entre ces protons et les trois autres carbones 5, 7 et 8a du cycle A situés à 157-159 ppm. Le carbone 4a du cycle A se retrouve fortement couplé aux protons 2 et 3 du cycle C mais plus au proton 4 comme dans le produit de départ. Par contre un couplage longue distance est observé dans le spectre COSY (figure 28) entre les protons 6/8 du cycle A et le proton 2 du cycle C, ce qui avec les résultats précédents indique que le cycle A est maintenant porté par le carbone 2 comme le cycle catéchol B (Figure 31). Compte tenu de l'intensité de corrélations du proton 4 avec les carbones D8a et D7, il n'est pas possible d'observer un quelconque couplage entre le proton H4 et un carbone quaternaire hydroxylé provenant du cycle A.

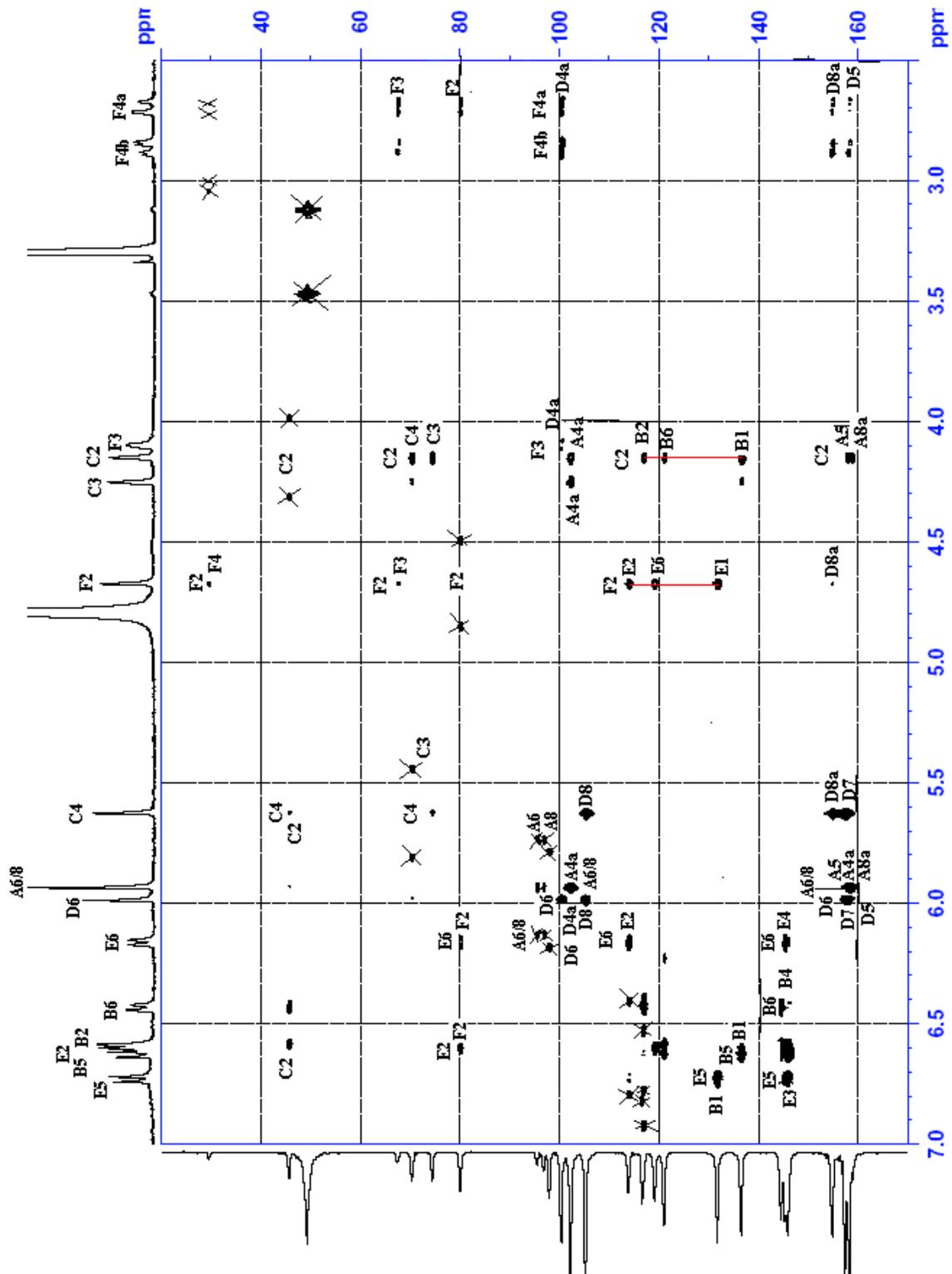


Figure 31: spectre HMBC de C7 enregistré à 400 MHz ^1H et 100 MHz ^{13}C en solution dans CD_3OD . Les pics résiduels sont cochés X. Les lettres A, B... E et F correspondent aux cycles du polyphénol et les chiffres aux numéros des atomes.

Les constantes de couplages mesurées à partir du proton 3 du cycle C donnent une constante de 2,2 Hz avec le proton H2 et une constante de 1,1 Hz avec le proton H4.

Ces premiers résultats suggèrent une structure pour le composé **C7** différente de celle obtenue par BURGER et al. lors du traitement du procyanidine B2 en milieu alcalin[169].

Hypothèses et mécanismes de réarrangements des dimères polyphénoliques en milieu alcalin.

L'élucidation de la structure du composé **C7** à partir des données spectrales obtenues, nécessite d'envisager les différents mécanismes d'épimérisation et de réarrangement susceptibles d'intervenir dans la transformation de la procyanidine B2 en **C7** en milieu alcalin. Tous les mécanismes partent de l'ouverture du cycle pyranne avec formation d'une méthylène quinone intermédiaire (Figure 32), susceptible de réagir avec les groupes hydroxyles proches fortement nucléophiles.

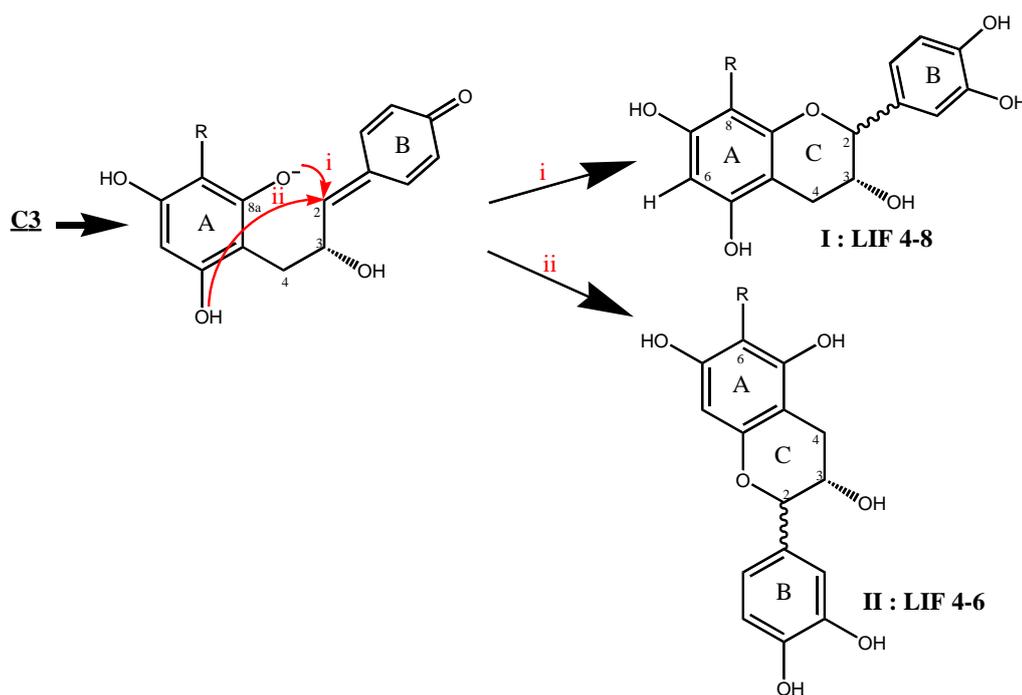


Figure 32 : Réactions de cyclisation à partir de la méthylène quinone intermédiaire conduisant aux composés I et II par attaque des groupes hydroxyles C8a-OH (i) et C5-OH (ii) (R= H ou polyphénols)

Si le groupe R est un hydrogène, l'attaque de la double liaison de la méthylène quinone par les groupes hydroxyles en 8a ou en 5 conduira au même dérivé ou au même mélange d'épimères en C2 selon que l'attaque - stéréospécifique ou non - se fera par l'une ou

l'autre face de la double liaison en raison de l'encombrement stérique. Si R est un groupe flavanol, l'attaque de la double liaison de la méthylène quinone par les hydroxyles en 5 et en 8a conduira à des composés différents avec formation d'une liaison interflavanique de type 4-6 ou 4-8 par simple rotation autour de la liaison 4a-4 avant l'attaque de la double liaison par l'un des deux groupes hydroxyles fortement nucléophiles (Figure 32).

Si l'on considère maintenant l'unité supérieure d'un dimère polyphénolique, la position 4 du cycle C est maintenant substituée par un groupe flavanol (Figure 33). L'attaque de la double liaison de la méthylène quinone de l'unité supérieure pourra se faire comme précédemment par l'un des hydroxyle en 8a ou en 5 du cycle A mais aussi par un hydroxyle provenant du cycle phloroglucinol de l'unité inférieure. Dans ce dernier cas on pourra obtenir des dérivés de type phlobatannin où le cycle aromatique D se retrouve accolé à deux cycles pyranes. Différents arrangements des trois cycles sont possibles selon la structure de l'unité inférieure (LIF 4-8 ou LIF 4-6).

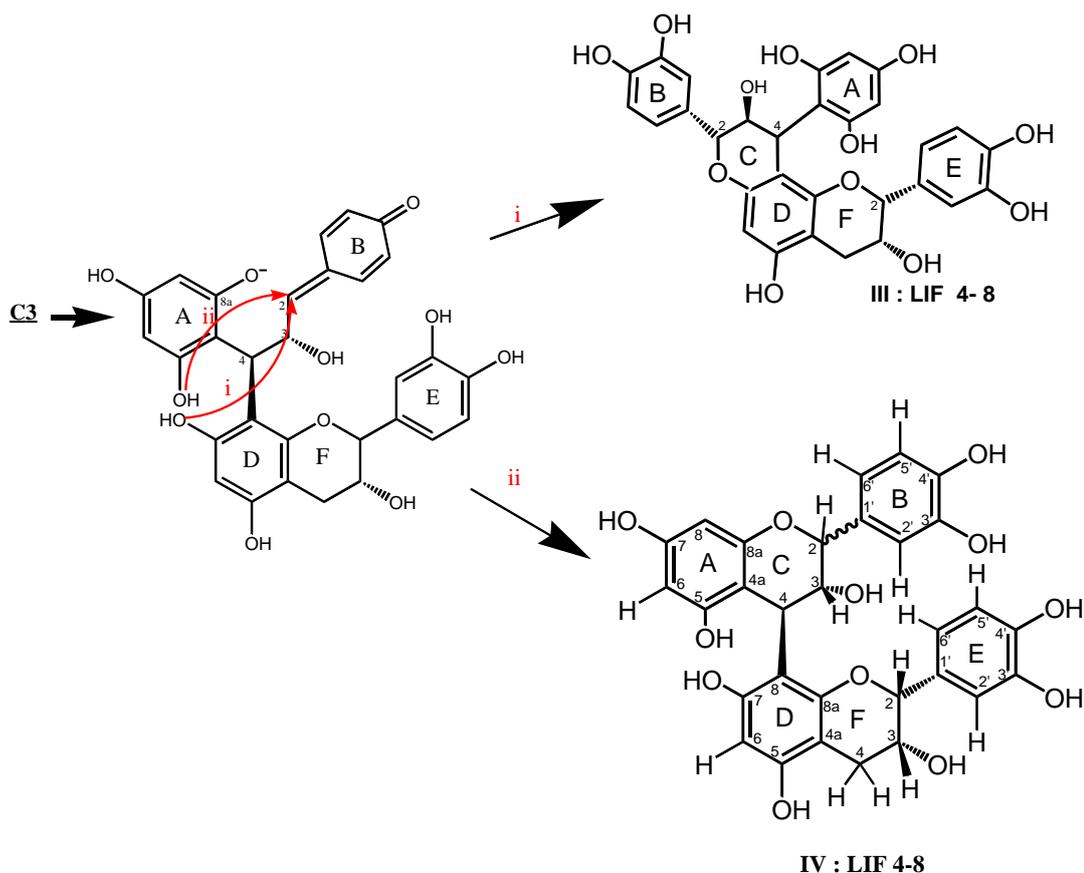


Figure 33 : Réactions de cyclisation à partir de la méthylène quinone intermédiaire conduisant aux composés III et IV par attaque des groupes hydroxyles 7OH du cycle D (i) et 5OH du cycle A (ii). Le composé III est de type phlobatannin

L'attaque de la double liaison de la méthylène quinone intermédiaire peut également s'effectuer à partir de l'un des carbones 4a, 6 ou 8 du cycle A également nucléophiles. L'attaque par l'un des carbones 6 ou 8 conduirait à un dérivé de type acide catéchinique comme cela à déjà été présenté dans le Schéma 1 de la première partie de cet exposé. L'attaque de la double liaison de la méthylène quinone par le carbone 4a du cycle A (réaction de Michael) va conduire à la formation intermédiaire d'un cycle de type cyclobutane (Figure 34) qui va rapidement se rompre avec l'assistance de l'un des cycles polyphénoliques voisins pour conduire à une nouvelle méthylène quinone avec migration du cycle phloroglucinol du carbone 4 au carbone 2.

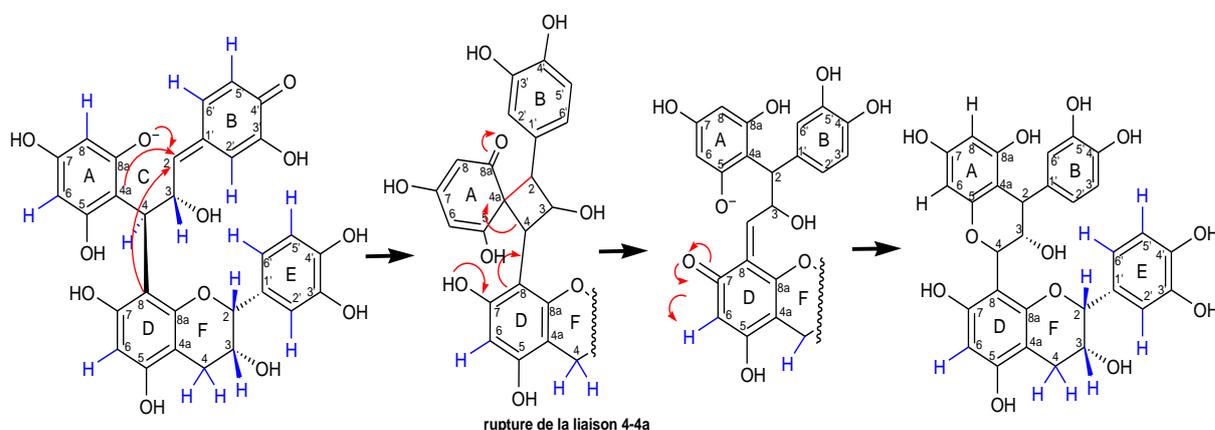


Figure 34 : Réarrangement avec migration du cycle A du carbone 4 au carbone 2. Le carbone 4a du cycle A attaque le carbone 2 de la méthylène quinone, ce qui conduit à un cyclobutane instable et à la migration du cycle A sur le carbone 2.

Une réaction identique peut impliquer non plus le carbone 4a du cycle A mais le carbone 8 du cycle D de l'unité inférieure. Dans ce cas elle conduit non plus à la migration du cycle A du carbone 4 au carbone 2 mais à celle du groupe flavanol (Figure 35) avec formation d'une structure de type phlobatannin comme décrit plus haut dans la figure 33 mais intervention des cycles A et B. Une structure de ce type a été décrite par Burger et al [169].

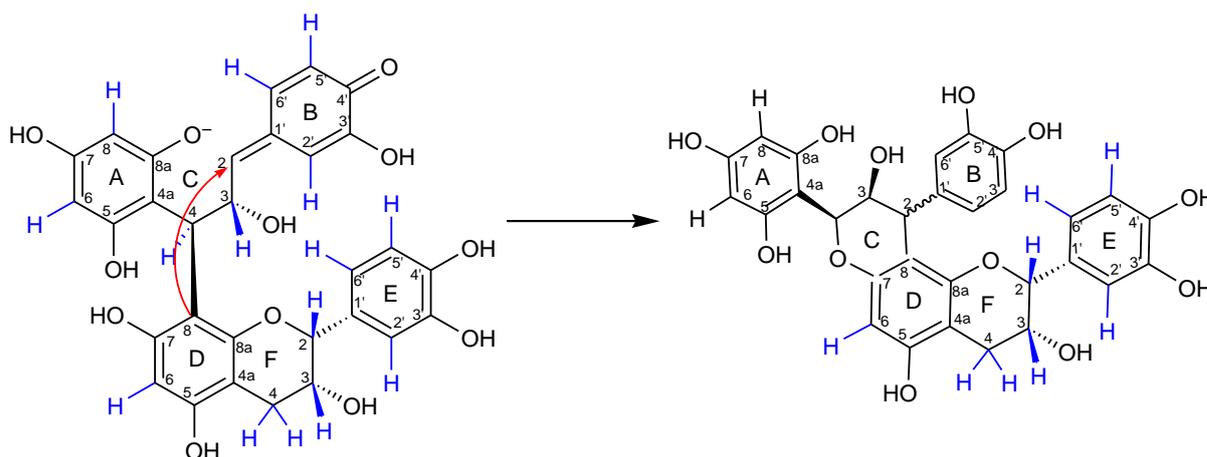


Figure 35 : Réarrangement avec migration du cycle flavanol du carbone 4 au carbone 2 et formation d'un nouveau cycle pyrane. C'est le carbone 8 du cycle D qui attaque le carbone 2 de la méthylène quinone et donne lieu au réarrangement par l'intermédiaire d'un cyclobutane comme précédemment décrit dans la figure 34.

Une ou plusieurs combinaisons des réactions d'épimérisation avec celle de réarrangements peut conduire à de multiples produits où la stéréochimie en C2 et C4 dépendra de différents facteurs dont l'encombrement stérique. Après la formation d'une méthylène quinone intermédiaire, l'attaque de la double liaison peut s'effectuer par l'une ou l'autre de deux faces conduisant éventuellement à des mélanges d'énantiomères ou à un composé majoritaire si l'attaque par l'une des faces est favorisée. Dans le réarrangement d'un dimère tel que B2, la stéréochimie en 3 ne sera pas affectée mais très certainement celles des carbones 2 et 4. La mesure des constantes de couplage J_{2-3} et J_{3-4} sera susceptible de fournir des informations utiles pour résoudre ce problème.

Il est très utile dans l'analyse structurale des dimères de pouvoir déterminer le type de liaison interflavanique (LIF). Ceci peut se faire à partir de l'observation des couplages longue distance dans les spectres HMBC. La liaison sera de type 4-8 quand les protons H4 du cycle et H2 du cycle F sont couplés au même carbone quaternaire 8a (Figure 36). Dans le cas d'une liaison interflavanique de type 4-6 le proton en 2 du cycle C ne peut plus voir le carbone quaternaire 8a (devenu 5 par suite du changement de numérotation) [176].

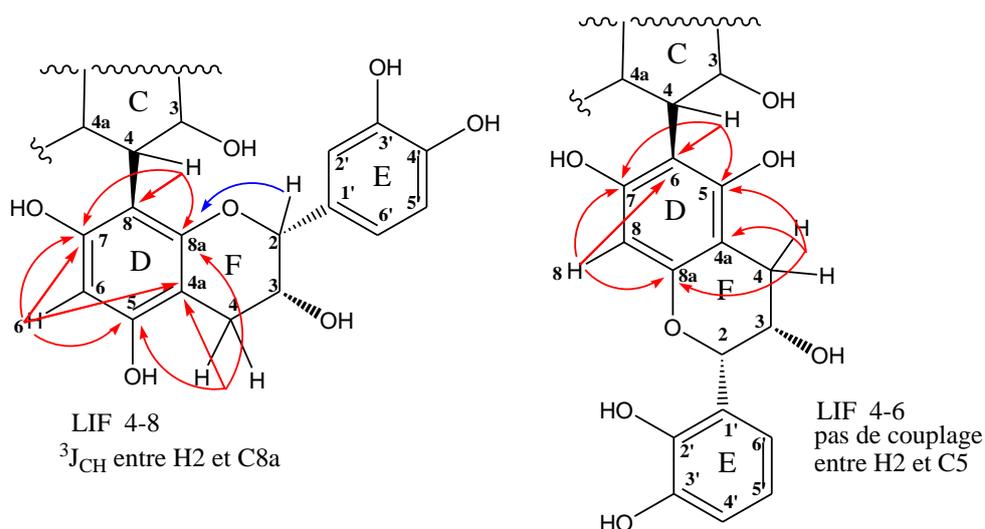


Figure 36 : Etablissement de la liaison interflavanique 4-6 ou 4-8 à partir de l'observation des couplages longue distance J_{CH} à partir des protons 4 du cycle C et 2 du cycle F [176]

Proposition de structure de l'Ebaphlobanidol

Les résultats de la spectrométrie de masse indiquent la perte d'un cycle catéchol mais aussi celle d'un cycle phloroglucinol ce qui pourrait suggérer que ce dernier cycle n'est relié à la structure du composé **C7** que par une seule liaison avec possibilité de rotation du cycle autour de cette liaison.

Les données RMN privilégient une structure du dimère ayant subi un réarrangement avec migration du phloroglucinol du carbone 4 sur le carbone 2 du cycle pyranne C, sans modification de la structure de l'unité inférieure. Les constantes de couplages $J_{2,3} = 2,2$ Hz et $J_{3,4} = 1,1$ Hz mesurés sur le cycle C de l'unité supérieure suggèrent selon les données de la littérature une stéréochimie (2R,3R,4S)-2,3-cis-3,4-trans [177]. L'observation d'un couplage $^3J_{CH}$ entre le proton H4 du cycle C et le proton H2 du cycle F indique que la liaison interflavanique (LIF) est de type 4-8.

Des mesures complémentaires seront nécessaires pour affiner la structure du composé **C7**.

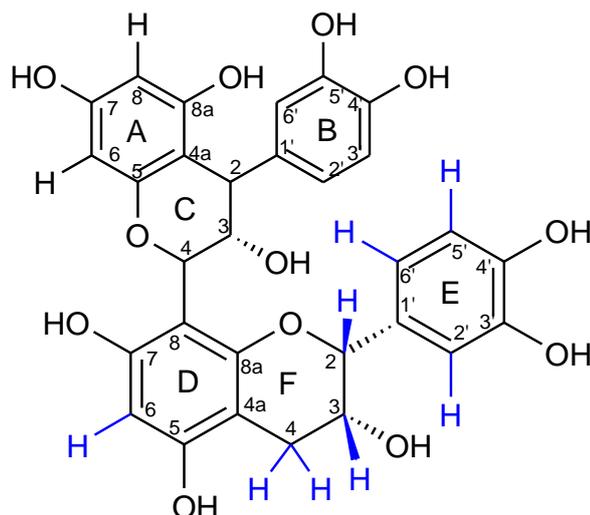


Figure 37 : Structure possible du composé C7

II.4 Étude des polyphénols d'un chocolat commercial

Le but de cette investigation est d'acquérir une meilleure connaissance du contenu polyphénolique de la fève fraîche de cacao, de son éventuelle modification dans le chocolat commercial suite aux différents procédés industriels à savoir la fermentation, le séchage, la torréfaction et l'alcalinisation.

Notre étude a été réalisée à partir de 300 g de chocolat noir à 86% de cacao (marque Côte d'or) dissout dans 300 ml d'eau portée à 90 °C. Après refroidissement la solution est délipidée par 3 lavages successifs à l'hexane. La quantité de lipide obtenue après évaporation de l'hexane représente 117 g, soit 39 % du poids initial du chocolat. La solution aqueuse délipidée est alors lavée par 10 litres d'acétate d'éthyle pour en extraire les polyphénols. Cette solution organique après évaporation et lyophilisation fournit 43,67 g de poudre. Il, en reste donc 140 g de produit en solution dans l'eau après extraction par l'acétate d'éthyle (soit 47 % de la masse initiale). Les 43, 67 g de poudre sont à nouveau mises en solution dans 100 ml d'eau portée à 90°C pour en obtenir la dissolution. Après refroidissement, la solution aqueuse est lavée par 4 litres de chlorure de méthylène [178] pour en extraire la caféine et la théobromine. La solution aqueuse résiduelle est alors lyophilisée pour fournir un extrait brut de 1,37 g de polyphénols soit 0,45 % du poids initial du chocolat.

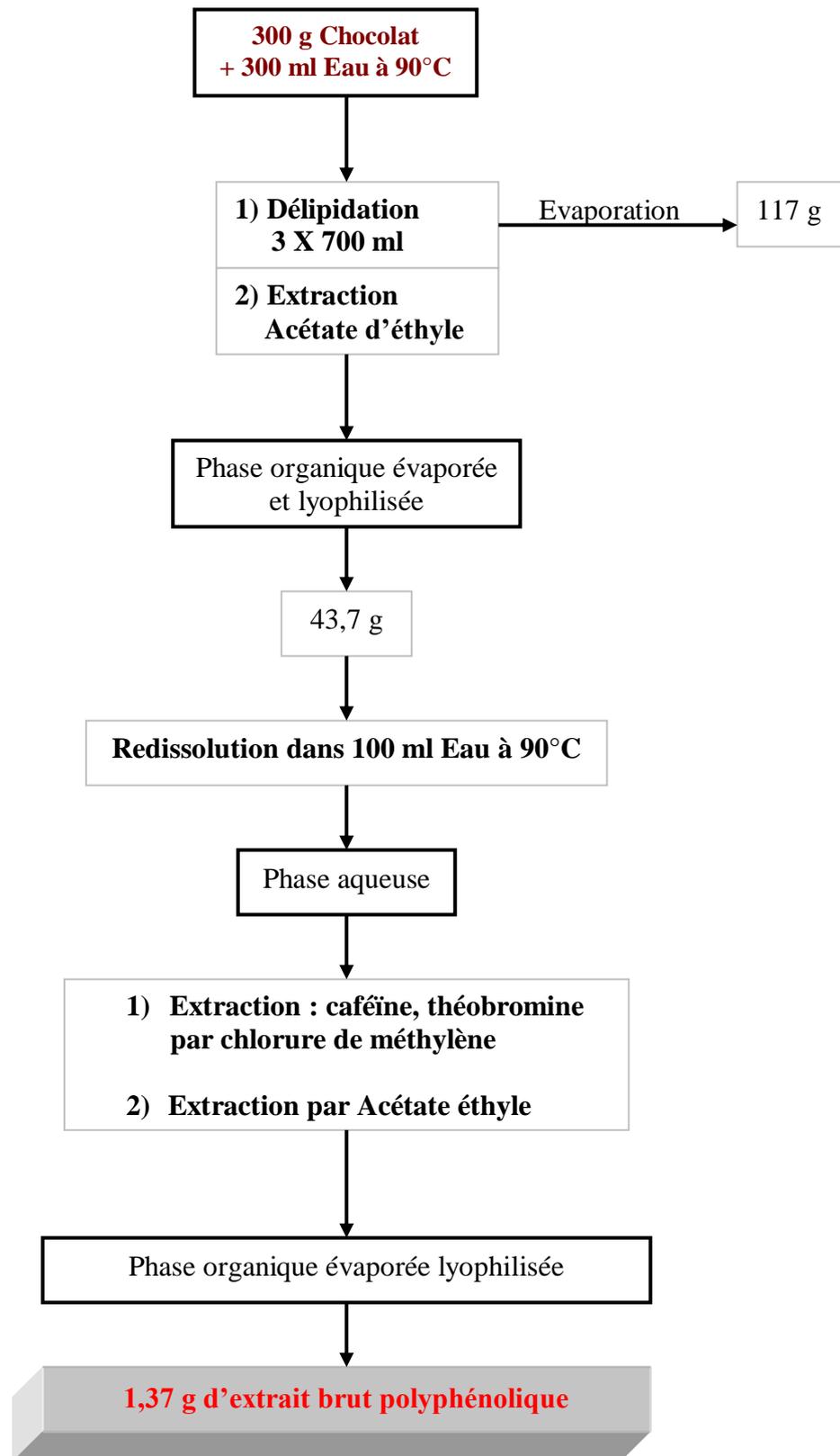


Schéma 4 : Préparation d'un extrait enrichi en polyphénols à partir d'un chocolat noir commercial

II.4.1 Identification des composés par CLHP

Pour identifier les différents composés polyphénoliques présents dans l'extrait brut issu du chocolat noir commercial, nous avons utilisé deux supports différents en CLHP. Le premier utilise une colonne C18 en phase inverse et le second utilise une colonne chirale à base de β -cyclodextrine dans le but de déceler la présence d'éventuels énantiomères.

Analyse CLHP phase inverse C18

L'extrait brut obtenu précédemment a été analysé en CLHP (Figure 38). La (-)-épicatéchine **C2**, la (+)-catéchine **C1** et les procyanidines B2 **C3** et B5 **C4** ont été identifiés dans ce diagramme par coinjection des produits de références.

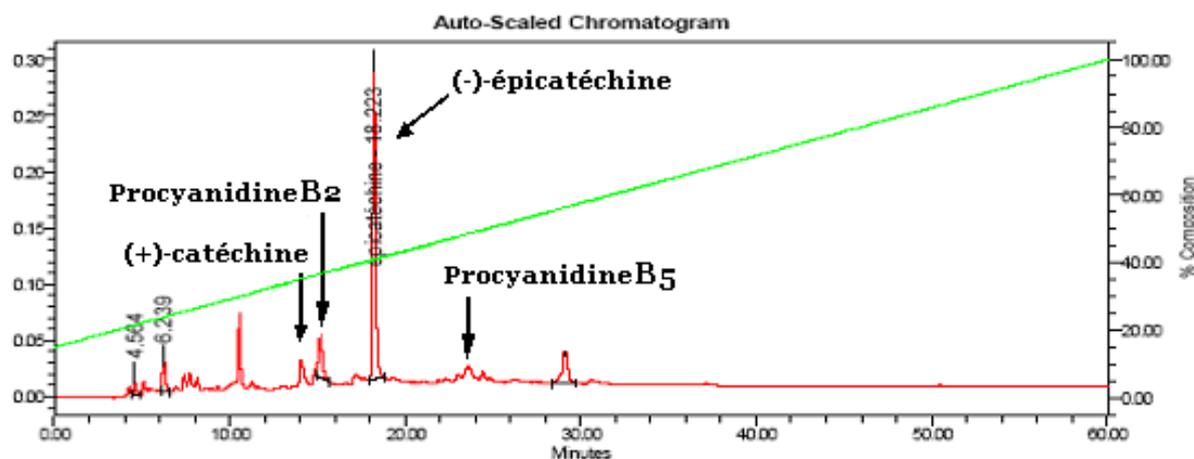


Figure 38 : Chromatogramme CLHP de l'extrait brut de chocolat enrichi en polyphénols.

Analyse CLHP sur phase chirale

L'analyse CLHP du même extrait brut sur phase chirale (β -cyclodextrine) nous permet de confirmer la présence de la (-)-épicatéchine **C2** mais aussi celle de la (-)-catéchine **C5**, bien qu'en plus faible quantité. L'identification des produits a été obtenue par co-injection avec les quatre molécules de références que sont: la (-)-épicatéchine **C2**, la (+)-épicatéchine **C6**, la (+)-catéchine **C1** et la (-)-catéchine (Figure 39).

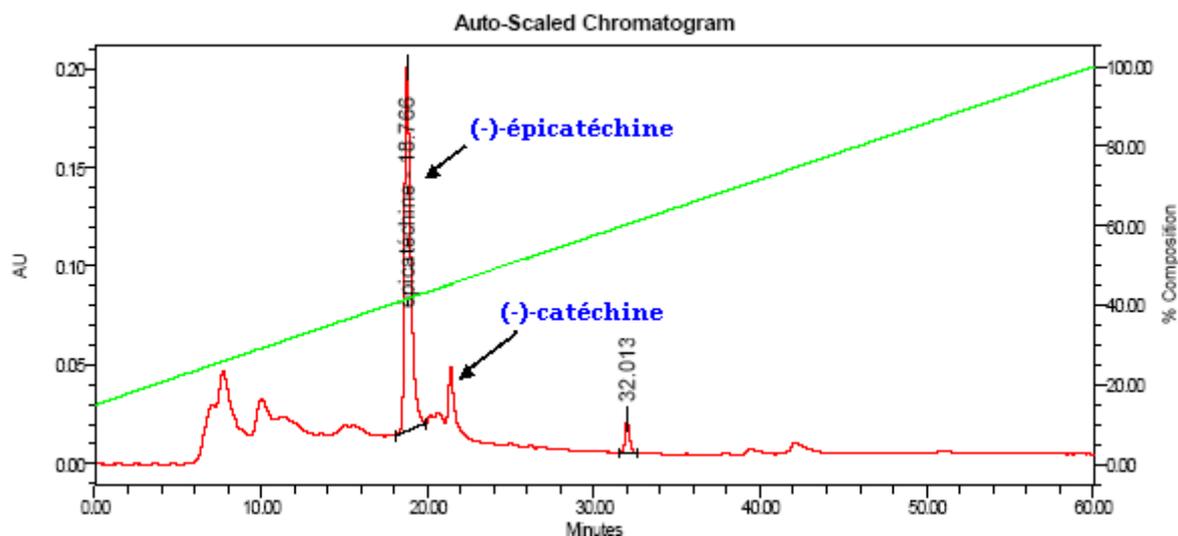


Figure 39: Chromatogramme CLHP sur phase chirale de l'extrait polyphénolique de chocolat

Cette investigation nous a permis de mettre en évidence la présence dans le chocolat noir commercial (86 % de cacao) des composés phénoliques naturels suivants: la **(-)-épicatéchine C2**, la **(+)-catéchine C1** et les **procyanidines B2 C3** et **B5 C4** tous ces composés ont été déjà isolés des fèves de cacao comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. La présence de **(-)-catéchine C5** issue de l'épimérisation de la (-)-épicatéchine naturelle lors des procédés de fabrication du chocolat (alcalinisation) est également observée. Il est à noter que pendant l'alcalinisation, le pH très alcalin autour de 11 favorise l'ouverture du cycle C en 2 puis une recyclisation qui peut avoir lieu soit sur la face *re*, soit sur la face *si* du même carbone C2 conduisant ainsi à la formation soit du produit natif de départ, soit de son épimère en C2 qui est ici **(-)-catéchine**.

Nous apportons ainsi une donnée nouvelle quant à la question du devenir des composés chiraux présents dans le cacao après les traitements de l'industrie du chocolat. La prochaine étape serait de connaître les potentialités biologiques de cet composé non natif afin de pouvoir conclure sur l'impact réel des procédés de l'industrie du chocolat sur les bienfaits «santé» de la consommation du chocolat. Cette étude a été confirmée au cours de notre rédaction de thèse par l'équipe de Gotti et all en Italie [179].

II.4.2 Vérification de la présence du composé **C7** dans l'extrait enrichi de polyphénols de chocolat

Dans le but de vérifier la présence du composé **C7** dans le chocolat noir commercial, nous avons utilisé l'extrait riche en polyphénols issu du chocolat.

Nous avons effectué une CLHP analytique de l'extrait enrichi de polyphénols de chocolat, puis une coinjection avec le dimère de référence : l'**Ebaphlobanidol C7**. Cette coinjection ne nous a pas permis de confirmer l'absence de ce produit dans le chocolat commercial.

Il est fort probable que cette absence du composé **C7** soit simplement due au fait de la très faible présence de composé **C3** la procyanidine (B2) dans le chocolat commercial, mais aussi dans la matière de base, le cacao. Cette hypothèse est d'autant plus vraie quand tient compte des proportions des produits formés dans la réaction de réarrangement du dimère B2. Le composé **C7** ne représente que 2,5% du mélange réactionnel brut. Ce pourcentage rapporté à la faible quantité de B2 dans le chocolat, il est normal que nous ne puissions apercevoir le dimère réarrangé issu de ce dernier.

En toute connaissance de cause nous disons qu'il doit être présent à l'état de trace.

II.4.3 Réarrangement en milieu alcalin de l'extrait de cacao enrichi

L'objectif de cet essai est d'apporter une meilleure connaissance à la composition phénolique de l'extrait des fèves fraîches de cacao, nous avons soumis l'Extrait Polyphénolique Total (EPT) aux mêmes conditions que le dimère B2 **C3**. 30 g de l'échantillon EPT ont été traités, après élimination des méthylxanthines puis extraction des polyphénols totaux par de l'acétate d'éthyle, nous avons obtenu un extrait enrichi avec un rendement de 14,6 %.

200 mg de cet extrait de cacao enrichi en polyphénols ont été soumis aux mêmes conditions expérimentales que le dimère B2 (voir partie expérimentale page 98).

Après une coinjection comme précédemment, nous avons décelé la présence du dimère **C7** : l'**Ebaphlobanidol** issu du réarrangement de B2 en milieu alcalin.

II.4.4 Conclusion

Toutes ces réactions d'épimérisation et de réarrangement réalisées nous ont permis d'accéder aux composés non naturels que sont la (+)-épicatechine **C6** issu de l'épimérisation

de la (+)-catéchine **C1**, la (-)-catéchine **C5** obtenu soit par l'épimérisation du monomère natif la (-)-épicatéchine **C2**, soit après réarrangement en milieu alcalin du dimère B2, et le dimère **C7** (l'**Ebaphlobanidol**).

Ces composés ont fait l'objet d'étude de leurs propriétés biologiques, dans le but d'en savoir plus sur les conséquences de l'alcalinisation (opération intervenant au cours de la fabrication du chocolat) du point de vue bénéfice santé du consommateur.

Nous avons par ailleurs mis en évidence la présence de la (-)-épicatéchine **C2**, la (+)-catéchine **C1** et des dimères B2 **C3** et B5 **C4** naturels dans le chocolat noir commercial.

Un seul composé non naturel a été mis en évidence dans le chocolat noir commercial, il s'agit de la (-)-catéchine **C5**. Nous n'avons pas pu confirmer l'absence du dimère **C7** réarrangé dans le chocolat.

Nous pouvons ainsi dire que les différents traitements de l'industrie du chocolat en occurrence l'alcalinisation, en plus de leur rôle majeur dans la mise en place d'un brief marketing dans le souci pour le professionnel de l'agroalimentaire de rendre ses produits les plus délicieux et savoureux possible ; s'ajoute une recombinaison chimique majeure en ce qui concerne le devenir des composés chiraux face à de tels traitements.

La prochaine question qui se pose est le bénéfice santé pour le consommateur, nous allons essayer de répondre avec les moyens d'études biologiques qui sont à notre disposition.

II.5 Activité biologique sur des cellules isolées

Les propriétés antioxydante et antiproliférative des molécules isolées du cacao (**C1**, **C2**) et des molécules obtenues par réarrangement chimique (**C5**, **C6** et **C7**) ont été évaluées à l'aide du test DPPH mais aussi à partir de tests de viabilité sur quatre lignées de cellulaires : HT-29 (carcinome humain coloré), 361 (carcinome mammaire humain), Mewo (mélanocyte humain) et NCTC (kératinocytes de peau).

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants conduisant à des dégâts structuraux et fonctionnels dans l'organisme. De nombreux systèmes de défense tant, endogènes que exogènes participent à la réduction de ce stress oxydant dans l'organisme. Les polyphénols fournis par l'alimentation participent également à la réduction de ce stress. Ils doivent leurs activités à un grand nombre d'hydroxyles qui leur permettent de lutter contre les radicaux libres présents dans l'organisme.

Mesure de l'activité antioxydante de **C2**, **C5** et **C6** par le test DPPH

Différents tests permettent de mesurer l'activité antioxydante d'un échantillon en fonction des conditions de mesures. L'un de ceux-ci, le test DPPH utilisé ici, implique l'utilisation du radical stable 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazile (DPPH). La neutralisation de ce radical par un antioxydant s'accompagne de la perte de la couleur violette intense de ce radical qui peut être suivie par son absorbance à 515 nm.

Chacun des composés soumis au test DPPH dissout dans 0,1 ml d'un mélange eau-ethanol (50/50 ; v/v) à des concentrations variant de 1 μM à 120 μM . Le volume de ces solutions est porté à 3 ml par ajout d'une solution éthanolique de DPPH à la concentration de 0,5 mM. Après une incubation de 90 mn, la mesure de l'absorbance résiduelle est effectuée à 515 nm et traduite en pourcentage d'inhibition. Les courbes obtenues pour les composés **C2**, **C5** et **C6** sont présentées dans la figure Figure 40.

L'activité antiradicalaire de ces composés s'exprime en IC_{50} (μM) c'est-à-dire la concentration nécessaire pour obtenir une diminution de 50 % de l'absorbance initiale du

DPPH en présence de ces composés. Les valeurs obtenues pour **C2**, **C5** et **C6** à partir des trois premiers points de chaque courbe sont relativement semblables.

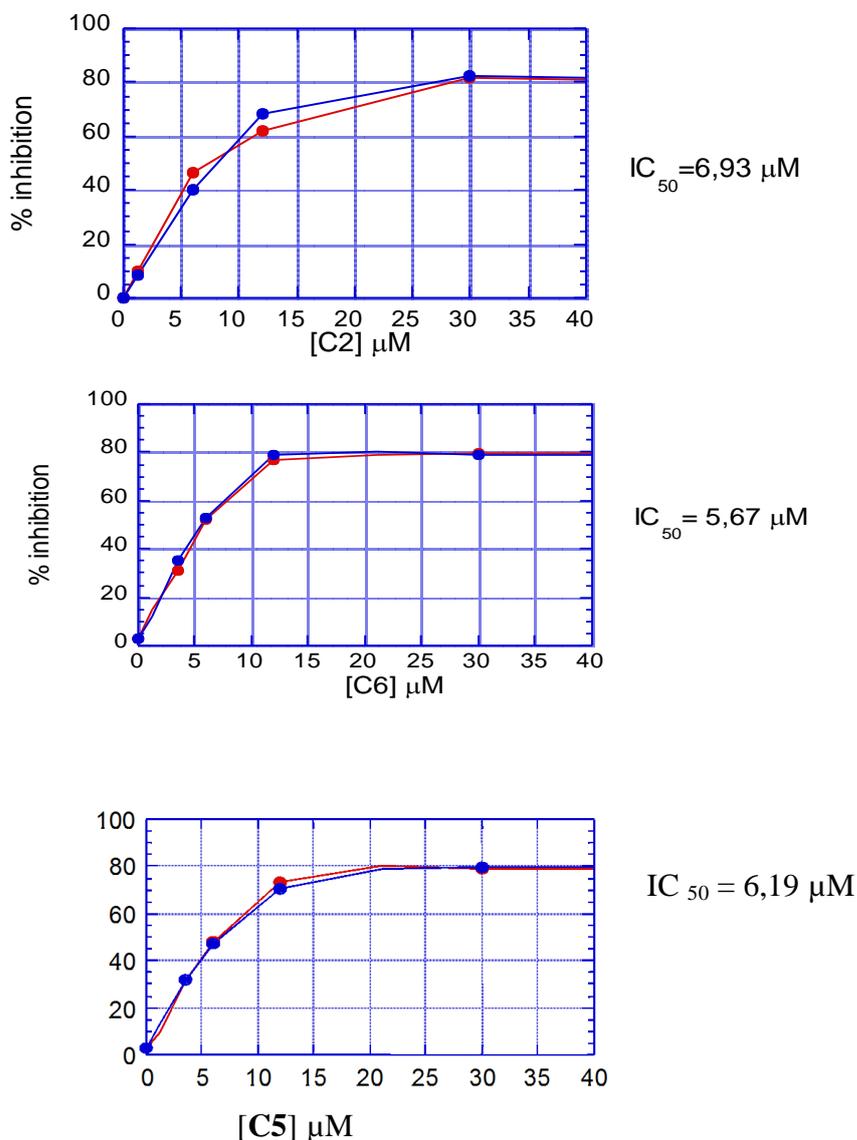


Figure 40 : test DPPH effectué sur le polyphénol **C2**, **C5** et **C6**. Chaque expérience est reproduite deux fois.

Mesure de l'activité antioxydante de **C2**, **C5** et **C6** sur quatre lignées cellulaires

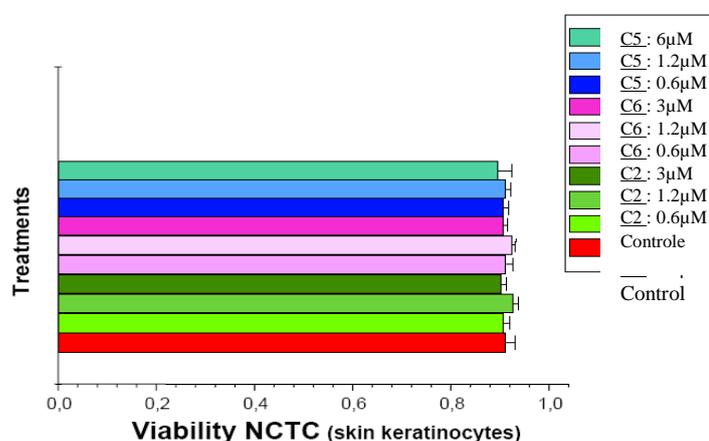
Leur potentiel antioxydant a été également suivi par des tests de viabilité effectués sur quatre lignées cellulaires. Les cellules HT-29 (carcinome humain coloré), cellules 361 (carcinome mammaire humain), cellules Mewo (mélanocyte humain) et cellules NCTC (kératinocytes de peau) sontensemencées et cultivées sur des plaques de 96 puits avec environ 7000 cellules par puits pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite incubées pendant une nuit en présence de trois concentrations des produits **C2**, **C5** et **C6** (0,6 μM, 1,2 μM et 3 μM). Une partie des cellules est traitée pendant 2 heures par 100mM H₂O₂. Les cellules non

Deuxième partie : Travaux personnels

traitées sont utilisées comme contrôle et pour tester une éventuelle toxicité de ces produits. Différents échantillons tests sont également préparés : avec H₂O₂ seule, avec vitamine E seule et avec H₂O₂ + vitamine E. Le test avec la vitamine E est utilisé comme contrôle positif de l'activité antioxydante. Les résultats sont évalués par le test SRB qui relie la viabilité cellulaire à la quantité de protéines cellulaires mesurée par l'interaction des protéines avec le colorant sulforhodamine B (SRB). Les valeurs de P < 0,05 et P < 0,01 présentes dans les différentes figures qui suivent, traduisent la pertinence statistique des mesures.

Les résultats présentés dans la Figure 41 (A et B) pour les cellules NCTC montrent une faible activité antioxydante des trois polyphénols **C2**, **C5** et **C6** comparativement à la vitamine E en présence de ce type de cellules.

A



B

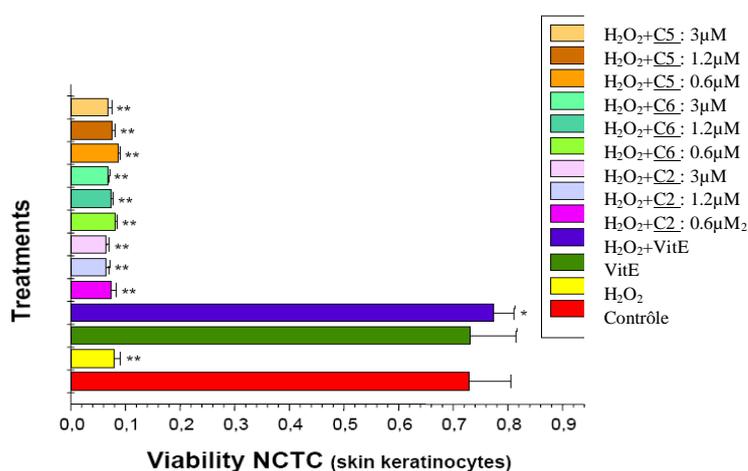
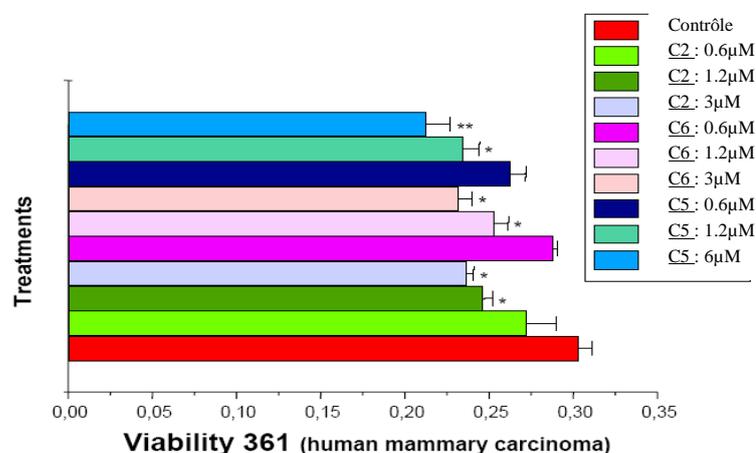


Figure 41: Test de viabilité mené sur les cellules NCTC (kératinocytes de peau) avec **C2**, **C5** et **C6** en présence et en absence d'eau oxygénée

Le test de viabilité réalisé sur les cellules 361 à trois concentrations différentes de **C2**, **C5** et **C6** en présence et en absence d'eau oxygénée (Figure 42 A et B) montre une activité

antioxydante légèrement supérieure pour ce type de cellules. On note un léger effet de concentration dans la Figure 42 A.

A



B

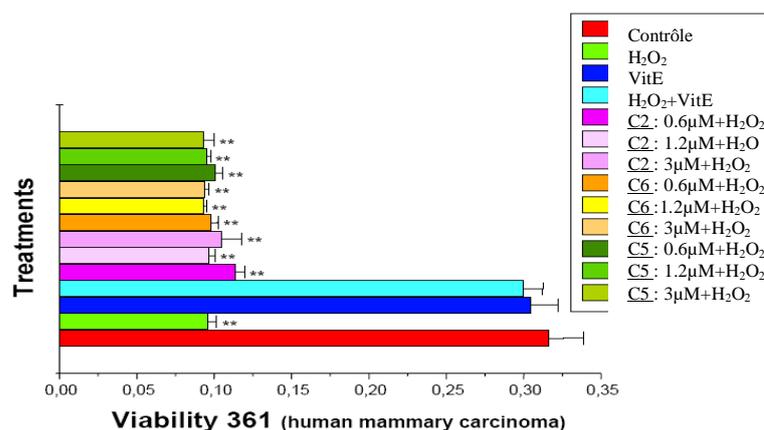
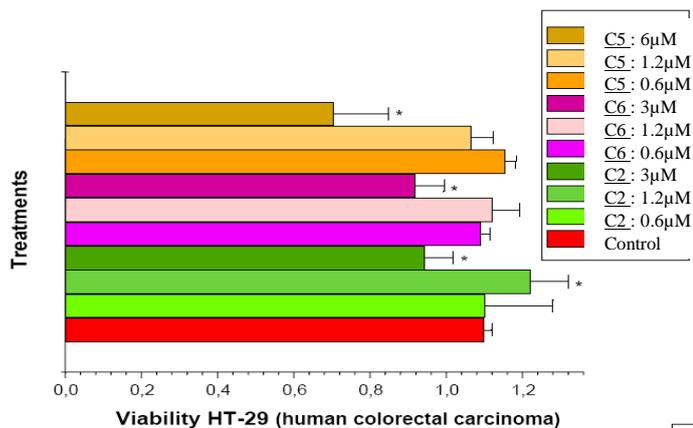


Figure 42 Test de viabilité sur les cellules 361 (cancer mammaire humain)

Le test de viabilité réalisé sur les cellules HT-29 à trois concentrations différentes de C2, C5 et C6 en présence et en absence d'eau oxygénée montre une activité antioxydante encore un peu plus importante quoique limitée dans la Figure 43 (B) et un effet de concentration plus affirmé dans la Figure 43 (A).

A



B

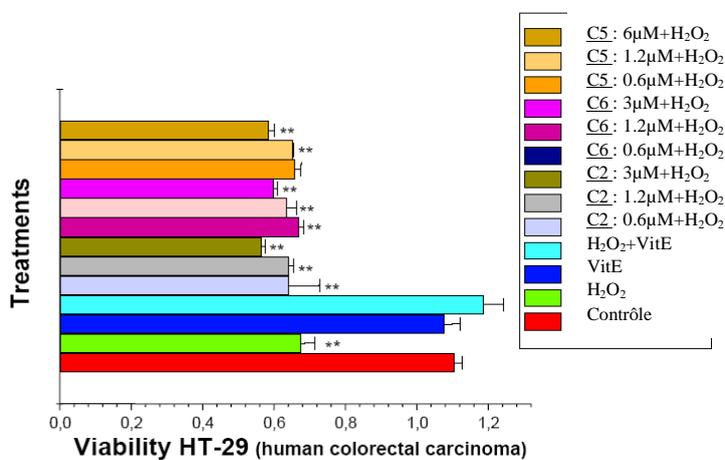
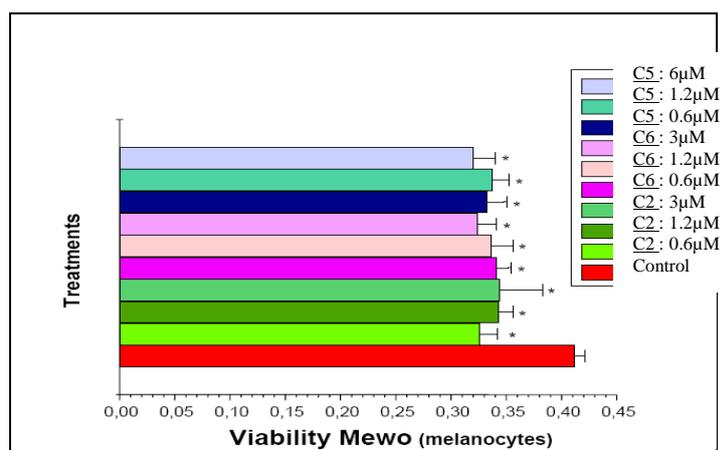


Figure 43: Test de viabilité sur les cellules HT-29 (cancer humain coloré)

Le test de viabilité conduit sur les cellules Mewo avec les trois composés **C2**, **C5** et **C6** en présence et en absence d'eau oxygénée est présenté dans la Figure 44 (A, B). L'activité antioxydante est encore plus affirmée avec ce type de cellules et il n'y a pratiquement pas d'effet de concentration.

A



B

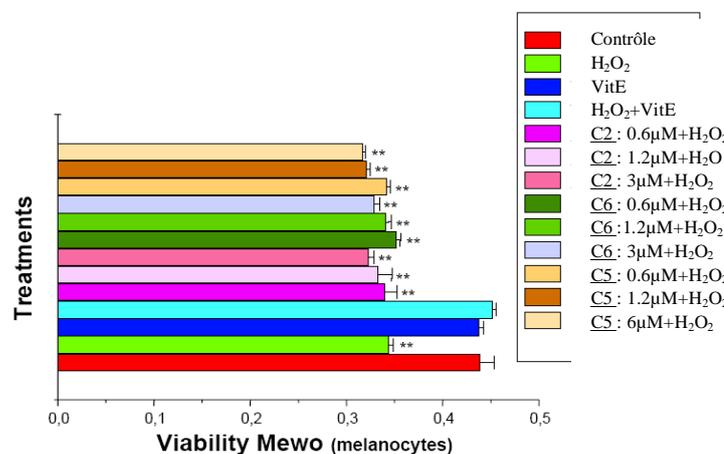


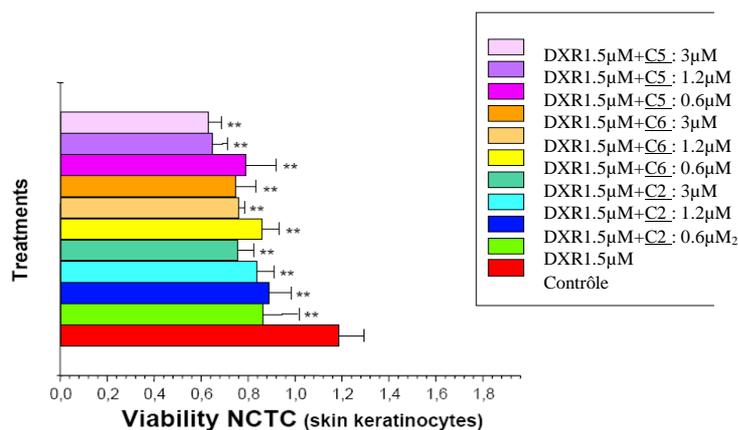
Figure 44: Test de viabilité sur les cellules Mewo (mélanocytes humains)

Mesure de l'activité antiproliférative de C2, C5 et C6

L'utilisation de la Doxorubicine 1,5 μM sur les deux lignées cellulaires 361 et NCTC a permis d'effectuer une mesure de l'activité antiproliférative des trois composés C2, C5 et C6. Les cellules sont incubées à trois concentrations différentes de polyphénols (0,6 μM, 1,2 μM et 3 μM) avec ajout ou non de Doxorubicine 1,5 μM. Chaque expérience réalisée sur quatre puits a été répétée trois fois.

Les trois substances ne présentent pas une activité antitumorale considérable même si leur effet est plus évident sur les cellules NCTC (Figure 45).

A



B

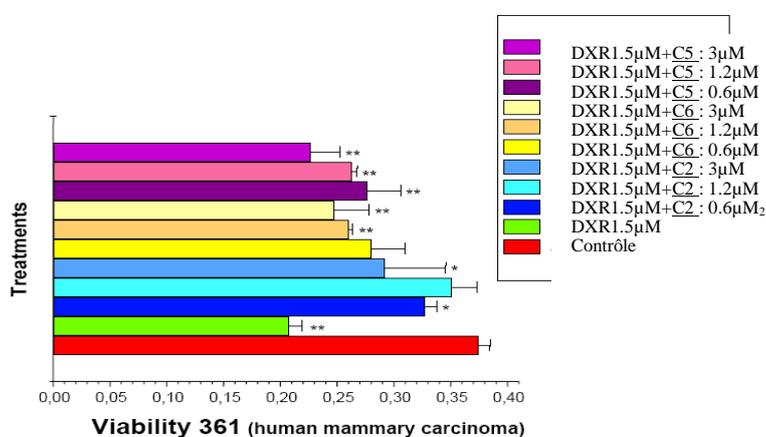


Figure 45 : Test d'antiprolifération sur les cellules NCTC et 361

Toutes ces mesures ont été effectuées dans le Laboratoire du professeur Cristiano RUMIO Department of Morphology via Mangiagalli 31 20133 Milan-Italy.

Mesure de l'activité antiproliférative de C7

Une évaluation des propriétés biologiques du polyphénol réarrangé C7 a été effectuée dans le Laboratoire du Pr. Jean François ROSSI de l'Unité INSERM U475 de Montpellier[180]. Les quatre lignées cellulaires cancéreuses hématopoïétiques utilisées pour ce test sont différentes des quatre lignées de cellules utilisées pour l'évaluation des propriétés antioxydante et antiproliférative de C2, C5 et C6.

Les quatre lignées cellulaires U266 (myélome, autocrine IL-6), K562 (érythroleucémie), Raji (Lymphome B, syndrome de Burkitt) et THP1 (monocyte) sont incubées en présence de six concentrations du produit C7, de 1µg/ml à 100µg/ml. La concentration de cellules dans chaque puits est de 10000 et la durée d'incubation de 4 jours à

37°C en présence de 5 % de CO₂. Après marquage des cellules à l'iodure de propidium, le comptage des cellules est effectué à l'aide d'un microscope. Les courbes obtenues pour chaque lignée cellulaire avec les six concentrations de **C7** permettent de déterminer le paramètre IC₅₀ correspondant à la concentration du produit nécessaire pour que la moitié des cellules soit préservée.

Les résultats des tests biologiques de l'Ebaphlobanidol **C7** effectués sur ces quatre lignées sont résumés dans le tableau suivant où les IC₅₀ sont exprimées en µM.

	Ebaphlobanidol (C7)	Resvératrol
U 266	12	28
K 562	59	25
THP 1	110	8,8
Raji	31	22

Tableau 5 : Résultats en IC₅₀ (µM) du dimère **C7** (Ebaphlobanidol) et du resvératrol comme molécule de Référence sur les lignées cancéreuses U266, K562, THP1 et Raji.

Les résultats obtenus montrent que le dimère **C7** présente une très bonne activité antiproliférative sur la lignée U266 comparable à celle du resvératrol, mais aussi une activité acceptable sur les trois autres lignées.

A la suite des études biologiques décrites ci-dessus, il est à noter que les trois composés à savoir la (-)-épicatéchine (**C2**) naturelle, la (+)-épicatéchine (**C6**) et la (-)-catéchine (**C5**) non naturelles, ne montrent pas une activité antioxydante considérable comparées à la vitamine E, ni une activité antiproliférative significative en comparaison de la Doxorubicine. Cependant aucune toxicité n'a été décelée en présence de ces composés.

Le composé **C7** présente lui une activité antiproliférative intéressante comparée à celles des composés **C2**, **C5**, **C6** utilisés dans cette étude et à celle du resveratrol utilisé comme témoin.

C7 étant un produit de transformation apparaissant dans l'élaboration du chocolat, on peut s'attendre à ce que les activités antiprolifératives rapportées dans la littérature pour le chocolat, soient reliées à la présence de composés tels que **C7** ou analogues.

II.5.3 Activité biologique sur les récepteurs membranaires de l'androgène

L'objectif de cette étude est de comprendre et de proposer un nouveau mécanisme d'action des polyphénols isolés, à savoir la (+)-catéchine **C1**, la (-)-épicatéchine **C2**, les dimères B2 (**C3**) et B5 (**C4**) concernant le processus de dégénérescence des cellules cancéreuses T47D de la prostate[181].

Les monomères et les dimères de flavanols entrent en compétition pour la fixation sur les sites des récepteurs membranaires aux androgènes des cellules T47D.

Les investigations indiquent à la Figure 46 que la dihydrotestostérone (DHT) entre en compétition, pour la fixation de testostérone radioactive avec une apparente affinité de IC_{50} de 4,7 nM, compatible avec l'affinité de la DHT pour les récepteurs membranaires aux androgènes dans les différents systèmes de cellule humaine.

Il ressort que la (+)-catéchine **C1** et la (-)-épicatéchine **C2** entrent en compétition partielle sur ces sites. Elles induisent un déplacement de l'ordre de 30 % de la spécificité de la fixation de la testostérone avec des IC_{50} apparentes de 21,4 et 19,2 nM respectivement. Le dimère B2 (**C3**) induit un déplacement total de la fixation de la [3H] testostérone avec une IC_{50} apparente de 82,2 nM. Quant à la B5 (**C4**) le déplacement est de 60 % avec une IC_{50} de 1,7 nM (voir le Tableau 6). Ces résultats indiquent que les monomères et plus particulièrement les dimères de flavanols entrent en compétition partielle ou totale sur les sites de fixation des récepteurs membranaires aux androgènes, avec ce dernier.

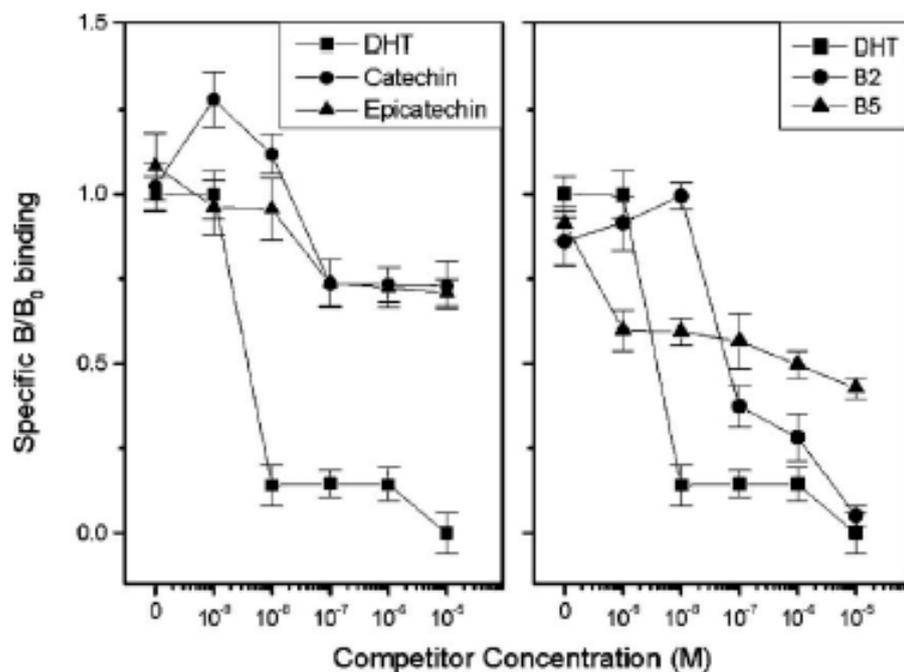


Figure 46: Compétition pour la fixation sur les récepteurs membranaires aux androgènes par le composé **C1**, **C2**, les dimères **C3** et **C4**. Les membranes des cellules T47D isolées, brièvement acidifiées, dans le but de dissocier tout récepteur ou stéroïde intracellulaire, sont incubées avec des concentrations fixes de [³H] testostérone (5nM), et en variant la concentration des monomères (gauche) ou des dimères (droite) de flavanols indiquées, à gamme de concentration de 10⁻² à 10⁻⁶M.

Agent	IC50 nM ± SEM (nM)	% Déplacement ± SEM
DHT	4,7 ± 2,3	100 ± 9
(+)-Catéchine	21,4 ± 1,3	72 ± 12
(-)-Epicatechine	19,2 ± 1,8	70 ± 14
B2	82,2 ± 8,6	100 ± 10
B5	1,7 ± 1,9	58 ± 8

Tableau 6: Capacité des monomères **C1**, **C2** et des dimères **C3** et **C4** de flavanols à déplacer la [³H] testostérone dans les membranes de T47D acidifiées.

Modification de la redistribution du cytosquelette d'actine dans les cellules T47D par les monomères et les dimères de flavanols.

La Figure 47 montre la modification de l'organisation du cytosquelette d'actine dans les cellules T47D, 1 h après l'application de 10⁻⁷ M de ces polyphénols. Comme indiqué, l'application de la testostérone change l'apparition de filopode et de lamellipode. L'application de la (+)-catéchine **C1** et de la (-)-épicatechine **C2** entraîne une induction modérée du filopode des cellules T47D. En contraste, l'application de la procyanidine B2 (**C3**) et spécialement la B5 (**C4**) entraînent une redistribution périphérique et une

augmentation de l'intensité de la structure du cytosquelette d'actine avec une induction massive de la formation de filopode.

Ces résultats indiquent qu'en plus de la compétition de fixation, les monomères et les dimères naturels de flavonoïdes induisent des effets similaires sur l'organisation du cytosquelette d'actine comme décrit pour la testostérone.

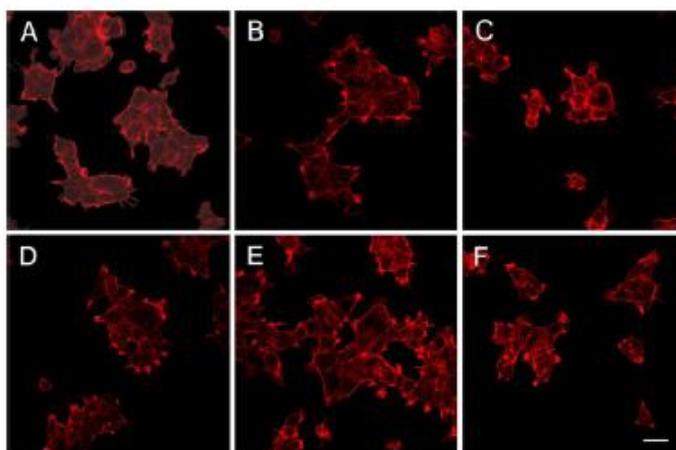


Figure 47: Modifications du cytosquelette d'actine par les monomères et dimères de flavanols. Les cellules T47D sont incubées dans le milieu sans sérum pendant 3 h, et puis pour 1 h additionnelle dans un milieu standard en l'absence (contrôle, A) ou en présence de 10^{-7} M de testostérone-BSA, de **C1**, **C2**, de **C3** ou **C4** (B-F respectivement). Ensuite le milieu est éliminé, les cellules sont fixées, et le cytosquelette d'actine est visualisé par la rhodamine-phalloïdine comme décrit dans la partie expérimentale. Échelle bar = $10\mu\text{M}$.

Modification du signal des molécules impliquées dans la redistribution du cytosquelette d'actine par les monomères et les dimères de flavanols.

L'observation de la redistribution du cytosquelette d'actine après traitement par les flavanols ou les OPC suggère une possible implication du signal moléculaire qui est contrôlé par la réorganisation du cytosquelette d'actine. La Figure 48B présente une rapide activation de la FAK et du PI-3K induite après une incubation des cellules T47D par la testostérone-BSA. L'ensemble de ces kinases est rapidement phosphorylé par le traitement à la testostérone-BSA et un retour au niveau de contrôle après 30 min d'incubation. Ces résultats sont en accord avec ceux de la phosphorylation transitoire des signaux moléculaires sur l'activation des sites de fixation membranaire de la testostérone dans les cellules du cancer de la prostate.

Une incubation des cellules T47D avec les flavanols ou les tanins condensés, contribue à une meilleure phosphorylation de la FAK et de la PI-3K. Comme l'indique la Figure 48B, la phosphorylation de la PI-3K est observée dans les limites des 2 min d'incubation avec la (+)-catéchine **C1** et la (-)-épicatéchine **C2**, pendant que la phosphorylation de la FAK évolue pour les 30 min restantes.

Ces résultats montrent que l'interaction des monomères et/ou des dimères de flavanols avec les sites de fixation membranaires de la testostérone induit une activation des mêmes kinases comme celle décrite pour le traitement à la testostérone-BSA. Comme le montre la Figure 49, dans les cellules prétraitées avec du wortmannin, les polyphénols réduisent l'induction du réarrangement de l'actine, comme indiqué par la baisse de filopode et de lamellipode. Les résultats obtenus suggèrent que la description de l'ensemble des cascades de signalisation doit pouvoir réguler la réorganisation du cytosquelette d'actine observée dans les cellules T47D.

Induction de l'apoptose des cellules T47D par les monomères et les dimères de flavanols.

Les résultats de la Figure 50 montrent que les deux dimères **C3** et **C4** expriment une triple induction de l'apoptose des cellules T47D incubées dans le sérum comparativement aux cellules de contrôles de manière temps-dépendant. Ces résultats montrent que la (+)-catéchine **C1**, la (-)-épicatéchine **C2** et les dimères **C3** et **C4** induisent une apoptose similaire à celle de la testostérone lors de leur interaction avec les sites membranaires aux androgènes présents dans les cellules T47D.

Les monomères et dimères de flavanols se comportent comme des agonistes des récepteurs membranaires aux androgènes.

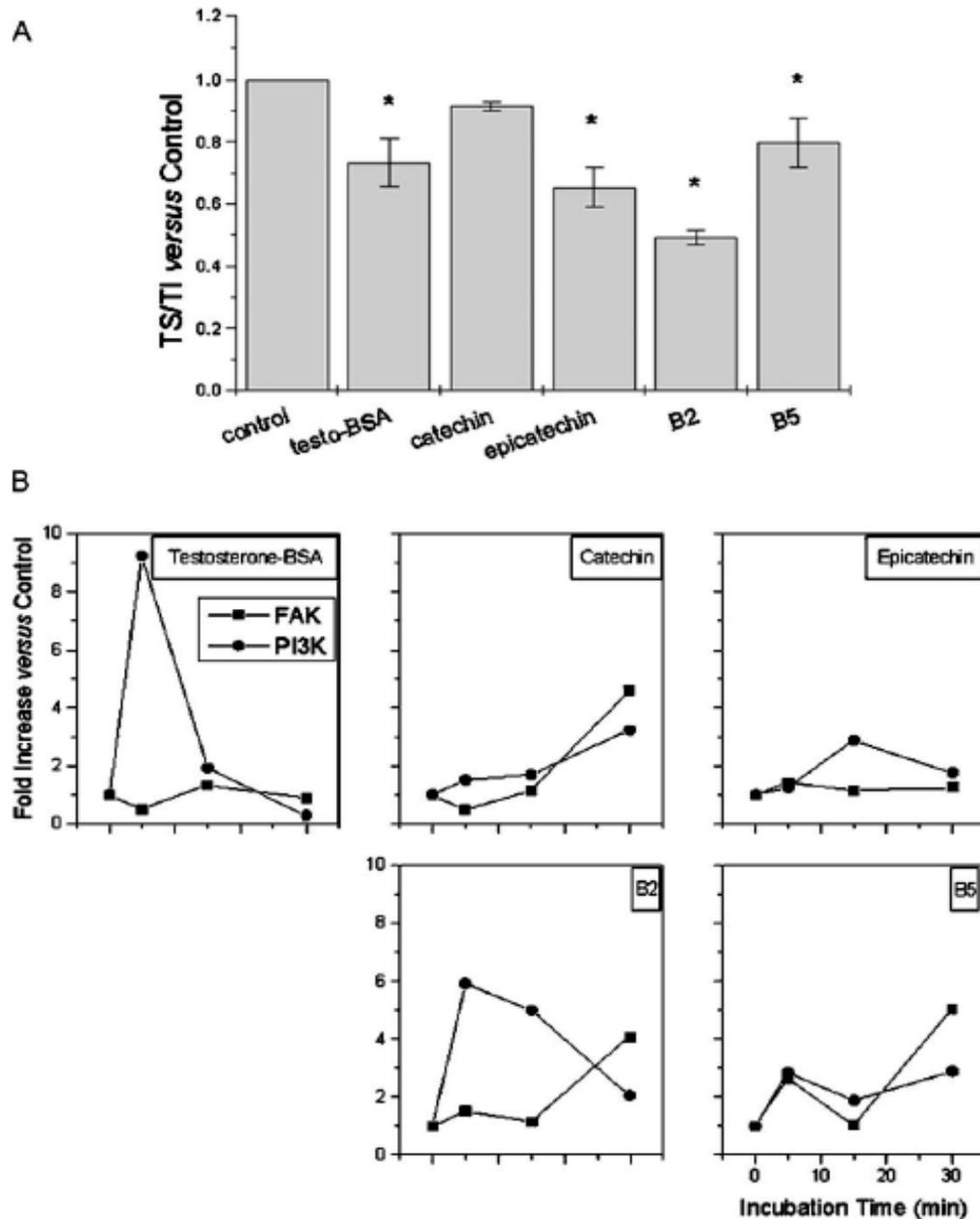


Figure 48: La (+)-catéchine **C1**, la (-)-épicatéchine **C2**, le dimère B2 (**C3**) et le dimère B5 (**C4**) induisent une polymérisation similaire à celle de l'actine et un signalment de la phosphorylation comme la testostérone-BSA dans les cellules T47D. (A) temps de course du rapport des monomères (Triton-insoluble, T1) actine, dans les cellules T47D, induite par la testostérone-BSA ou les polyphénols (10^{-7} M). Les cellules sont incubées avec 10^{-7} M de cet agent pendant la période indiquée. TS et T1 sont essayés comme décrit dans la partie expérimentale * $P < 0,05$ au plus petit ($n = 4$). (B) au cours du temps des conditions de phosphorylation de FAK (squares) ou PI3K (cercles) après incubation des cellules T47D avec 10^{-7} M de **C1**, **C2**, de **C3** et de **C4** ou de testostérone-BSA. Les cellules T47D, cultivées dans un milieu sans sérum pendant 3 h, sont incubées pour la période indiquée (5, 15, 30 min) avec 10^{-7} M de testostérone-BSA ou de polyphénols. Ensuite le milieu est aspiré, les cellules sont lysées, le PI3K phosphorylé et le FAK sont dosés par électrophorèse et immunoséchage comme décrit dans la partie expérimentale. Les résultats présentés sont comparés au contrôle correspondant.

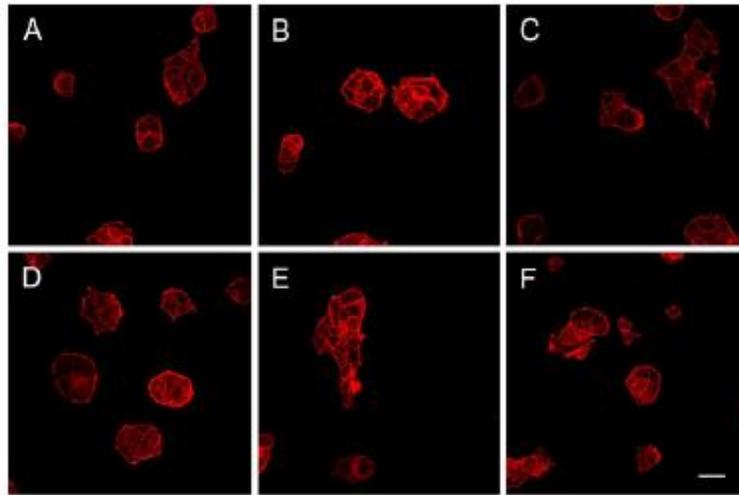


Figure 49: La P13K impliqué dans la modification du cytosquelette des cellules T47D, induite par les polyphénols. Les cellules T47D sont incubées pendant 3 h en l'absence de sérum, ensuite la wortmannin (100 nM) est introduite dans le milieu de culture, suivie 1 h plus tard par le milieu standard (A) ou 10^{-7} M de testostérone-BSA, (+)-catéchine **C1**, de (-)-épicatéchine **C2**, de dimère B2 (**C3**) ou de dimère B5 (**C4**) (B-F, respectivement). Après 1 h d'incubation, le milieu est aspiré et les cellules d'actine sont colorées avec du rhodamine-phalloïdine, et visualisées au microscope à laser confocal. Échelle bar = 10 μ m.

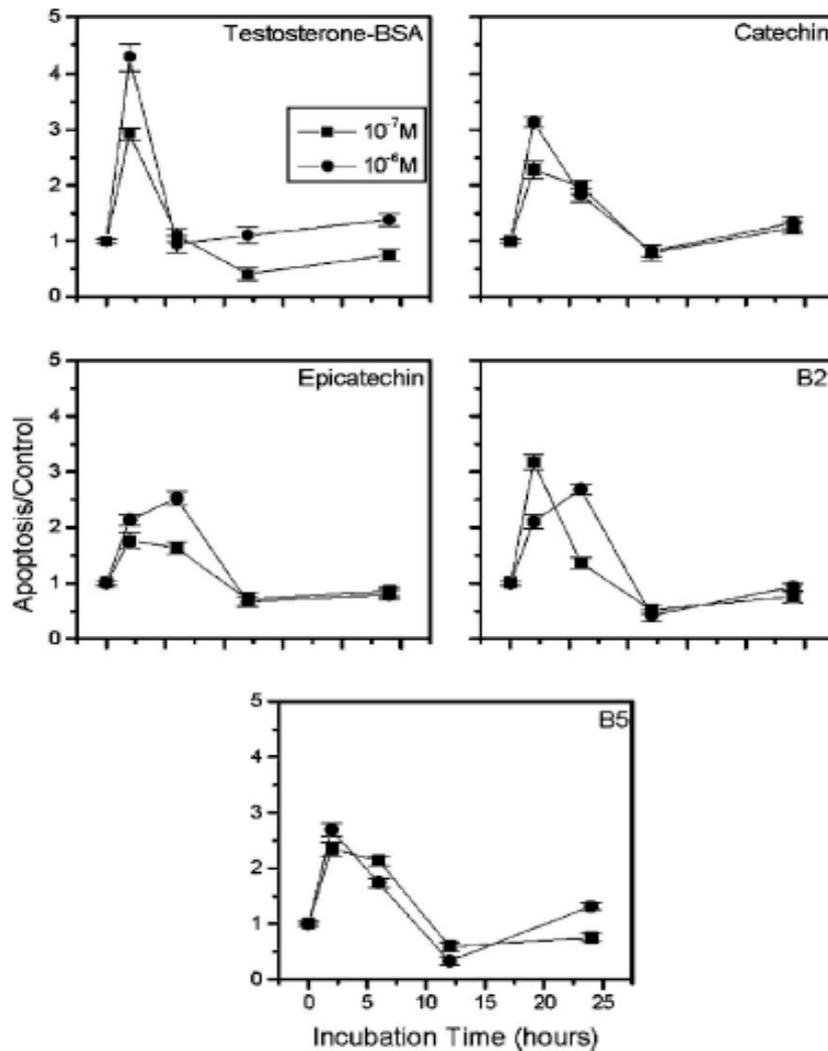


Figure 50: temps de l'apoptose des cellules T47D induit par la testostérone-BSA ou les polyphénols. Les cellules sont incubées avec 10^{-7} M ou 10^{-6} M de cet agent pour les périodes indiquées. L'apoptose est suivie par un Pourcentage kit (APO), comme décrit dans la partie expérimentale. Résultats (moyenne \pm SEM) de trois différentes expérimentations exécutées trois fois.

Ce travail montre un nouveau mode d'action des flavanols naturels (isolés du cacao) sur les cellules cancéreuses T47D nous permet de conclure que la (+)-catéchine **C1**, la (-)-épicatéchine **C2**, les dimères B2 (**C3**) et B5 (**C4**) sont des agonistes des récepteurs membranaires aux androgènes. Ils pourraient être utilisés comme des additifs de la testostérone pour le traitement des tumeurs, dans lesquelles l'application du complexe testostérone-BSA induit une régression. Des résultats complémentaires seront nécessaires pour comprendre le mécanisme de leur action antiproliférative.

II.6 Conclusion et perspective

Au cours de cette étude nous avons pu isolé quelques composés polyphénoliques présents dans l'extrait polyphénolique totale des fèves fraîches de cacao à savoir la (+)-catéchine **C1**, la (-)-épicatéchine **C2** et les procyanidines B2 et B5 dont l'unité de base est la (-)-épicatéchine **C2**, les deux produits se différenciant par leur liaison interflavanique (LIF) de type 4-8 pour B2 et de type 4-6 pour B5.

Nous avons regardé comment ces produits isolés étaient susceptibles d'évoluer en milieu fortement alcalin pour essayer de comprendre comment ces mêmes produits pouvaient évoluer et de nouveaux produits apparaître lors du processus de fabrication du chocolat. Nous avons observé avec nos conditions d'expérimentation, l'épimérisation de la (+)-catéchine **C1** en (+)-épicatéchine **C6** et de la (-)-épicatéchine **C2** en (-)-catéchine **C5**. Les trois produits d'épimérisation **C1**, **C2**, **C5** et les procyanidines B2 et B5 se retrouvent effectivement (à l'exception de la (+)-épicatéchine **C6**) parmi les polyphénols présents dans l'extrait polyphénolique du chocolat noir commercial. Le procyanidine B2, un dimère constitué de deux unités de (-)-épicatéchine évolue pour donner en plus de la (-)-épicatéchine, la (-)-catéchine et un composé dimère [**Ebaphlobanidol**] **C7** de type phlobatannin. Le procyanidine B2 étant faiblement présent dans le produit de départ, il a été difficile de mettre en évidence la présence de **C7** dans le chocolat commercial.

Les polyphénols sont réputés pour leur action antioxydante et antiproliférative sur les cellules. Pour évaluer ces propriétés biologiques des produits isolés, ceux-ci ont été soumis à des études d'interaction avec différents types de lignées cancéreuses. Seul le dimère **C7** réarrangé présente une activité antiproliférative intéressante sur les cellules U266 et Raji par comparaison avec la molécule de référence le resveratrol. Nos résultats montrent que les composés **C2**, **C5** et **C6** ne présentent pas d'activité antioxydante et antiproliférative intéressantes mais il est à remarquer qu'ils ne présentent pas non plus de toxicité sur ces lignées de cellules. Il est à remarquer également que les faibles activités observées pour ces trois produits varient selon le type de lignée cellulaire étudié.

Les études menées sur différentes lignées cellulaires s'accompagnent aujourd'hui d'études plus spécifiques par interaction des composés avec les récepteurs membranaires aux

androgènes des cellules T45D. Les quatre polyphénols étudiés montrent qu'ils sont des agonistes potentiels des récepteurs membranaires aux androgènes et pourraient être utilisés comme des protéines conjuguées de la testostérone pour le suivi des tumeurs dans lesquelles l'application de la testostérone-BSA induit une régression.

Ces polyphénols présentant des activités variées sur des cellules cancéreuses ou des récepteurs membranaires, sont également présents dans des produits voués à l'alimentation comme le chocolat, le vin, le thé et de nombreux autres produits. A défaut d'une activité biologique significative pour certains comme la (-)-épicatéchine **C2**, la (-)-catéchine **C5** et la (+)-épicatéchine **C6**, il est à remarquer que ces produits heureusement ne présentent pas de toxicité.

Outre les propriétés biologiques décrites précédemment, les polyphénols interviennent également sur le goût et sur la coloration des aliments et à ce titre ils intéressent beaucoup les industriels du secteur alimentaire pour la mise en valeur de leurs produits. Il reste donc nécessaire de continuer à évaluer les effets des préparations sur le devenir des polyphénols initialement présents dans les produits de départ. Le bienfait santé des polyphénols est devenu un argument commercial comme pour beaucoup d'autres produits (aliments). Il reste à évaluer sérieusement la réalité de ce bienfait santé qui n'est plus contestée et à comprendre les mécanismes d'action des polyphénols sur les différents récepteurs dans la cellule.

III. Partie expérimentale

III.1 Matériels et méthodes

Les spectres ultraviolets (UV) sont enregistrés en solution dans le méthanol (cuve quartz de 1 cm) à température ambiante sur un spectrophotomètre JASCO V- 530. UV/VIS.

Les pouvoirs rotatoires ($[\alpha]_D$) des différents échantillons sont mesurés sur un Polarimètre JASCO P- 1010. Les mesures sont effectuées à une concentration de 10 mg/ml.

Les spectres de masse sont enregistrés sur un spectromètre de marque FINNIGAN LQC fonctionnant soit en mode électrospray (ESI: electrospray ionisation) soit en mode FAB (Fast Atomique Bombardement).

L'appareil comprend les parties suivantes:

- la zone API (Atmospheric Pressure Ionization) : les ions électrosprayés, traversent un capillaire chauffant (180-250°C), éliminant ainsi complètement le solvant, puis ils sont dirigés vers le tube lens ayant une tension située entre 0 et ± 60 V (tube lens offset). Cette tension sert à aider à la désolvation par l'accélération des ions ;

L'écumoire sert de zone tampon entre la «haute» pression de la région API (1 Torr) et la «basse pression» (10^{-3} Torr) des octapôles. La zone entre le tube lens et l'écumoire est celle de la fragmentation CID (Collision Induced Dissociation), car la pression résiduelle est suffisante pour induire une collision entre ions;

- les octapôles, qui servent uniquement à transférer les ions de la régions API à la trappe ionique et à éliminer les ions instables et métastables produits au cours du déplacement. Les deux octapôles sont reliés par des lentilles (interoctapole lens) qui focalisent les ions durant leurs transfert ;

- la trappe ionique: c'est l'analyseur de la masse du LCQ. Grâce aux différents modes de scan, plusieurs types d'analyses suivant l'information recherchée, peuvent être effectués. Les ions à analyser sont ensuite expulsés de la trappe vers la dynode, puis vers le multiplicateur d'électrons.

En général, les conditions suivantes ont été appliquées :

*tension de la source: 5 kV en positive et -3,5 kV en négatif ;

*température du capillaire: 210°C;

*flux d'azote: 900 mL/min;

*flux auxiliaire d'azote: 300 mL/min;

*tube de lens offset: - 40 à + 40 V.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont enregistrés en solution dans le méthanol deutérié (CD₃OD) sur un spectromètre Bruker AMX- 300 opérant à la fréquence de 300,13 MHz pour le proton et à 75,03 MHz pour le carbone (lock deutérium), ou sur un spectromètre Bruker AVANCE-400 opérant à la fréquence de 400,13 MHz pour le proton et de 100 MHz pour le carbone 13 (lock deutérium). Les spectres sont référencés par rapport au pic résiduel de solvant (δ_{13C} = 49 ppm et δ_H = 3,3 ppm). Le traitement des spectres est effectué avec le logiciel XWIN NMR de Bruker ou avec le logiciel MestreC.

L'analyse par CCM des échantillons obtenus au cours des différentes étapes de réaction et de purification est effectuée sur support silice 60F₂₅₄ (Merck, référence 5554) et sur aluminium, 0,2 mm. Deux systèmes de mélanges de solvants sont utilisés pour la migration:

- 1) CHCl₃/MeOH/AcOH (v/v/v = 70/30/3);
- 2) CHCl₃/MeOH/AcOH/TFA (v/v/v/v = 70/30/3/0,15).

La révélation des plaques se fait par pulvérisation d'une solution d'anisaldéhyde suivi du chauffage de la plaque jusqu'à la révélation des taches. La solution d'anisaldéhyde utilisée comme révélateur est fabriquée à partir de 25 ml d'anisaldéhyde, 5 ml d'acide acétique concentré, 450 ml d'éthanol et 25 ml d'acide sulfurique concentré.

L'analyse des produits ou milieux réactionnels a été effectuée par CLHP sur une chaîne Waters 1525 munie d'une pompe binaire, d'un détecteur à barrette de diodes (2996 photodiode Array detector) et d'un injecteur automatique Waters 717 plus Auto sampler ;

- La purification des produits d'extraction ou de réaction a été effectuée par CLHP préparative sur une chaîne ICS munie de pompes Bischoff et d'un détecteur KNAUER K2501. Les colonnes de silice C18 ont essentiellement été utilisées pour la chromatographie analytique et la chromatographie préparative. Une colonne phase chirale Cyclobond I 2000 RSP (β -cyclodextrine) de diamètre 4,6 x 250mm a également été utilisée en mode analytique pour certains échantillons. Les détails techniques sont présentés dans le Tableau 21.

	Mode analytique	Mode semi préparatif
Système de pompe	Waters 1525	
Injecteur	PDA Waters 2996	
Injecteur	Waters auto sampler 717 Plus	
Pré-colonne	Symmetry C18 Longueur = 1 cm, Diamètre des particules = 5 µm Diamètre interne = 5 mm	sampler RP18 Longueur = 2, 5 cm Diamètre des particules = 6 µm Diamètre interne = 5 mm
Colonne	C18 Symmetry 4,6 x 250 mm, 5 µm	sampler RP18, 8 x 250 mm, 6µm
Boucle d'injection	prélèvement de 0 à 50 µl	1ml
Température	30°C	30°C
Logiciel	Système Empower®: acquisition et retraitement des données	
Mode préparatif		
Système de pompes	Module de pompes Bischoff (ICS)	
Détecteur	UV Knauer (280nm ou 520 nm)	
Pré- colonne	sampler RP18 Diamètre des particules = 6 µm Longueur = 5 cm Diamètre interne = 20 mm	
Colonne	Silice C18 Diamètre des particules = 6 µm Longueur = 25 cm Diamètre interne = 20 mm	
Boucle d'injection	8 mL	
Logiciel	Pic 3 pour l'acquisition et retraitement des données	

Tableau 7: Caractéristiques de la CLHP utilisée en trois modes différents

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est utilisée pour une première fragmentation des extraits bruts de cacao. C'est une technique chromatographique basée sur le partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles préparés par le mélange de deux ou plusieurs solvants. Une phase est maintenue stationnaire par une force centrifuge, l'autre est pompée au travers de la phase stationnaire et joue le rôle de phase mobile. Des échanges

par transfert de masse s'effectuent entre les deux phases. Cette technique permet de traiter en une seule opération des quantités relativement importantes de produits comme on peut le voir dans le Tableau 11. Cette technique chromatographique présente plusieurs intérêts:

- l'absence de support solide élimine les phénomènes d'absorption irréversible ;
- diversité du choix des systèmes de solvants ;
- le caractère préparatif permet d'injecter de grandes quantités de produits avec une bonne reproductibilité ;
- Il n'y a pas de pertes. Les composés non élués peuvent être récupérés par l'évaporation de la phase stationnaire.

Deux types d'appareils CPC ont été utilisés, un EverSeiko LLB-M et un Kromaton dont les caractéristiques sont données dans le tableau suivant :

Appareil SANKI HPCPC série LLB-M 1000	
Vitesse de rotation	0-2000 RPM
Matériaux des disques de partage	poly-phénylènesulfide (PPS)
Pression maximum	60 bars
Cellules de partage	2136
Longueur des cellules	15 mm
Section des cellules	0,0588 cm ²
Dimension du rotor	Ø 200 mm ; H 95 mm
Rayon de centrifugation moyen	82,5 mm
Capacité de la colonne	240 ml
Poids du rotor	9,3 Kg
Dimensions (L x P x H)	310Wx470Dx500H (mm)
Poids total	45 Kg
Pompes	Bischoff têtes préparatives (0,1- 19,9mL/min)
Collecteur	Super Frac Pharmacia que

Tableau 8: Caractéristiques de l'appareil CPC SANKI

Appareil KROMATON HPCPC série	LLB-M 5000
Vitesse de rotation	200-2000 RPM
Matériaux des disques de partage	poly-phénylènesulfide (PPS)
Pression maximum	80 bars
Cellules de partage	
Longueur de cellule	*
Section des cellules	*
Diamètre du rotor	*
Rayon de centrifugation moyen	*
Capacité de la colonne	5000 ml
Poids du rotor	*
Dimensions (L x P x H)	80 x1360 x H 610 (mm)
Poids total	380 Kg

Tableau 9: Caractéristiques de l'appareil CPC KROMATON. (*) Données non communiquées par le constructeur

III.1.1 Préparation et purification des extraits globaux de polyphénols de cacao (EPT)

Nous avons mis au point une méthode d'enrichissement de différents extraits en polyphénols totaux en suivant la règle classique des solvants successifs à savoir:

- délipidation préalable avec de l'hexane, après dilution dans de l'eau distillée chaude;
- élimination de la quasi-totalité des méthylxanthines par du chloroforme et/ou du dichlorométhane;
- extraction des polyphénols totaux à l'aide d'acétate d'éthyle suivi d'une concentration à sec puis lyophilisation à volonté.

Protocole explicatif de l'extrait EPT.

1- 10 Kg de fèves fraîches de cacao pelées sont broyées dans 42791 ml d'un mélange éthanol/eau 76,2/23,8
2- puis mise à macérer dans une colonne ouverte (Ø 35 mm) durant 24 heures environ.
3- Après lixiviation la phase hydro-alcoolique est concentrée à sec puis lyophilisée
4- Une poudre de couleur violette intense est obtenue. Le meilleur rendement d'extraction est de 5 à 8 % sur la masse de fèves fraîches de départ. Ici nous avons obtenu 700 g d'Extrait Polyphénolique Total (EPT).

Tableau 10 Méthode d'obtention d'un Extrait Polyphénolique Total (EPT) à partir des fèves fraîches de cacao

Afin d'accéder à une analyse qualitative des polyphénols du cacao, une extraction a été menée sur les graines de cacao c'est à dire les fèves fraîches. Les graines sont

d'abord pelées c'est à dire dépourvues de leur pulpe mucilagineuse et de leur coque. Dans le cas d'une extraction des polyphénols à partir des graines de cacao, il faut tenir compte de leur teneur en eau pour l'extraction par solvant. Les graines de cacao contiennent environ 38 % d'eau. 64,5 g de graines (contenant donc 40 g de graines et 24,5 g d'eau) sont broyées dans 276 ml d'un mélange éthanol/eau 76,2/23,8, puis mise à macérer dans une colonne ouverte (\emptyset 35 mm) durant 24 heures environ. Après lixiviation la phase hydro-alcoolique est concentrée à sec puis lyophilisée. Une poudre de couleur violette intense est obtenue. Le meilleur rendement d'extraction est de 8 % sur la masse de fèves fraîches de départ.

Extraction des polyphénols à partir de l'extrait EPT par Chromatographie de Partage centrifuge (CPC)

Les conditions expérimentales de fractionnement de l'extrait EPT sont les suivantes : Après injection de l'extrait EPT, des fractions de 6 mL ont été récupérées. Les fractions de CPC sont analysées par CCM (conditions solvant I) et ensuite regroupées en blocs de mêmes profils. Au total nous obtenons 14 blocs

	Conditions expérimentales I	Conditions expérimentales II
<i>Echantillon (volume injecté)</i>	4g d'extrait (6,5 mL de phase stationnaire)	1,87 g d'extrait (3,5mL de phase stationnaire)
<i>Type d'injection</i>	Injection à l'équilibre	Injection à l'équilibre
<i>Appareil utilisé</i>	HPCPC SANKI Série 1000	HPCPC SANKI Série 1000
<i>Mode d'élution</i>	Ascendant et descendant	Ascendant
<i>Type d'élution (durée)</i>	Isocratique (9 heures)	Isocratique (11 heures)
<i>Système biphasique</i>	AcOEt/EtOH/eau/hexane	AcOEt/EtOH/eau/hexane
<i>Phase stationnaire</i>	AcOEt/EtOH/eau/hexane (8/2/7/1)	AcOEt/EtOH/eau/hexane (4/5/3/3)
<i>Phase mobile initiale</i>	En mode ascendant, la phase stationnaire est la phase «lourde» = phase aqueuse. La phase mobile est la phase «légère» = phase organique.	En mode ascendant, la phase stationnaire est la phase «lourde» = phase aqueuse. La phase mobile est la phase «légère» = phase organique.
<i>Phase mobile finale</i>		
<i>Rotation (rpm)</i>	1000	1000
<i>Débit (mL/min)</i>	2 (tube 1 à 156) 3 (tube 157 à 170) 4 (tube 171 à 180) 13	2 (tube 1 à 178) 4 (tube 179 à 190) 5 (tube 191 à 220) +28
<i>Perte de charge (bars)</i>	62 mL (74,16 %)	
<i>Volume de phase mobile (rétention)</i>	UV/vis. 280 nm + CCM sur plaque de silice conditions I	UV/vis. 280 nm + CCM sur plaque de silice conditions II
<i>Détection</i>	6 mL	6 mL
<i>Volume des fractions (mL)</i>		

Tableau 11: Conditions I et II de fractionnement par CPC

CPC condition II

N° Bloc	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rendement (%)	5,26	6,24	6,54	14	12,12	14	12,63	16,22	13,13

Tableau 12: Rendement des fractions de la CPC condition II

CPC condition I

N° Bloc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Rendement (%)	1,75	0,75	2,35	5,5	1,87	2,37	4,6	2,82	1,55	2,37	3,63	1,43	3,13	5,7

Tableau 13: Rendement des fractions de la CPC condition I

Caractérisation des composés isolés

- **Le composé C1** a été identifié comme étant la (+)-catéchine.

Les différentes caractéristiques physico-chimiques qui nous ont permis d'identifier la catéchine sont les suivantes:

- la CCM de **C1** révèle un spot orangé brun (après révélation par l'anisaldéhyde) caractéristique des tanins catéchiques. Le Rf est superposable à celui de la catéchine de référence dans le Système 1;
- le spectre UV de ce produit indique un maximum d'absorbance à: 279,3 nm;
- la coinjection avec la catéchine de référence en CLHP phase reverse C18 confirme cette hypothèse (le même temps de rétention et le même λ_{max});
- la mesure du pouvoir rotatoire donne un $[\alpha]_D^{26^\circ} = + 11$ (difficilement mesurable à cause de sa coloration et même après addition de noir animal);
- le spectre de masse de **C1** (FAB) nous indique le pic moléculaire à $m/z = 291,1$ en mode positif $[M+H]^+$, ($C_{15}H_{14}O_6$);
- les spectres RMN de **C1**; 1H , ^{13}C , HMBC ont été enregistrés dans CD_3OD et les caractéristiques proton et carbone (répertoriées dans le Tableau 23) sont identiques à celles de la catéchine[159].

• **Le Composé C2** a été identifié comme étant l'épicatéchine isolée du bloc VIIb. Les différentes caractéristiques physico-chimiques qui nous ont permis d'identifier l'épicatéchine sont les suivantes:

- la CCM de **C2** révèle un spot orangé-brun (après révélation par l'anisaldéhyde) caractéristique des tanins catéchiques. Le Rf est superposable à celui de l'épicatéchine de référence dans le Système 1;
- le spectre UV de ce produit indique un maximum d'absorbance à 279,3 nm;

- la coinjection avec l'épicatéchine de référence en CLHP phase reverse C18 indique le même temps de rétention et le même λ_{\max} ;
- la mesure du pouvoir rotatoire donne un $[\alpha]_D^{26} = -47,20$;
- le spectre de masse de **C2** (FAB) nous indique le pic moléculaire à $m/z = 291$ en mode positif $[M+H]$, ($C_{15}H_{14}O_6$);
- les spectres RMN de **C.2**; 1H , ^{13}C , HMBC ont été enregistrés dans CD_3OD et les caractéristiques proton et carbone sont identiques à celles de l'épicatéchine[159].

• **Le Composé C3** a été identifié comme étant la procyanidine B2 isolée par CLHP C18 préparative à partir du bloc IV de la 1^{ère} CPC.

Les différentes caractéristiques physico-chimiques qui nous ont permis d'identifier la B2 sont les suivantes:

- la CCM de **C3** révèle un spot orangé-brun (après révélation par l'anisaldéhyde) caractéristique des tanins catéchiques. Le R_f est inférieur à celui des monomères et superposable à ceux des dimères de références dans le Système 1;
- le spectre UV de **C3** indique un maximum d'absorbance à: 279,3 nm;
- la CLHP C18 analytique indique un temps de rétention de 12 min;
- la mesure du pouvoir rotatoire indique un $[\alpha]_D^{30} = +34$;
- le spectre de masse de **C3** (FAB) nous indique le pic moléculaire à $m/z = 577$ en mode négatif $[M-H]$, ($C_{30}H_{26}O_{12}$);
- les spectres RMN de **C3**; 1H , ^{13}C , HMBC ont été enregistrés dans CD_3OD et les caractéristiques proton et carbone (voir la Figure 52) sont identiques à celles de la procyanidine B2[65, 159].

• **Le Composé C4** a été identifié comme étant la procyanidine B5 isolée avec un rendement **0,15 %** par CLHP préparative sur le bloc XIIb de la CPC du bloc II de la 1^{ère} CPC. Les différentes caractéristiques physico-chimiques qui nous ont permis d'identifier la B5 sont les suivantes:

- la CCM de **C4** révèle un spot orangé-brun (après révélation par l'anisaldéhyde) caractéristique des tanins catéchiques. Le R_f est inférieur à celui des monomères et superposable à ceux des dimères de référence dans le Système 1;
- le spectre UV de **C4** indique un maximum d'absorbance à: 279,3 nm;
- la CLHP C18 analytique indique un temps de rétention de 35 min;
- la mesure du pouvoir rotatoire n'a pas été possible pour cause de quantité limitée;

- le spectre de masse de **C4** (FAB) nous indique le pic moléculaire à $m/z = 579,1$ en mode positif $[M+H]$, ($C_{30}H_{26}O_{12}$); les spectres RMN de **C4**, 1H , ^{13}C , HMBC ont été enregistré dans CD_3OD et les caractéristiques proton et carbone sont identiques à celles de la procyanidine B5 isolée (voir le Tableau 22).

III.2 Extraction du dimère B2 à partir de l'extrait de pépins de raisin

III.2.1 Extraction du dimère B2 à partir de l'extrait de pépins de raisins par CPC 5 litres

L'extrait de pépins de raisins a été mis au point par Chantal CATAGNINO[80] à partir de source végétale d'origine de la région de bordeaux.

	Conditions expérimentales
<i>Echantillon (volume injecté)</i>	50g d'extrait (200 mL de phase stationnaire)
<i>Type d'injection</i>	Injection à l'équilibre
<i>Appareil utilisé</i>	HPCPC KROMATON Série 5000
<i>Mode d'élution</i>	Ascendant et descendant
<i>Type d'élution (durée)</i>	Isocratique (5 heures 30minutes)
<i>Système biphasique</i>	AcOEt/EtOH/eau/hexane
<i>Phase stationnaire</i>	AcOEt/EtOH/eau/hexane
<i>Phase mobile initiale</i>	(8/2/7/1) [17280/3960/15120/2160] en mL
<i>Phase mobile finale</i>	En mode ascendant, la phase stationnaire est la phase «lourde» = phase aqueuse. La phase mobile est la phase «légère» = phase organique.
<i>Rotation (rpm)</i>	400 à 900
<i>Débit (mL/min)</i>	de 20 à 70 en fonction de la pression
<i>Perte de charge (bars)</i>	1 à 47
<i>Volume de phase mobile (rétention)</i>	1165
<i>Détection</i>	UV/vis. 280 nm + CCM sur plaque de silice
<i>Volume des fractions (mL)</i>	conditions I 150 (tube 1 à 60) 250 (tube 61 à 75) 65 (tube 76 à 100)

Tableau 14: Conditions de fractionnement par CPC 5 litres

Environ une quarantaine de litres de solvants est nécessaire pour cette séparation. L'extrait de pépins de raisin (50 g) a été injecté. Des analyses des fractions par CCM puis par CLHP sont effectuées afin de permettre une exploitation efficace des résultats.

Les 60 premières fractions avaient un volume de 150 ml chacune, les 15 suivantes de 250 ml et enfin les 25 dernières de 65 ml. Les fractions VII et VIII (rendements respectifs: 8,9 % et 3 %) contenant la B2 ont retenu notre attention. La fraction VIII ne contenait que deux pics dont le majoritaire était la B2, a servi pour l'obtention de la quantité exigée.

N° Bloc	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rendement %	1,44	4,1	1,34	34,98	1,06	6,78	9,06	3,34	2,48
N° Bloc	10	11	12	13	14	15	16	17	
Rendement %	4,02	6,98	6,94	4,42	0,5	2,28	7,08	2,78	

Tableau 15: Rendement des fractions de la CPC 5 litres

III.2.2 Purification de la B2 en l'ordre du gramme par CLHP préparative

Purification CLHP préparative [deux injections identiques]		
Echantillon: CPC Bloc 8 [2 X 400 mg + 1,2 mL de solvant de départ]		
Temps en minutes	Solvant A: H ₂ O %	Solvant B: MeOH %
0	85	15
120	0	100
Débit: 7 mL/minute	Détection à 280 nm	

Tableau 16: Conditions de la CLHP préparative.

III.3 Epimérisation et réarrangement en milieu basique

Epimérisation de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine

Première réaction : sur la (-)-épicatéchine

L'epimérisation de la (-)-épicatéchine a lieu en présence de:

- 4 g de Na₃PO₄ de N° de référence 28033 prolabo 6172 Rhône Poulenc;

- 400ml H₂O milliQ (pH = 7,45);
- le pH du milieu réactionnel est de 11,92;
- sous argon;
- et de 2 g d'épicatéchine;
- durée 30 heures de réaction ;
- Température ambiante.

La réaction est stoppée à l'aide d'une solution normale de HCl en ramenant le pH à 6,5. Extraction des polyphénols avec 4 x 250 mL d'acétate d'éthyle suivi d'un lavage à l' H₂O saturée de chlorure d'ammonium puis addition de Na₂SO₄ à la phase acétate d'éthyle pour absorber la phase aqueuse résiduelle. La phase acétate d'éthyle finale de 1000 mL est évaporée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 33°C.

Le rendement du brut réactionnel est = 65 %.

Deuxième réaction : sur la (+)-catéchine

L'épimérisation de la (+)-catéchine a eu lieu dans les mêmes conditions, à la différence que :

- la quantité de Na₃PO₄ est égale à la quantité de la (+)-catéchine c'est-à-dire 2,5 g de chaque;
- le volume d' H₂O est de 500 mL;
- le pH du milieu réactionnel est de 11,70;

Le rendement du brut réactionnel est de 97 %.

Isolement des énantiomères issus de l'épimérisation

Isolement par CLHP préparative de la (-)-catéchine et de la (+)-épicatéchine			
Quantités injectées: 1,3 g et 2,43 g			
Temps en minutes	Solvant A : H ₂ O %	Solvant B: MeOH %	
120	85	15	En Isocratique
Rendement (-)-catéchine = 20 % et la (+)-épicatéchine = 4,72 %			

Tableau 17: Conditions de la CLHP préparative pour l'isolement des énantiomères issus de l'épimérisation

Réarrangement en milieu basique de B2

La réaction a eu lieu en présence de:

- 500 mg de Na₃PO₄ de N° de référence 28033 prolabo 6172 Rhône Poulenc;
- 400ml H₂O milliQ de pH = 8,28;
- sous argon;
- le pH du milieu réactionnel est de 11,08;

- 200 mg de procyanidine B2;
- température ambiante
- durée 2 heures 30 minutes de réaction.

L'arrêt de la réaction et l'extraction des polyphénols totaux suivent les mêmes démarches que celles qui précèdent. Le rendement du brut réactionnel est = 78,5 %

Isolement des produits de réarrangement de B2

CLHP préparative C18		
Echantillon : 157 mg d'extrait issu de la réaction de réarrangement de B2		
<i>Temps en minutes</i>	<i>Solvant A: H₂O %</i>	<i>Solvant B: MeOH %</i>
0	85	15
120	0	100
<i>Débit: 7 mL/min Détection: 280 nm</i>		
<i>Rendement: F1 = 6,6 %, (-)-épicatéchine F2 = 2,25 % : C7, F3 = 2,6 % (-)-catéchine, F4 = 0,85 % : composée non déterminé, F5 = 4,1 % : C3 dimère B2</i>		

Tableau 18: Conditions de la CLHP préparative pour l'isolement des produits issus du réarrangement de B2 en milieu alcalin.

Pouvoir rotatoire des composés issus de réarrangement

Pour la mesure: C = 1 (10 mg/ml).

Dans notre cas, nous n'avions que 4,3 mg de produit donc C = 0,4 c'est-à-dire 4,3 mg dilué dans 1,3 ml de solvant. La température a été stabilisée à 30°C.

Pour **F2** (le dimère Ebaphobanidol **C7**): $[\alpha]_D^{30^\circ} = -44$

Pour le dimère d'origine (B2), $[\alpha]_D^{30^\circ} = +34$.

III.4 Méthode d'extraction et de caractérisation des polyphénols totaux à partir du chocolat commercial

Méthode d'extraction des polyphénols totaux

1- 300g de chocolat noir marque Côte d'Or, 86 % de cacao, est solubilisé dans 300ml H ₂ O chaude.
2- Délipidation à l'aide de 3x 700 mL d'hexane (rendement: 39 %)
3- Extraction des polyphénols totaux avec 10 x 1000 ml AcOEt (rendement: 14,57 %)
4- Evaporation à sec puis élimination des méthylxanthines à l'aide de 10 x 400 mL chlorure de méthylène, après solubilisation dans l'eau chaude. Rendement = 0,45 %

Tableau 19: Méthode d'obtention d'un extrait enrichi en polyphénols à partir du chocolat commercial.

Caractérisation des polyphénols

Deux supports de CLHP ont été employés, à savoir la C 18 (phase inverse) et la Cyclodextrine (phase chirale)

La CLHP C18

CLHP analytique C18: coinjection de la catéchine, l'épicatéchine, les dimères B2 et B5

Echantillon: extrait enrichi en polyphénols = 6 mg/mL filtré sur filtre 0,45 µm.

Temps en minutes	Solvant A: H ₂ O %	Solvant B: MeOH %
0	85	15
60	0	100

Composés identifiés: Catéchine, épicatéchine, procyanidine B2, et B5

Tableau 20: Conditions de la CLHP phase inverse C18 appliquée à l'extrait de chocolat enrichi en polyphénols.

La CLHP chirale

La colonne chirale est précédée d'une précolonne C18, la pression de la colonne ne doit jamais dépasser 2500 psi et il faut :

- rincer la colonne avec du H₂O à 0,6 mL /min pendant 30 minutes;
- rincer la colonne avec de EtOH à 0,8 mL/min pendant 30 minutes;
- équilibrer la colonne avec le solvant de départ pendant 25 minutes.

CLHP sur colonne chirale (β - cyclodextrine) puis par coinjection avec la (-)-épicatéchine, la (+)-épicatéchine, la (+)-catéchine et la (-)-catéchine.		
Echantillon: extrait enrichi en polyphénols = 6 mg/mL filtré sur filtre 0,45 μ m, 5 μ L injecté		
Temps en minutes	Solvant A: H ₂ O %	Solvant B: MeOH %
0	85	15
40	0	100
Enantiomères identifiés: la (-)- épicatéchine, la (+)-catéchine et la (-)-catéchine		

Tableau 21: Conditions de la CLHP phase chirale appliquée à l'extrait de chocolat enrichi en polyphénols.

Réarrangement en milieu basique de l'extrait cacao enrichi en polyphénols

Le traitement en milieu basique de l'extrait EPT issu des fèves de cacao est traité pour en éliminer les méthylxanthines. 30 g de l'extrait EPT sont dilués dans 30 ml d'eau distillée à 90°C puis lavés par 3 x 300 ml de chloroforme. Extraction des polyphénols par 4 x 300 ml d'acétate d'éthyle puis évaporation de la solution d'acétate d'éthyle. On récupère un mélange enrichi en polyphénols représentant 14,6 % de la masse totale de l'extrait EPT initial.

200 mg de cet extrait sont traités par 500 mg de Na₃PO₄ dans 400 ml d'eau milliQ. Le pH de la solution est de 11,02. La réaction se déroule pendant 2h 30 min sous argon, avec agitation à la température ambiante. L'évolution de la réaction est contrôlée par CLHP. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution normale d'acide chlorhydrique jusqu'à obtenir un pH de 6,5. L'extraction des polyphénols est effectuée par 4 x 250 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée par de l'eau saturée en chlorure d'ammonium puis séchée par ajout de Na₂SO₄ puis évaporée à sec.

Identification du produit de réarrangement C7

L'identification du produit de réarrangement C7 de l'extrait de cacao est réalisée par CLHP analytique phase inverse sur une colonne C18 en utilisant un gradient d'élution eau-méthanol: 85-15 à 0-100 en 60 min. Une première injection est faite avec l'extrait seul puis une coinjection avec le dimère C7 issu du réarrangement de la B2 en milieu alcalin.

III.5 Investigation de l'activité biologique des composés isolés

III.5.1 Evaluation de l'activité antioxydante

Test DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des trois composés. Il montre une forte bande d'absorption à 517 nm en solution dans l'éthanol en raison de la présence d'un électron libre et présente une coloration violette intense. La disparition de cette coloration permet une mesure directe de la capacité antioxydante des produits soumis au test DPPH.

Un mélange de 1ml d'eau d'eau/méthanol (50/50; v/v) des dits composés (concentration finale comprises entre 1 μ M et 120 μ M) sont additionnés à 0,5 mM de solution éthanolique de DPPH (volume final : 3ml) et la diminution de l'absorbance ($\lambda = 517$ nm) du mélange rouge après 90 minutes d'incubation à la température ambiante en absence de lumière. L'activité anti-radicalaire des molécules testées est exprimée en IC₅₀ (μ M), c'est à dire la concentration nécessaire pour atteindre 50% de baisse de l'absorbance de départ. Une solution éthanolique de DPPH sert de contrôle.

Culture cellulaire

Les cellules HT-29 (carcinome humain coloré), 361 (carcinome mammaire humain), Mewo (mélanocyte de peau) et NCTC (kératinocytes de peau), sontensemencées dans des plaques à 96 puits (7000 cellules/puits).

Test de l'activité antioxydante

48 heures après l'incubation, les cellules sont incubées pendant toute la nuit avec les trois composés **C2**, **C6** et **C5** correspondant respectivement à la (-)-épicatéchine, la (+)-épicatéchine et la (-)-catéchine à différentes concentrations de 0,6 μ M, 1,2 μ M et 3 μ M. Pour évaluer l'activité antioxydante de ces composés, les cellules sont traitées pendant 2 heures avec du H₂O₂ à 100 mM. Les cellules non traitées sont utilisées comme contrôle. Les cellules incubées avec les trois composés sont analysées pour tester leur toxicité éventuelle toxicité cellulaire.

Seules les cellules traitées avec du H₂O₂ (100 µM) sont utilisées pour la mesure du potentiel oxydatif.

La vitamine E est utilisée comme contrôle positif de l'activité antioxydante.

Les cellules 361 et NCTC pré incubées avec les trois composés à différentes concentration de 0,6 µM, 1,2 µM et 3 µM, sont de même traitées avec du Doxorubicin à 1,5 µM pour évaluer leur possible activité antitumorale.

Les quatre puitsensemencés sont exposés aux mêmes traitements dans cette expérience et ces essais ont été repris trois fois chacun.

Les résultats sont validés par le test SRB, qui donne des informations concernant la viabilité cellulaire pendant l'évaluation de la quantité de protéine cellulaire.

III.5.2 Mesures de viabilité et de prolifération sur différents types de cellules cancéreuses

Etude de la prolifération cellulaire

Les lignées U266, K562, Jurkat, Raji et THP1 sont incubées en présence de la molécule **C7**.

La concentration de cellules par puits dans une microplaque 96 puits est de 1.10⁴.

Les molécules sont testées à des concentrations de 1 - 10 - 25 - 50 - 75 - 100 µg/mL.

Préparation du milieu de culture et des cellules

Les cellules U266 sont dénombrées au microscope sur cellule de Malassez en présence de bleu trypan.

A partir de ce comptage, **1.105** cellules sontensemencées en présence de 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Cambrex), Pénicilline/Streptomycine 1X (Cambrex), et milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Cambrex) dans une boîte 96 puits à fond plat.

Préparation des solutions des molécules à tester

Les solutions mères des échantillons à tester sont préparées à 100 µg/ml (D1) en présence d'éthanol à 4%. Une étude sur une gamme de 5 concentrations comprise entre 0,01 µg/ml et 100 µg/ml, notées de D1 à D5.

Dilution D1 : 100 µg de molécule + 40 µl de EtOH + 960 µl de RPMI.

Dilution D2 : 100 µl de D1 + 900 µl de RPMI

Dilution D3 : 100 µl de D2 + 900 µl de RPMI

Dilution D4 : 100 µl de D3 + 900 µl de RPMI

Dilution D5 : 100 µl de D4 + 900 µl de RPMI.

Un contrôle à l'aide d'éthanol est réalisé en employant les mêmes dilutions.

Une fois les dépôts effectués sur la plaque 96 puits, les cellules sont placées dans un incubateur pendant 4 jours à 37°C, et 5% de CO₂.

Le jour de l'analyse, les cellules sont lavées deux fois au PBS (Tampon Phosphate Saline) pH = 7,4 – 7,5 et centrifugées pendant 5 minutes à 1500 tr/min à 10°C.

Le surnageant est retiré et on ajoute 500 µl de PBS, puis extemporanément 5 µl d'iodure de propidium.

III.5.3 Activités biologiques sur les récepteurs membranaires aux androgènes

Culture cellulaire

Les cellules T47D ont été obtenues auprès de la collection européenne de la culture cellulaire (Salisbury, UK). Elles ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (FBS), en atmosphère humide de 5 % de CO₂ dans l'air. Toutes les cultures de milieu de sérum sont de Gibco BRL. (Life technologies, Paisley, UK). Les lots de sérum sont testés avant utilisation pour la présence de polyphénols oxydase (séruloplasmine) et transférine, par des techniques néfélométriques conventionnelles. Dans aucun cas, les niveaux mesurables des substances n'ont été détectés.

La détection des récepteurs membranaires aux androgènes

Les cultures de cellules T47D sont lavées avec une solution tampon de phosphate saline (PBS), enlevées par raclage et centrifugées à 1500 rpm. Les cellules sont homogénéisées par sonication dans 50 mM du tampon tris-base à pH 7,4, contenant les inhibiteurs de protéase fraîchement additionnés (10 µg/ml PMSF et de 1 µg/ml d'aprotinine). Les cellules intactes sont enlevées par centrifugation à 2500 tours/min pendant 15 min. Les membranes sont collectées par centrifugation à 45000 tours/min pendant 1 heure, puis acidifiées par un volume de 50 mM de glycine pH 3 pendant 3 min, dans le but de dissocier toute membrane intracellulaire ou des récepteurs aux androgènes adsorbés, et suspendu dans 10 volumes de tampon tris-base. Après une centrifugation additionnelle à 45000 tours/min pendant une heure, la concentration de protéines est mesurée par la méthode de Bradford.

Les expériences de fixation (binding) sont opérées dans un volume final de 0,1 ml, contenant les membranes cellulaires T47D (2mg/ml) et 5 mM de [³H] testostérone (activité

spécifique 95 Ci/mol, sampler Binghamshire, UK) en absence ou en présence de différentes concentrations de dihydrotestostérone (DHT) ou de polyphénols respectivement de 10^{-2} à 10^{-6} M. à liaison non spécifique est estimée en présence de 5 μ M de DHT. Après une incubation d'une nuit à 4°C, la radioactivité flottante est séparée par filtration sous pression réduite, à travers des filtres GF/B, pré trempés dans 0,5 % de polyéthylamine (PEI) dans l'eau et rincés trois fois avec du gel-froid 50 mM de tampon tris-base pH 7,4. Les filtres sont mixés avec 3ml de cocktail scintillation et les radioactivités flottantes sont comptées dans un compteur à scintillation (Perkin Elmer, Foster City, CA) avec 60 % d'efficacité pour le tritium.

Détermination des actines monomériques et polymérisées

Pour les mesures d'actine monomérique (triton X-100 soluble) et polymérique (Triton X-100 insoluble), les cellules T47D,ensemencées dans des plaques à 6 puits, sont incubées pendant 3 h dans du milieu sans sérum. Par la suite, elles sont incubées dans le même milieu pendant le temps indiqué avec ou sans testostérone-BSA ou polyphénols (10^{-7} m). Après, 500 μ l de tampon Triton-extraction sont ajoutés (0,3 % Triton X-100, 5mM de Tris, pH 7,4, EGTA 2mM, saccharose 300 mM, phalloïdine 2 μ M, PMSF 1 mM, leupeptine 10 μ g/ml, aprotinine 20 μ m/ml, ortho vanadate de sodium 1 mM), et ce mélange est incubé pendant 5 min sur gel. Les protéines solubles dans les surnageants collectés sont précipitées avec les mêmes volumes de PCA à 6 %. La fraction restante de Triton-insoluble dans la plaque est précipitée avec 1 ml de PCA à 3 % et collectée par grattage. Les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à 12000 rpm. Le précipité est repris dans 0,2 ml de NaOH à N = 0,1. Des volumes égaux de cette fraction sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE). Les bandes de protéines résultantes sont transférées sur une membrane de nitrocellulose, puis la membrane est bloquée avec 5 % de lait séché écrémé dans du TBS-T (20 mM tris pH 7,6, NaCl 137 mM, Tween 20 0,05 %) pendant 1 h à température ambiante. Les solutions d'anticorps (dans le TBS-T) sont additionnées pendant 1 h à température ambiante [anticorps monoclonaux anti-actine de souris premièrement (sampler, Buckinghamshire, UK) et deuxièmement anticorps couplés à la peroxydase de horeradish (Chemicon, Temecula, CA)]. Les taches sont développées en utilisant le système ECL (sampler) et les intensités de bandes sont quantifiées par ordinateur grâce au programme basé sur l'analyse d'image.

Microscope- scanneur confocal à laser du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette est visualisé avec une lignée fluorescente des microfilaments d'actine par du rhodamine-phalloïdine (Molecular Probes, Leiden, NL). Les cellules T47D (3×10^5) sontensemencées sur du poly-L-lysine-coated cover slips, (placées dans des plaques à 6 puits). Un jour après les ensemencements, les cellules sont pré incubées avec du milieu sans sérum pendant 3 heures et traitées immédiatement avec du testostérone-BSA ou des polyphénols (10^{-7} M) pendant 1 heure. Dans le cas du traitement de Wortmannin, l'agent (obtenu de Sigma) est introduit à la concentration de 100 mM 1 h avant l'application de la testostérone-BSA ou des polyphénols. Après fixation avec 3,7 % de formaldéhyde et de gel-froid acétone, les cellules sont incubées pendant 40 min à température ambiante avec du rhodamine-phalloïdine (1 unité/puit) pour marquer les filaments d'actine. Les glissements sont amplifiés avec du milieu Mowiol antifading. Les couverts slips sont analysés en utilisant un module de microscope à laser confocal à scan (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) équipé avec un Ar-Kr laser.

Les analyses d'immunoprecipitation et d'immunoséchage

Les cellules traitées avec de la testostérone-BSA ou les polyphénols (10^{-7} M, pour les périodes indiquées), de même que les non traitées (contrôles) sont lavées trois fois avec du gel-foïd PBS et suspendues dans un tampon froid de lysine contenant 1 % de Nonidet P-40 20mM Tris pH 7,4, et du NaCl 137 mM, supplémenté avec une protéase et des inhibiteurs de phosphate. Les lysats clairs sont pré adsorbés avec de la protéine sampler pendant 1 h à 4°C, centrifugés et les surnageants contenant les protéines) sont soumis à l'immunoprecipitation en utilisant les anticorps indiqués et la protéine sampler beads.

Pour les analyses d'immunoséchage, les cellules lysiate ou les immunoprécipités sont suspendus dans un échantillon de tampon Laemmli's et séparé par SDS-PAGE. Les protéines sont transférées sur la membrane nitrocellulose, et bloquées avec 5 % de la poudre de lait écrémé dans du TBS-T (20 mM Tris pH 7,4, NaCl 137 mM, Tween-20 0,05%) pendant 1 heure à température ambiante. La solution d'anticorps (dans le TBS-T contenant 5 % de nonfat) est ajoutée pendant la nuit à 4° C (1^{er} anticorps) et pendant 1 heure (2nd anticorps couplé à la peroxydase de horeradish). Les taches sont développées en utilisant le système ECL et les intensités des bandes sont quantifiées par ordinateur avec analyse d'image (Image Analysis Inc., Ontario, Canada). Les antiphosphotyrosine (PY20) ainsi que l'anticorps polyclonal pour FAK (rabbit) sont de Santa Cruz Biotechnology Inc. L'anticorps (p85) polyclonal anti-PI-3 rabbit est de Upstate Biotechnology Inc.

Les essais d'apoptoses

Les cellules T47D sont cultivées dans du milieu RPMI 1640, 10 % de FBS (Gibco BRL, Life Technologies, Plaisley, UK), dans des plaques de 96 puits précouvertes de gélatine. La testostérone BSA et les polyphénols sont additionnés au milieu de culture 24 heures après. Après le temps indiqué, le milieu est débarrassé, et l'apoptose est évaluée en utilisant la sampler Apoptosis Assay Kit (Biocolor Ltd, Belfast, N. Ireland), comme décrit auparavant. Les essais utilisant les colorants qui sont importés par les cellules ayant subi l'apoptose, quand le mécanisme de translocation phosphatidylserine «flip-flop» au feuillet membranaire. Le colorant est d'une couleur rouge pourpre. Après cela le colorant provenant des cellules marquées est rélargué par un apport de tampon et la concentration intracellulaire de colorant cellulaire est mesurée à 540 nm avec le filtre de référence à 620 nm, dans un colorimètre à microplaque (Dynatech MicroElisa reader Chantilly, VA). Des expériences ont montré que les résultats obtenus avec cette méthode présentent une bonne corrélation avec la détermination des oligo-nucléosomes ou les essais d'apoptose basés sur du Annexin V/PI Standing and Flow Cytometry.

Analyse des résultats

Les résultats sont analysés en utilisant les programmes OriginV5 (Microcal Software, Northampton, MA) et Systat V10 (SPSS Inc., Chicago, Il), programmes basés sur ordinateur.

III.6 Analyse RMN 1D et 2D des composés isolés

Conditions d'acquisition des données RMN

Les produits soumis à l'analyse RMN sont dissouts dans 0,6 ml de CD₃OD. Les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre Bruker AMX- 300 opérant à 300,13 MHz pour le proton et à 75,03 MHz pour le carbone, et sur un spectromètre Bruker AMX-400MHz opérant à 400,13 MHz pour le proton et 100 MHz pour le ¹³C.

N° carbone	1H RMN δ_H , ppm	13C RMN δ_C , ppm	(³ J _{CH})	(² J _{CH})
2(C)	4,91	78,0		
3(C)	4,02	73,4		4(C)
4(C)	4,56 (1,2)	38,4		
4a(A)	-	101,4		
5(A)	-	158,7	4(C)	6(A)
6(A)	6,06 d (2,4)	96,9		8(A)
7(A)	-	160,3		6(A), 8(A)
8(A)	5,99 d (2,4)	97,5		6(A)
8a(A)	-	160,2	4(C)	8(A)
	-			
1'(B)		133,1	5'(B)	2(C), 2'(B)
2'(B)	6,89 d (2,0)	116,0	2(C), 6'(B)	
3'(B)	-	146,7	5'(B)	2'(B)
4'(B)	-	146,4	2'(B), 6'(B)	5'(B)
5'(B)	6,73 d (8,2)	116,7		
6'(B)	6,68 dd (8,2-1,5)	120,0	2(C), 2'(B)	
2(F)	4,81	80,5		
3(F)	4,15	68,2		
4(F)	2,68 (16,5)	30,4		
	2,98 dd (16,5- 4.5)			
4a (D)	-	101,4	3(F), 8(D)	4(F)
5(D)	-	157,0	4(F)	
6(D)	-	108,9		4(C)
7(D)	-	156,6	4(C)	
8(D)	6,07s	97,4		
8a (D)	-	156,2	4(F)	
	-			
1' (E)		133,1	3(F), 5'(E)	2(F), 2'(E)
2' (E)	6,97 d (1.8)	116,1	2(F), 6'(E)	
3' (E)	-	146,7	5'(E)	2'(E)
4' (E)	-	146,5	2'(E), 6'(E)	5'(E)
5' (E)	6,76 d (8.2)	116,7		
6' (E)	6,80 dd (8,2-1.8)	120,2	2(F), 2'(E)	

Tableau 22: Déplacements chimiques des protons et des carbones (ppm) observés pour le composé **C4** (Dimère B5) en solution dans CD₃OD à partir du spectre HMBC. Les colonnes 4 et 5 présentent les protons couplés à travers deux et trois liaisons (²J et ³J) avec les carbones présentés dans la colonne 1.

Troisième partie : partie expérimentale

Les spectres sont calibrés par rapport aux déplacements chimiques des solvants utilisés. L'acquisition et le traitement sont réalisés avec le logiciel XWINNMR de Brüker. Les tableaux suivants présentent les résultats des analyses effectuées.

Position	δ_H	δ_C	($^3J_{CH}$)	($^2J_{CH}$)
2 (C) 4 β (C)	4,56 d	82	2'(B), 6'(B)	3(C)4 α (C),
3 (C) 4 β (C)	3,95 m	67		2(C),4 α (C),
4 (C)	2,48 dd 2,85	27		2 (C)
4a (A)		101	3(C), 6(A), 8(A)	4 α (C), 4 β (C)
5 (A)		156	4 α (C), 4 β (C)	
6 (A)	5,85 d	94		
7 (A)		158		6 (A), 8 (A)
8 (A)		95		
8a (A)		155		
1' (B)		131	3 (C)	2(C), 2'(B)
2' (B)	6,82 d	114	2 (C)	
3' (B)		145		
4' (B)		145	2' (B), 6'(B)	3' (B)
5' (B)	6,72 d	115	3' (B)	6' (B)
6' (B)	6,7 dd	118	2 (C), 2' (B)	

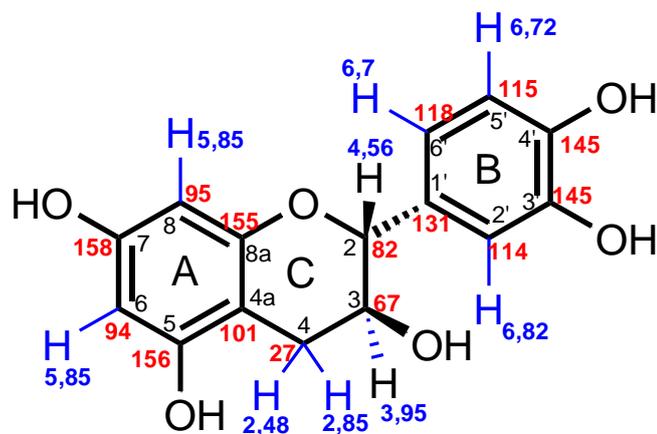
Tableau 23: Déplacements chimiques des protons et des carbones (ppm) observés pour le composé **C1** ((+)-Catéchine) en solution dans CD₃OD à partir du spectre HMBC. Les colonnes 4 et 5 présentent les protons couplés à travers deux et trois liaisons (2J et 3J) avec les carbones présentés dans la colonne 1.

Troisième partie : partie expérimentale

Position	δ_H	δ_C
2 (C)	4,15 d (2,2)	45,3
3 (C)	4,25 dd (1,1; 2,2)	74,1
4 (C)	5,62 d	69,9
2 (F)	4,67 s	79,7
3 (F)	4,10 m	74,1
4 (F)	2,70 (dd 3,8; 16,6) 2,87 (dd 4,7; 16,7)	29,3
5 (A)		157,4
6 (A)	5,93 s	95,1
7 (A)		157,8
8 (A)	5,93 s	96,4
8a (A)		158,3
4a (A)		101,8
4a (D)		99,9
5 (D)		157,6
6 (D)	5,98 s	97,7
7 (D)		156,9
8 (D)		104,9
8a (D)		154,4
1' (B)		136,0
2' (B)	6,58 m	116,5
3' (B)		145
4' (B)		144,1
5' (B)	6,65 d	116,4
6' (B)	6,42 d	120,5
1' (E)		131,3
2' (E)	6,60 m	113,4
3' (E)		145,2
4' (E)		144,9
5' (E)	6,73 m	116,6
6' (E)	6,17 d	118,7

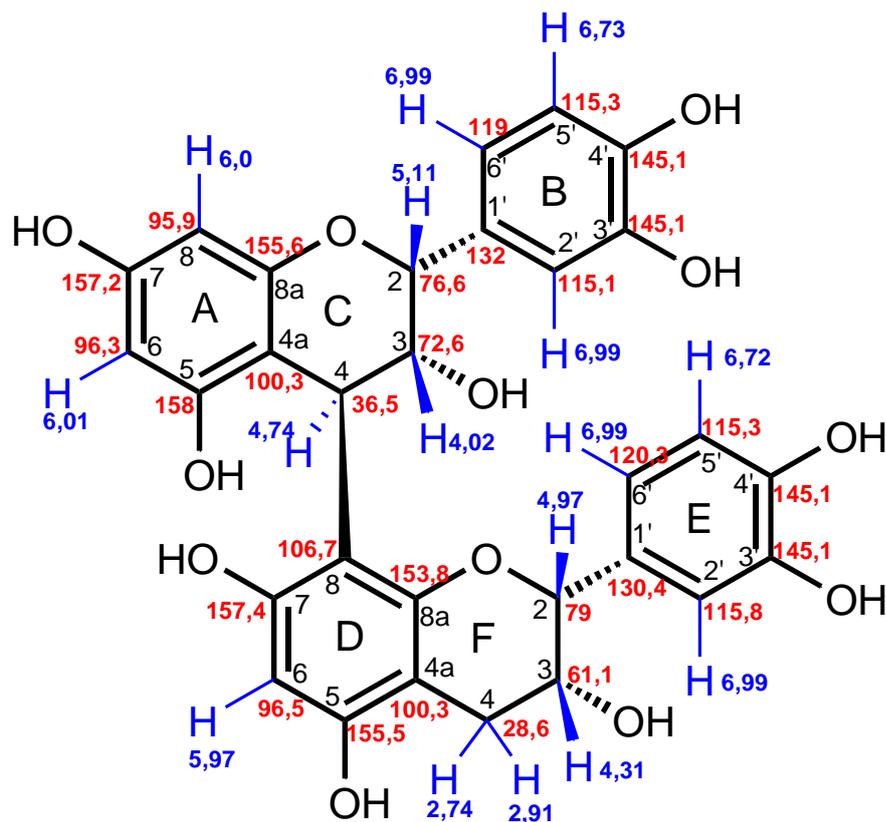
Tableau 24: Les δ (ppm) des protons et des carbones du de : l'Ebaphlobanidol (**C7**) HMBC à 400 MHz dans du méthanol deutérié

ANNEXES DES DONNEES RMN



C1 : (+)-Catechine

Figure 51 : Déplacements chimiques observés pour le composé C1



C3 : Procyanidine B2

Figure 52 : Déplacements chimiques observés pour le composé C3

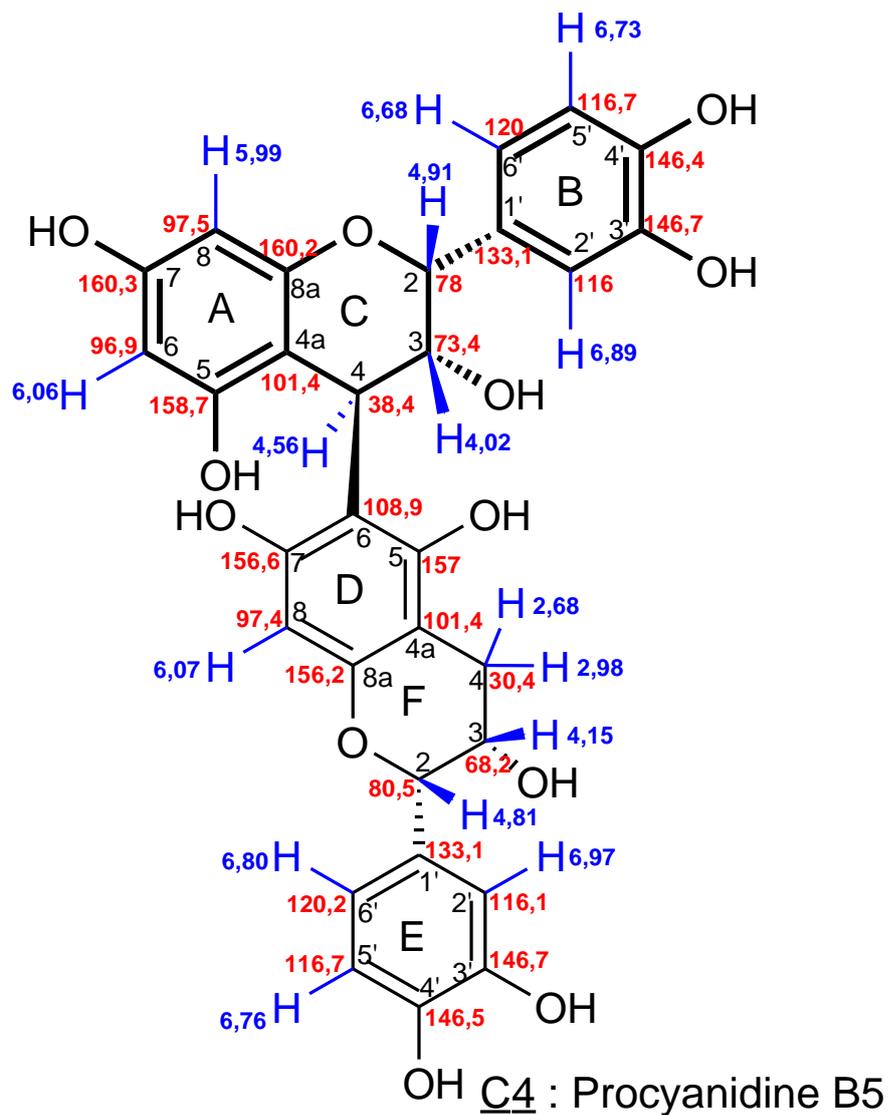


Figure 53 : Déplacements chimiques observés pour le composé C4

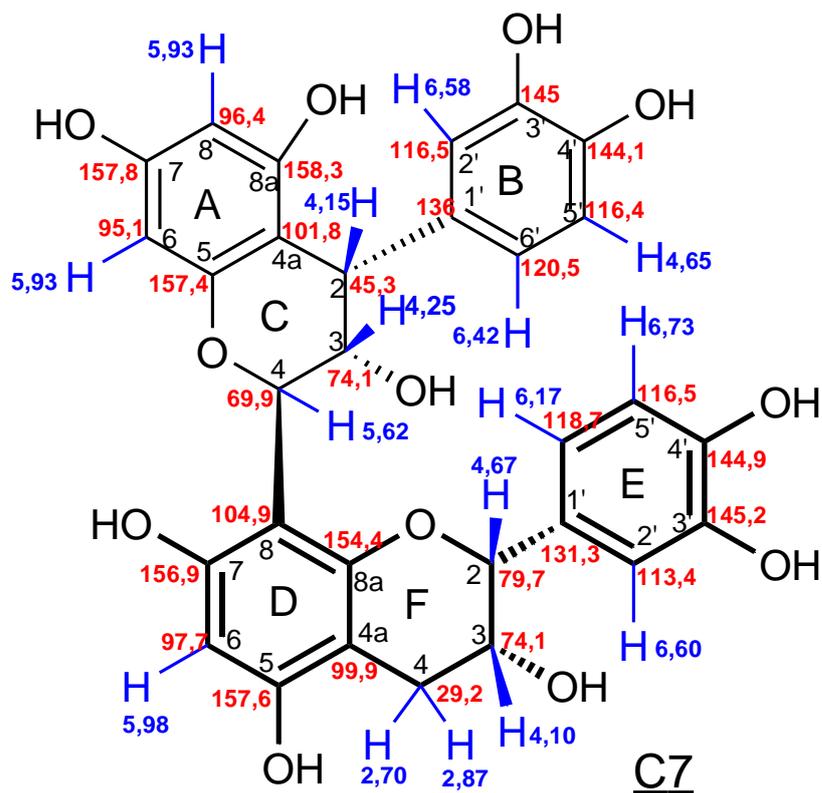


Figure 54 : Déplacements chimiques observés pour le composé **C7**

IV. Liste des publications

POSTERS

“Enantiomeric purity of flavanols in wines.”

KOUAME BOSSON Antoine, CASTAGNINO Chantal, VERCAUTEREN Joseph
Poster In proceeding of In Vino Analytica Scientia, Montpellier, 7-9 July 2005, FECS Event
n° 308, pp 139.

“Les polyphénols : les molécules de la vie”

David VAUZOUR, Antoine Bosson KOUAME, Chantal CASTAGNINO, Sylvie MUNIER,
Joseph VERCAUTEREN
Journée Jean Le Men, Faculté de Pharmacie, Reims, 28 novembre 2003.

«Separation of champagne polyphenols by bioguided activity on human cancer cell lines»

David VAUZOUR, Audrey JULIA, Cathérine BARJOT, Chantal CASTAGNINO, Sylvie
MUNIER, Antoine Bosson KOUAME, Jean François ROSSI, Joseph VERCAUTEREN.
Journée scientifique de l’institut Max Mousseron, Université Montpellier 2, Montpellier le 29
mars 2004.

«Stilbenoids compounds isolated from *Vitis vinifera* stems by centrifugal partition chromatograph»

Chantal CASTAGNINO, David VAUZOUR, Sylvie MUNIER, Audrey JULIA, Antoine
Bosson KOUAME, Joseph VERCAUTEREN. Journée scientifique de l’institut Max
Mousseron, Université Montpellier 2, Montpellier le 29 mars 2004.

“PROTECTION AGAINST BRAIN OXIDATIVE STRESS : THE CHAMPAGNE POLYPHENOLS CONTRIBUTION”

David VAUZOUR, Audrey JULIA, Sylvie MUNIER, Antoine Bosson KOUAMÉ,
Chantal CASTAGNINO, Roland ZINI, Jean-Paul TILLEMENT and Joseph
VERCAUTEREN
XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, 2004.

“CHAMPAGNE POLYPHENOL EXTRACT INDUCES APOPTOSIS AND CELL CYCLE MODIFICATIONS IN HUMAN CANCER CELL LINES.”

David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Audrey JULIA, Sylvie MUNIER, Antoine
Bosson KOUAMÉ, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI and Joseph VERCAUTEREN
XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, 2004

“Further stilbenoids from *Vitis vinifera* stem extracts”

Chantal CASTAGNINO, David VAUZOUR, Sylvie MUNIER, Antoine BOSSON
KOUAMÉ, Audrey JULIA and Joseph VERCAUTEREN
XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, 2004,

Chapitres d'ouvrage.

“CHAMPAGNE POLYPHENOL EXTRACT INDUCES APOPTOSIS AND CELL CYCLE MODIFICATIONS IN HUMAN CANCER CELL LINES.”

David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Audrey JULIA, Sylvie MUNIER, Antoine Bosson KOUAMÉ, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI and Joseph VERCAUTEREN
In proceedings of XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, **2004**, pp 421.

“PROTECTION AGAINST BRAIN OXIDATIVE STRESS: THE CHAMPAGNE POLYPHENOLS CONTRIBUTION”

David VAUZOUR, Audrey JULIA, Sylvie MUNIER, Antoine Bosson KOUAMÉ, Chantal CASTAGNINO, Roland ZINI, Jean-Paul TILLEMENT and Joseph VERCAUTEREN
In proceedings of XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, **2004**, pp 419.

“Further stilbenoids from *Vitis vinifera* stem extracts”

Chantal CASTAGNINO, David VAUZOUR, Sylvie MUNIER, Antoine BOSSON KOUAMÉ, Audrey JULIA and Joseph VERCAUTEREN
In proceedings of XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, **2004**, pp 709.

PUBLICATIONS

“Monomeric and oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors”

Artemissia-Phoebe Nifli, Antoine Bosson-Kouamé, Natalia Papadopoulou, Christina Kogia, Marilena Kampa, Chantal Castagnino, Christos Stournaras, Joseph Vercauteren, Elias Castanas,
Received 4 April 2005, revised version received 18 June 2005, accepted 21 June **2005**
Experimental Cell Research, 2005. **309**(2): p. 329.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Rigaudy, J. and S.P. Klesney, *Nomenclature of Organic Chemistry - The Blue Book*, ed. IUPAC. 1979, Oxford: Pergamon Press.
2. Schatzkin, A., *Dietary change as a strategy for preventing cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 1997. **16**(3-4): p. 377-392.
3. Marques Vidal, P., D. Arveiler, A. Evans, M. Montaye, A. Bingham, J.B. Ruidavets, D. McMaster, B. Haas, P. Amouyel, and P. Ducimetiere, *Patterns of alcohol consumption in middle-aged men from France and Northern Ireland. The PRIME study*. *Eur J. Clin. Nutr.*, 2000. **54**(4): p. 321-328.
4. *Nutrition: a review of the WHO programme. I*. *WHO Chron.*, 1972. **26**(4): p. 160-79.
5. Arveiler, D., J.P. Cambou, M.C. Nuttens, A. Bingham, G. Hedelin, J.B. Ruidavets, J.L. Richard, J.L. Salomez, A. Sacrez, and P. Schaffer, *Acute coronary care and treatment of myocardial infarction in the three French MONICA registers*. *Rev. Epidémiol. Santé Publ.*, 1990. **38**: p. 429-434.
6. Cambou, J.P., J.L. Richard, D. Arveiler, M.C. Nuttens, J.B. Ruidavets, A. Bingham, J.L. Salomez, P. Schaffer, and P. Douste-Blazy, *Les premiers enseignements du projet MONICA*. *Rev. Prat. (Paris)*, 1990. **40**(24): p. 2247-2260.
7. Jost, J.P., C. Simon, M.C. Nuttens, A. Bingham, J.B. Ruidavets, J.P. Cambou, D. Arveiler, J.M. Lecerf, J.L. Schleinger, and P. Douste-Blazy, *Comparison of dietary patterns between population samples in the three French MONICA nutritional surveys*. *Rev. Epidémiol. Santé Publ.*, 1990. **38**: p. 517-523.
8. Richard, J.L., D. Arveiler, J.P. Cambou, M.C. Nuttens, A. Bingham, J.B. Ruidavets, P. Schaffer, J.L. Salomez, and P. Douste-Blazy, *Between-register and within-register variability in event-finding and rates in the MONICA-France Project*. *Rev. Epidémiol. Santé Publ.*, 1990. **38**: p. 403-410.
9. Keys, A. and M. Keys, *How to eat well and stay well, the Mediterranean way*. 1975, New York: Double Day Company Inc.
10. de Gaetano, G., A. Di Castelnuovo, M.B. Donati, and L. Iacoviello, *The mediterranean lecture: wine and thrombosis--from epidemiology to physiology and back*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003. **33**(5-6): p. 466-71.
11. *Understanding local Mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach*. *Pharmacol Res*, 2005. **52**(4): p. 353-366.
12. Saint Leger, A.S., A.L. Cochrane, and F. Moore, *Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine*. *Lancet*, 1979. **12**(May): p. 1017-1020.
13. Renaud, S. and M. De Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart disease*. *The Lancet*, 1992. **339**(8808): p. 1523-1526.

Références bibliographiques

14. Stanner, S.A., J. Hughes, C.N. Kelly, and J. Buttriss, *A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'*. Public Health Nutr., 2004. **7**(3): p. 407-22.
15. Van't Veer, P., M.C. Jansen, M. Klerk, and F.J. Kok, *Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease*. Public Health Nutr., 2000. **3**(1): p. 103-7.
16. Kris-Etherton, P.M., K.D. Hecker, A. Bonanome, S.M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel, and T.D. Etherton, *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. J. Am. Med., 2002. **113**(2): p. 71-88.
17. Pearson, T.A., D. Osorio, and K. Brown, *Nutritional interventions in cardiovascular disease: new challenges and opportunities*. Curr. Atheroscler Rep., 2000. **2**(6): p. 515-20.
18. Arteel, G.E., P. Schroeder, and H. Sies, *Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers*. J. Nutr., 2000. **130**(8): p. 2100S-2104S.
19. Watson, T.D., *Diet and skin disease in dogs and cats*. J. Nutr., 1998. **128**(12 Suppl): p. 2783S-2789S.
20. Sun, A.Y., A. Simonyi, and G.Y. Sun, *The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **32**(4): p. 314-318.
21. Abd El Mohsen, M.M., M.M. Iravani, J.P. Spencer, S. Rose, A.T. Fahim, T.M. Motawi, N.A. Ismail, and P. Jenner, *Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(2): p. 386-91.
22. Willis, M.S. and J. Wians, Frank H., *The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances*. Clinica Chimica Acta, 2003. **330**(1-2): p. 57-83.
23. Vaisman, N. and N. Arber, *The role of nutrition and chemoprevention in colorectal cancer: from observations to expectations*. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol, 2002. **16**(2): p. 201-17.
24. Miller, E.C., E. Giovannucci, J.W. Erdman, Jr., R. Bahnson, S.J. Schwartz, and S.K. Clinton, *Tomato products, lycopene, and prostate cancer risk*. Urol. Clin. North Am., 2002. **29**(1): p. 83-93.
25. Mason, J.B., *Nutritional chemoprevention of colon cancer*. Semin. Gastrointest Dis., 2002. **13**(3): p. 143-53.
26. Harman, D., *Extending functional life span*. Exp. Gerontol., 1998. **33**(1-2): p. 95-112.

Références bibliographiques

27. Wood, J.G., B. Rogina, S. Lavu, K. Howitz, S.L. Helfand, M. Tatar, and D. Sinclair, *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. *Nature*, 2004. **430**(7000): p. 686-9.
28. USDA-Iowa State University Database, *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods*. 2002.
29. Elder, S.J., D.B. Haytowitz, J. Howe, J.W. Peterson, and S.L. Booth, *Vitamin k contents of meat, dairy, and fast food in the u.s. Diet*. *J. Agr. Food Chem.*, 2006. **54**(2): p. 463-467.
30. Koontz, J.L., K.M. Phillips, K.M. Wunderlich, J. Exler, J.M. Holden, S.E. Gebhardt, and D.B. Haytowitz, *Comparison of total folate concentrations in foods determined by microbiological assay at several experienced U.S. commercial laboratories*. *J AOAC Int*, 2005. **88**(3): p. 805-13.
31. Kinoshita, T., Z. Lepp, and H. Chuman, *Approach to novel functional foods for stress control: 1. Toward structure-activity relationship and data mining of food compounds by chemoinformatics*. *J Med Invest*, 2005. **52 Suppl**: p. 240-1.
32. Bialostosky, K., J.D. Wright, J. Kennedy-Stephenson, M. McDowell, and C.L. Johnson, *Dietary intake of macronutrients, micronutrients, and other dietary constituents: United States 1988-94*. *Vital Health Stat 11*, 2002(245): p. 1-158.
33. Lagiou, P., E. Samoli, A. Lagiou, Y. Skalkidis, K. Katsouyanni, E. Petridou, and D. Trichopoulos, *Flavonoid classes and risk of peripheral arterial occlusive disease: a case-control study in Greece*. *J. Eur. Clin. Nutr.*, 2006. **60**(2): p. 214-9.
34. Calabrese, V., A.M. Stella, M. Calvani, and D.A. Butterfield, *Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes*. *J. Nutr. Biochem.*, 2006. **17**(2): p. 73-88.
35. Sofic, E., N. Denisova, K. Youdim, V. Vatrejak-Velagic, C. De Filippo, A. Mehmedagic, A. Causevic, G. Cao, J.A. Joseph, and R.L. Prior, *Antioxidant and pro-oxidant capacity of catecholamines and related compounds. Effects of hydrogen peroxide on glutathione and sphingomyelinase activity in pheochromocytoma PC12 cells: potential relevance to age-related diseases*. *J. Neural. Transm.*, 2001. **108**(5): p. 541-57.
36. Robertson, A., C. Tirado, T. Lobstein, M. Jermini, C. Knai, J.H. Jensen, A. Ferro-Luzzi, and W.P. James, *Food and health in Europe: a new basis for action*. WHO Reg. Publ. Eur. Ser., 2004(96): p. i-xvi, 1-385, back cover.
37. Harborne, J.B. and T.J. Mabry, *The flavonoids: advances in research*. 1982, London: Chapman and Hall.
38. Dey, P.M. and J.B. Harborne, *Plant phenolics. Methods in plant biochemistry*. Academic Press: New York. ed. Vol. I. 1989.

Références bibliographiques

39. Vercauteren, J. and C. Chèze. *Polyphenols Communications 96*. in *XVIIIth International Conference on Polyphenols*. 1996. Bordeaux: Groupe Polyphénols.
40. Wollgast, J. and E. Anklam, *Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification*. Food Research Inter., 2000. **33**(6): p. 423.
41. Bruneton, J., *Pharmacognosie. Phytochimie, Plantes médicinales*. 3ème ed. Vol. 1. 1999, Paris: Tech. et doc. p.1120.
42. Berke, B., D. Vauzour, C. Castagnino, V. Arnaudinaud, B. Nay, C. Cheze, and J. Vercauteren, *Wine and health: recent findings*. J. Pharm. de Belgique, 2003. **58**(3): p. 57-74.
43. Dreosti, I.E., *Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine*. Nutrition, 2000. **16**(7-8): p. 692.
44. Pontillon, J., *CACAO et CHOCOLAT production, utilisation, caractéristiques*. Techniques et documentation, lavoisier (Paris) ed. 1998. p.35-67.
45. Steinberg, F.M., M.M. Bearden, and C.L. Keen, *Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health*. J. Am. Diet. Ass., 2003. **103**(2): p. 215.
46. Soulet, S., *Les polyphénols du cacao: de leur valorisation à l'authentification de l'origine géographique*. 2002, Thèse d'Université Victor Segalen Bordeaux. p. 131.
47. Forsyth, W.G.C. and J.B. Roberts, *Cacao polyphenolic substances. V. The structure of cacao leucocyanidin 1*. Biochem. J., 1960. **74**: p. 374-378.
48. Jalal, M.A.F. and H.A. Collin, *Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of Theobroma cacao*. Phytochemistry, 1977. **16**(9): p. 1377-1380.
49. Kim, H. and P.G. Keeney, *Method of analysis for (-)-Epicatechin in cocoa beans by high performance liquid chromatography*. J. Food Sci., 1983. **48**: p. 548-551.
50. Clapperton, J., J.F. Hammerstone, L.J. Romanczyk, S. Yow, J. Chan, D. Lim, and R. Lockwood. *Polyphenols and cocoa flavour*. in *13-16 July 16th International Conference of Groupe Polyphenols*. 1992. Lisbon Portugal.
51. Rigaud, J., M.T. Escribano, C. Prieur, J.M. Souquet, and V. Cheynier, *Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cocoa and grape seeds*. J. Chrom. A, 1993. **654**: p. 225-260.
52. Osakabe, N., M. Yamagishi, C. Sanbongi, M. Natsume, T. Takizawa, and T. Osawa, *The antioxidative substances in cacao liquor*. J. Nutri. Sci. and Vitamino, 1998. **44**(2): p. 313-321.
53. Osakabe, N. and M. Yamagishi, *Procédés de fabrication d'un agent antioxydant et d'un aliments et boissons diététiques contenant cet antioxydant*. 1995: Japon.

Références bibliographiques

54. Serra Bonvehi, J. and F.V. Coll, *Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder*. Food Chem., 1997. **60**(3): p. 365-370.
55. Romanczyk, L.J.J., J.F.J. Hammerstone, M.M. Buck, L.S. Post, G.G. Cipolla, C.A. McClelland, J.A. Mundt, and H.H. Schmitz, *Cocoa extract compounds and methods for making and using the same*. 1997, (Mars, Inc., USA). Application: WO. p. 338.
56. Hammerstone, J.F., S.A. Lazarus, A.E. Mitchell, R. Rucker, and H.H. Schmitz, *Identification of procyanidins in cocoa (Theobroma cacao) and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry*. J. Agr. Food Chem., 1999. **47**: p. 490-496.
57. Adamson, G.E., S.A. Lazarus, A.E. Mitchell, R.L. Prior, G. Cao, P.H. Jacobs, B.G. Kremers, J.F. Hammerstone, R.B. Rucker, K.A. Ritter, and H.H. Schmitz, *HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity*. J. Agr. Food Chem., 1999. **47**(10): p. 4184-418.
58. Kealey, K.S., R.M. Snyder, L.J.J. Romanczyk, H.M. Geyer, M.E. Myers, E.J. Whitacre, J.F.J. Hammerstone, and H.H. Schmitz, *Cocoa components having enhanced polyphenol content*. 1998, (Mars, Incorporated, USA). Application: WO. p. 148.
59. Kealey, K.S., R.M. Snyder, L.J. Romanczy, H.M. Geyer, M.E. Myers, E.J. Withcare, J.F. Hammerstone, and H.H. Schmitz, *Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and uses*. 2000: U.S.
60. Vinson, J.A., J. Proch, and L. Zubik, *Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate*. J. Agri. and Food Chem., 1999. **47**(12): p. 4821-4824.
61. Hoving, H.D., D.A.J. Starmans, and H.R. Kattenberg, *Process for extracting polyphenolic antioxidants from purine-containing plants*. 2000, (Adm. Cocoa B. V., Neth.). Application: EP. p. 9.
62. Richelle, M., T. Huynh-Ba, I. Tavazzi, V. Mooser, M. Enslin, and E.A. Offord, *Antioxidant capacity and epicatechin bioavailability of polyphenolic-rich beverages (cocoa and teas)*. ACS Symposium Series, 2000. **754**(Caffeinated Beverages): p. 102-110.
63. Wollgast, J., L. Pallaroni, M.-E. Agazzi, and E. Anklam, *Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection*. J. Chrom. A, 2001. **926**(1): p. 211.
64. Alemanno, L., T. Ramos, A. Gargadenec, C. Andary, and N. Ferriere, *Localization and identification of phenolic compounds in Theobroma cacao L. somatic embryogenesis*. Annals of Botany (Oxford, United Kingdom), 2003. **92**(4): p. 613-623.

Références bibliographiques

65. Khan, M.L., E. Haslam, and M.P. Williamson, *Structure and conformation of the procyanidin B-2 dimer*. Magn. Reson. Chem., 1997. **35**(12): p. 854-858.
66. Sanbongi, C., N. Suzuki, and T. Sakane, *Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro*. Cell Immunol., 1997. **177**(2): p. 129-136.
67. Carnesecchi, S., Y. Schneider, S.A. Lazarus, D. Coehlo, F. Gosse, and F. Raul, *Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells*. Cancer Lett., 2002. **175**(2): p. 147.
68. Osman, H., R. Nasarudin, and S.L. Lee, *Extracts of cocoa (Theobroma cacao L.) leaves and their antioxidation potential*. Food Chem., 2004. **86**(1): p. 41-46.
69. Villeneuve, F., *Les composés phénoliques de la fèves de cacao: Theobroma cacao L. Evolution au cours de la fermentation*, in *Sciences agronomiques, option phytochimie*. 1982, Thèse d'Université Montpellier. p. 109.
70. Bastide, P., *Evolution et métabolisme des composés phénoliques des fèves de cacao durant leur développement au cours de la croissance et la maturation du fruit de Theobroma cacao L.* 1987, Thèse de doctorat d'université Montpellier. p. 147.
71. Hatano, T., M. H., M. Natsume, N. Osakabe, T. Takizawa, H. Ito, and T. Yoshida, *Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects*. Phytochemistry, 2002. **59**(7): p. 749-758.
72. Porter, L.J., Z. Ma, and B.G. Chan, *Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites*. Phytochemistry, 1991. **30**(5): p. 1657-1663.
73. Counet, C., D. Callemien, and S. Collin, *Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid*. J. Food Chem., (DOI: 10.1016/.2005.06030).
74. Thompson, R.S., D. Jacques, E. Haslam, and R.J.N. Tanner, *Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1972: p. 1387-1399.
75. Sanbongi, C., N. Osakabe, M. Natsume, T. Takizawa, S. Gomi, and T. Osawa, *Antioxidative Polyphenols Isolated from Theobroma cacao*. J. Agri. and Food Chem., 1998. **46**(2): p. 454-457.
76. Osakabe, N., M. Natsume, T. Adachi, M. Yamagishi, R. Hirano, T. Iakizawa, H. Itakura, and K. Kondo, *Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits*. J. atherosclerosis and thrombosis, 2000. **7**(3): p. 164-168.
77. Griffiths, L.A., *A comparative study of the seed polyphenols of the genus Theobroma*. J. Biochem., 1960. **74**: p. 362-365.

Références bibliographiques

78. Natsume, M., N. Osakabe, T. Takizawa, T. Nakamura, H. Miyatake, T. Hatano, and T. Yoshida, *Analyses of polyphenol constituents in cocoa and chocolate*. Abstracts of Papers, 220th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, August 20-24, 2000, 2000: p. AGFD-138.
79. Kim, H. and P.G. Keeney, *Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans*. J. Food Sci., 1984. **49**: p. 1090-1092.
80. Castagnino, C., *Etude des polyphénols glycosylés des vins rouges de Bordeaux*, in *Pharmacie*. 1996, Thèse d'Université Victor Segalen Bordeaux 2. p. 193.
81. Teguo, P.W., A. Decendit, J. Vercauteren, G. Deffieux, and J.M. Mérillon, *Trans-resveratrol-3-O-beta-glucoside (piceid) in cell suspension cultures of vitis vinifera*. Phytochemistry, 1996. **42**(6): p. 1591-1593.
82. Mérillon, J.M., B. Fauconneau, P.W. Teguo, L. Barrier, J. Vercauteren, and F. Huguet, *Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from Vitis vinifera cell cultures*. Clin. Chem., 1997. **43**(6): p. 1092-1093.
83. Ribeiro de Lima, M.T., P. Waffo Tégou, P.L. Teissedre, A. Pujolas, J. Vercauteren, J. Cabanis, and J.-M. Mérillon, *Determination of stilbenes (Trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines*. J. Agr. Food Chem., 1999. **47**(7): p. 2666-2670.
84. Castagnino, C. and J. Vercauteren, *Castavinol, a new series of polyphenols from Bordeaux red wines*. Tetrahedron Lett., 1996. **37**(43): p. 7739-7742.
85. Lian, G., A. Thiru, A. Parry, and S. Moore, *CFD simulation of heat transfer and polyphenol oxidation during tea fermentation*. Computers and Electronics in Agri., 2002. **34**(1-3): p. 145-158.
86. Barel, M.A., *Délai d'écabossage influence sur les rendements, la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié*. Café, Cacao, 1987. **31** N° 2: p. 141-150.
87. Guehi, T.s., *Etude de l'origine et des conditions de fonctionnement de l'activité lipasique impliquée dans la formation des acides gras libres du cacao marchand*. 2003, Université de Montpellier II: Montpellier. p.148.
88. Wollgast, J. and E. Anklam, *Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?* Food Research Inter., 2000. **33**(6): p. 449.
89. Hernandez, T., I. Estrella, D. Carlavilla, P.J. Martin-Alvarez, and M.V. Moreno-Arribas, *Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees*. Analy. Chim. Acta, DOI: 10.1016/J.aca.2005.10.061: p. 10.
90. Bekker, J., P. Bridle, H. Kuwano, N. Saito, N. Terahara, and F. Timberlake, *Identification of an anthocyanin occurring in some red wines*. Phytochemistry, 1996. **44**(7): p. 1375-1382.

Références bibliographiques

91. Fulcrand, H., C. Benabdeljalil, J. Rigaud, V. Cheynier, and M. Moutounet, *A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins*. *Phytochemistry*, 1998. **47**(7): p. 1401-1407.
92. Quideau, S., M. Jourdes, C. Saucier, Y. Glories, P. Pardon, and C. Baudry, *DNA Topoisomerase Inhibitor Acutissimin A and Other Flavanol-Ellagitannins in Red Wine*. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003. **42**: p. 6012-6014.
93. Luczaj, W. and E. Skrzydlewska, *Antioxidative properties of black tea*. *preventive medicine*, 2004. **40**(2005): p. 910-918.
94. Ferreira, D. and D. Slade, *Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles*. *Nat. Prod. Rep.*, 2002. **19**: p. 517-741.
95. Xu, J.Z., L.K. Leung, Y. Huang, and Z.Y. Chen, *Epimerisation of tea polyphenols in tea drinks*. *J. Sci. Food and Agri.*, 2003. **83**(15): p. 1617-1621.
96. Wang, H. and K. Helliwell, *Epimerisation of catechins in green tea infusions*. *Food Chem.*, 2000. **70**(3): p. 337-344.
97. Komatsu, Y., S. Suematsu, Y. Hisanobu, H. Saigo, R. Matsuda, and K. Hara, *Studies on preservation of constituents in canned drinks. Part II. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins en green tea infusion*. *Biosci, Biotechn. and Biochem.*, 1993. **57**(6): p. 907-910.
98. Seto, R., H. Nakamura, F. Nanjo, and Y. Hara, *Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment*. *Biosci. Biotechn. and Biochem.*, 1997. **61**(9): p. 1434-1439.
99. Gagné, S., *Café, chocolat et cholestérol*, in *Actu. médicale*. 2002.
100. Lamuela-Raventos, *Review: health effects of cocoa flavonoids*. *Food Sci. and Techn. inter.*, 2005. **11**(3): p. 159-176.
101. Horowitz, E., *Flavanoids found in chocolate may protect against cardiovascular disease*. *J. Am. clin. nutr.* **7038**: p. 301-350.
102. Tetsuo, N., *Hypercholesterolemia preventive beverage and food*. 1999: Japon.
103. Takashi, A., *Food and beverages for preventing gastric ulcer*. 1995: Japon.
104. Ramljak, D., L.J. Romanczy, L.J. Metheny-Barlow, R.S. Thompson, V. Knezevic, M. Galperin, A. Ramesh, and R.B. Dickson, *Pentameric procyanidin from Theobroma Cacao L. selectively inhibits growth of human breast cancer cells*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2005. **4**(4): p. 537-546.
105. Roginsky, V. and E.A. Lissi, *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*. *Food Chem.*, 2005. **92**(2): p. 235-254.
106. Haslam E., *Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action*. *J. Nat. Prod.*, 1996. **59**(2): p. 205-215.

Références bibliographiques

107. Jovanovic S. V., S.S., Tomic M., Marjanovic B. and Simic M. G., *Flavanoids as antioxidants*. J. Am. Chem. Soc., 1994. **116**(11): p. 4849-4851.
108. Pietta, P.G., *Flavanoids as antioxidants*. J. Nat. Prod., 2000. **63**: p. 1035-1042.
109. Renaud, S.C. and J.C. Ruf, *Effects of alcohol on platelet functions*. Clin. Chim. Acta, 1996. **246**(1-2): p. 77-89.
110. Hertog, M.G.L., *Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids*. Proc. Nutr. Soc., 1996. **55**(1B): p. 385-397.
111. Ruf, J.C., J.L. Berger, and S. Renaud, *Platelet rebound effect of alcohol withdrawal and wine drinking in rats - relation to tannins and lipid peroxidation*. Arterioscler Thromb. Vasc. Biol., 1995. **15**(1): p. 140-144.
112. Woodward, M. and H. Tunstallpedoe, *Alcohol consumption, diet, coronary risk factors, and prevalent coronary heart disease in men and women in the scottish heart health study*. J. Epidemiol. Community Health, 1995. **49**(4): p. 354-362.
113. Kannel, W.B. and R.C. Ellison, *Alcohol and coronary heart disease: the evidence for a protective effect*. Clin. Chim. Acta, 1996. **246**(1-2): p. 59-76.
114. Rimm, E.B., *Alcohol consumption and coronary heart disease: good habits may be more important than just good wine - invited commentary*. J. Am. Epidemiol., 1996. **143**(11): p. 1094-1098.
115. Ferrières, J., *Alcohol and cardiovascular diseases: epidemiological studies*, in *Polyphenols, Wine and Health*, C. Chèze, J. Vercauteren, and R. Verpoorte, Editors. 2001, Kluwer Academic Publishers: Bordeaux. p. 149-175.
116. Bearden, M.M., Rein D., Chevaux K. A., Carpentier D. R., Keen C. L. and Schmitz H., *Potential cardiovascular health benefits of procyanidins present in chocolate and cocoa*. Am. Chem. Soc., 2000. **19**: p. 177-186.
117. Kondo, K., R. Hirano, A. Matsumoto, O. Igarashr, and H. Ltahura, *Inhibition of LDL oxidation by cocoa*. The Lancet, 1996. **348**(9040): p. 1514.
118. Waterhouse, A.L., Shirley J. R. and Donovan J. L., *Antioxidants in chocolate*. The Lancet, 1996. **348**(30): p. 1514.
119. Frankel, E., J. Kanner, J. German, E. Parks, and J. Kinsella, *Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine*. The Lancet, 1993. **341**(8843): p. 454-457.
120. Puppò, A., *Effect of flavanoids on hydroxyl radical by Fenton-type reactions; influence of the ion chelator*. Phytochemistry, 1992. **31**(1): p. 85-88.
121. Petroni, A., M. Blasevich, M. Salami, N. Papini, G.F. Montedoro, and C. Galli, *Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil*. Thromb. Res., 1995. **78**(2): p. 151-160.

Références bibliographiques

122. Pace-Asciak, C.R., O. Rounova, S.E. Hahn, E.P. Diamandis, and D.M. Goldberg, *Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects*. Clin. Chim. Acta, 1996. **246**(1-2): p. 163-182.
123. Abuamsha, R., K.D. Croft, I.B. Puddey, J.M. Proudfoot, and L.J. Beilin, *Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine*. Clin. Sci., 1996. **91**(4): p. 449-458.
124. Kanner, J., E. Frankel, R. Granit, B. German, and J.E. Kinsella, *Natural antioxidants in grapes and wines*. J. Agr. Food Chem., 1994. **42**(1): p. 64-69.
125. Meyer, A.S., O.S. Yi, D.A. Pearson, A.L. Waterhouse, and E.N. Frankel, *Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (Vitis vinifera)*. J. Agr. Food Chem., 1997. **45**(5): p. 1638-1643.
126. Pace-Asciak, C.R., S. Hahn, E.P. Diamandis, G. Soleas, and D.M. Goldberg, *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease*. Clin. Chim. Acta, 1995. **235**(2): p. 207-219.
127. Laughton, M., P. Evans, M. Moroney, J. Hoult, and B. Halliwell, *Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability*. Biochem. Pharmacol., 1991. **42**(9): p. 1673-1681.
128. Wang, H., M.G. Nair, G.M. Strasburg, Y.-C. Chang, A.M. Booren, J.I. Gray, and D.L. DeWitt, *Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries*. J. Nat. Prod., 1999. **62**(2): p. 294-296.
129. Rhodes, M.J.C. *Physiological roles of phenolic compounds in plants and their interactions with microorganisms and humans*. in *Polyphenols 96, 18th International Conference on Polyphenols, Bordeaux (France)*. 1996: Groupe Polyphénols.
130. Tsuchiya, H., M. Sato, M. Iinuma, J. Yokoyama, M. Ohyama, T. Tanaka, I. Takase, and I. Namikawa, *Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones*. Experientia, 1994. **50**(9): p. 846-849.
131. Osawa, K., H. Yasuada, T. Maruyama, H. Morita, K. Takeya, and H. Itokawa, *Isoflavanones from the heartwood of Swartzia polyphylla and their antibacterial activity against cariogenic bacteria*. Chem. Pharm. Bull., 1992. **40**(11): p. 2970-2974.
132. Ivancheva, S., N. Manolova, J. Serkedjieva, V. Dimov, and N. Ivanovska. *Polyphenols from Bulgarian medicinal plants with anti-infectious activity*. in *Plant Polyphenols. Synthesis, properties, significance*. 1992. New-York, London.
133. Kuroyanagi, M., T. Arakawa, Y. Hirayama, and T. Hayashi, *Antibacterial and antiandrogen flavonoids from Sophora flavescens*. J. Nat. Prod., 1999. **62**(12): p. 1595-1599.

Références bibliographiques

134. Brinkworth, R., M. Stoermer, and D. Fairlie, *Flavones are inhibitors of HIV-1 protease*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992. **188**(2): p. 631-637.
135. Li, B., T. Fu, Y. Yan, F. Baylor, F. Ruscetti, and H. Kung, *Inhibition of HIV infection by baicalin-a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine*. *Cell. Mol. Biol. Res.*, 1993. **39**(2): p. 119-124.
136. Mahmood, N., C. Pizza, R. Aquino, N. DE Tommasi, S. Piacente, S. Colman, A. Burke, and A. Hay, *Inhibition of HIV infection by flavonoids*. *Antivir. Res.*, 1993. **22**(2-3): p. 189-199.
137. Nagai, T., Y. Miyaichi, T. Tomimori, Y. Suzuki, and H. Yamada, *In vitro anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase*. *Antivir. Res.*, 1992. **19**(3): p. 207-217.
138. Draczynska Lusiak, B., A. Doung, and A. Sun, *Oxidized lipoproteins may play a role in neuronal cell death in Alzheimer disease*. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 1998. **33**(2): p. 139-148.
139. Orgogozo, J.M., J.F. Dartigues, S. Lafont, L. Letenneur, D. Commenges, R. Salamon, S. Renaud, and M. Breteler, *Wine consumption and dementia in the elderly: A prospective community study in the Bordeaux area*. *Rev. Neurol.*, 1997. **153**(3): p. 185-192.
140. Huang, C.S., W.Y. Ma, A. Goranson, and Z.G. Dong, *Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway*. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(2): p. 237-242.
141. Tanaka, H., M. Hirose, M. Kawabe, M. Sano, Y. Takesada, A. Hagiwara, and T. Shirai, *Post-initiation inhibitory effects of green tea catechins on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats*. *Cancer Lett.*, 1997. **116**(1): p. 47-52.
142. Jang, M.S., E.N. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon, and J.M. Pezzuto, *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. *Science*, 1997. **275**(5297): p. 218-220.
143. Subbaramaiah, K., W.J. Chung, P. Michaluart, N. Telang, T. Tanabe, H. Inoue, M.S. Jang, J.M. Pezzuto, and A.J. Dannenberg, *Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells*. *J. Biol. Chem.*, 1998. **273**(34): p. 21875-21882.
144. Marchelli, R., A. Dossena, and G. Palla, *The potential of enantioselective analysis as a quality control tool*. *Trends in Food Sci. & Technology*, 1996. **7**(4): p. 113-119.
145. Caja, M.M., G.P. Blanch, M. Herraiz, and M.L. Ruiz del Castillo, *On-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography coupled to mass spectrometry for*

Références bibliographiques

- enantiomeric analysis of chiral compounds in fruit beverages*. J. Chrom. A, 2004. **1054**(1-2): p. 81-85.
146. Bordajandi, L.R., L. Ramos, and M.J. Gonzalez, *Chiral comprehensive two-dimensional gas chromatography with electron-capture detection applied to the analysis of chiral polychlorinated biphenyls in food samples*. J. Chrom. A, 2005. **1078**(1-2): p. 128-135.
147. Ingoldsdottir, K., *Usnic acid*. Phytochemistry, 2002. **61**(7): p. 729-736.
148. Sanchez-Gonzalez, I., A. Jimenez-Escrig, and F. Saura-Calixto, *In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter)*. Food Chem., 2005. **90**(1-2): p. 133-139.
149. Vinson, J.A. *Chocolate: A heart-healthy food/snack and a significant contributor of antioxidant in the US diet*. in *230th ACS National Meeting*. 2005. Washington, D.C.
150. Nyfeler, F., U.K. Moser, and P. Walter, *Stereospecific effects of (+)- and (-)-catechin on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes*. Biochim. and Biophysica Acta, 1983. **763**(1): p. 50-57.
151. Echeverry, C., M. Ferreira, M. Reyes-Parada, J.A. Abin-Carriquiry, F. Blasina, G. Gonzalez-Neves, and F. Dajas, *Changes in antioxidant capacity of tannat red wines during early maturation*. J. Food Engin., 2004. **69**(2005): p. 147-154.
152. Wan, S.B., D. Chen, Q.P. Dou, and T.H. Chan, *Study of the green tea polyphenols catechin-3-gallate (CG) and epicatechin-3-gallate (ECG) as proteasome inhibitors*. Bioorg Med. Chem., 2004. **12**(13): p. 3521-7.
153. Yoshino, K., K. Ogawa, T. Miyase, and M. Sano, *Inhibitory Effects of the C-2 Epimeric Isomers of Tea Catechins on Mouse Type IV Allergy*. J. Agr. and Food Chem., 2004. **52**(15): p. 4660-4663.
154. Xu, J.Z., S.Y. Yeung, C.Q. Venus, Y. Huang, and Z.Y. Chen, *Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers*. British J. Nutr., 2004. **91**(6): p. 873-881.
155. Lecoupeau, J.-P. and J. Vercauteren, *Method for obtaining cocoa bean polyphenol extracts, resulting extracts and uses thereof*. 2001: US.
156. Rolet, M.C., D. Tribeaut, and R. Rosset, *La chromatographie de partage centrifuge (CPC)*. Analysis, 1992. **20**: p. 1-11.
157. Renault, J.H., P. Thepenier, M. ZechesHanrot, L. LeMenOlivier, A. Durand, A. Foucault, and R. Margraff, *Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography*. J. Chrom. A, 1997. **763**(1-2): p. 345-352.
158. Delaunay, J.C., C. Castagnino, C. Chèze, and J. Vercauteren, *Preparative isolation of polyphenolic compounds from Vitis vignifera by centrifugal partition chromatography*. J. Chrom. A, 2002. **964**: p. 123-128.

Références bibliographiques

159. Balas, L., *Tanins catechiques: isolement, hémisynthèse et analyse structurale par RMN 2D homo- et hétéro-nucléaire. Contribution à l'étude des tanins du raisin et des vins de Bordeaux*. 1992, Thèse d'Université de Bordeaux 2: Bordeaux. p. 428.
160. Cheng-Ben, C., Y. Tezuka, T. Kikuchi, H. Nakano, T. Tamaoki, and J.H. Park, *Constituents of a fern, Davallia mariesii Moore. II. Identification and ¹H- and ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Procyanidin B-5, Epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→6)-epicatechin and epicatechin-(4β→6)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→6)-epicatechin*. Chem. Pharm. Bull., 1992. **40**(4): p. 889-898.
161. Castagnino, C., *Étude des polyphénols glycosylés des vins rouges de Bordeaux*. 1996, Thèse pour le Doctorat de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2 p. 193.
162. Freudenberg, K., O. Böhme, and L. Purrmann, *Raumisomere catechine, II. [9. Mitteilung über Gerbstoffe und ähnliche Verbindungen]*. Berichte, 1922. **55**: p. 1734-1747.
163. Foo, L.Y. and L.J. Porter, *Synthesis and conformation of procyanidin diastereoisomers*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1983: p. 1535-1543.
164. Courbat, P., A. Weith, A. Albert, and A. Pelter, *Contribution à l'étude du comportement de la catéchine en milieu alcalin*. Helv. Chim. Acta., 1977. **60**(5): p. 1665-1675.
165. Kiatgrajai, P., J.D. Wellons, L. Gollob, and J.D. White, *Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid*. J. Org. Chem., 1982. **47**: p. 2910-2912.
166. Kennedy, J.A., M.H.G. Munro, H.K.J. Powell, L.J. Porter, and L.Y. Foo, *The protonation reactions of catechin, epicatechin and related compounds*. J. Aust. Chem., 1984. **37**: p. 885-892.
167. Metha, P.P. and W.B. Whalley, *The stereochemistry of some catechin derivatives*. J. Chem. Soc. Perkin, Trans. 1, 1963: p. 5327-5332.
168. Sears, K.D., R.L. Casebier, H.L. Hergert, G.H. Stout, and L.E. McCandlish, *The structure of catechinic acid. A base rearrangement product of catechin*. J. Org. Chem., 1974. **39**(22): p. 3244-3247.
169. Burger, J.F.W., H. Kolodziej, R.W. Hemingway, J.P. Steynberg, A. Young D, and D. Ferreira, *Oligomeric flavanoids. Part 15- Base-catalyzed pyran rearrangements of procyanidin B-2, and evidence for the oxidative transformation of B- to A-type procyanidins*. Tetrahedron, 1990. **46**(16): p. 5733-5740.
170. Steynberg, J.P., B.C.B. Bezuidenhout, J.F.W. Burger, D.A. Young, and D. Ferreira, *Oligomeric flavanoids. Part 7. Novel based-catalyzed pyran rearrangements of procyanidins*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1990: p. 203-208.

Références bibliographiques

171. Burger, J.F.W., J.P. Steynberg, A. Young D, and E.V. Brandt, *Oligomeric flavonoides. Part 5. Base catalysed C-ring isomerisation of (+)-fisetinidol-(+)-catechin*. J. Chem. Soc. Perkin, Trans. 1, 1989: p. 671-681.
172. Malan, J.C.S., A. Young D, J.P. Steynberg, and D. Ferreira, *Oligomeric flavanoids, Part 10. Structure and synthesis of first tetrahydropyrano [3, 2-g]chromenes related to (4,6)-bis (-)-fisetinidol*. J. Chem. Soc. Perkin, Trans. 1, 1990: p. 227-234.
173. Steynberg, J.P., J.F.W. Burger, A. Cronje, S.L. Bonnet, J.C.S. Malan, A.Y. Desmond, and D. Ferreira, *Structure and synthesis of phlobatanins related to (-)-fisetinidol (-)-epicatechin*. Phytochemistry., 1990. **29**: p. 2979-2989.
174. Steynberg, J.P., J.F.W. Burger, D.A. Young, E.V. Brandt, J.A. Steenkamp, and D. Ferreira, *Oligomeric flavonoides. Part 4. Base catalysed conversions of (-)-fisetinidol-(+)-catechin profisetinidins with 2,3-trans-3,4-cis-flavan-3-ol constituent units*. J. Chem. Soc. Perkin, Trans. 1, 1988: p. 3331-3338.
175. Nay, B., V. Arnaudinaud, A. Nuhlich, G. Déffieux, J.-M. Mérillon, J.-P. Monti, and J. Vercauteren, *Total synthesis of isotopically labelled flavonoids, Part 4. Decagram scale production of optically pure ¹³C-labelled (+)-catechin and (-)-epicatechin. Applications to the study of their bioavailability*. J. Eur. Org. Chem., 2001: p. 2379-2384.
176. Balas, L. and J. Vercauteren, *Extensive High-Resolution Reverse 2D NMR Analysis for the Structurale Elucidation of Procyanidin Oligomers*. Magn. Reson. Chem., 1994. **32**: p. 386-393.
177. Botha, J.J., D.A. Young, D. Ferreira, and D.G. Roux, *Synthesis of Condensed Tannins. Part 1. Stereoselective and stereospecific Syntheses of Optically Pure 4-Arylflavan-3-ols, and Assessment of their Absolute Stereochemistry at C-4 by means of Circular Dichroism*. J. Chem. Soc. Perkin, Trans. 1, 1980: p. 1211-1219.
178. Tanaka, T., S. Watarumia, and I. Kouno. *Structure and synthesis of polyphenols-amino acid conjugate isolated from black tea*. in *XXII International Conference on polyphenols*. 2004. Helsinki, Finland.
179. Gotti, R., S. Furlanetto, S. Pinzauti, and V. Cavrini, *Analysis of catechin in Theobroma cacao beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography*. J. Chroma. A, 2005. **In Press, Corrected Proof**.
180. Vauzour, D., *Etude des propriétés biologiques des constituants des vins de Champagne*, in *Faculté de Pharmacie*. 2004, Thèse d'Université Montpellier I. p. 231.
181. Nifli, A.P., A. Bosson-Kouamé, N. Papadopoulou, C. Kogia, M. Kampa, C. Castagnino, C. Stournaras, J. Vercauteren, and E. Castanas, *Monomeric and oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors*. Exper. Cell Research, 2005. **309**(2): p. 329-33.

**Titre Impact santé des procédés de préparation des
aliments riches en polyphénols : chocolat, vin, thé,...**

Mots clés Polyphénols, cacao, chocolat, vin, thé, récepteurs aux androgènes, cancer de la prostate, prolifération de cellules cancéreuses, (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, dimère B2, B5, (+)-épicatéchine, (-)-catéchine, [Ebaphlobanidol] ; techniques agroalimentaires, alimentation et santé.

Résumé

Nous avons dans un premier volet de notre travail isolé à l'état pur, identifié par RMN et par la masse, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, les procyanidines B2 et B5 des fèves fraîches de cacao, afin d'en investiguer les propriétés biologiques sur un nouveau mode d'action cellulaire au sein des cellules cancéreuses T47D lors de l'interaction de ces composés avec les récepteurs membranaires aux androgènes. Il ressort que ces composés sont de potentiels agonistes des récepteurs membranaires aux androgènes et pourraient être utilisés comme des protéines conjuguées de la testostérone pour le suivi de tumeurs dans lesquelles l'application de la testostérone-BSA induit une régression.

Le deuxième volet de notre contribution a été de faire la lumière sur le devenir des composés polyphénoliques présents dans nos aliments à savoir le vin, le thé et le chocolat après les différents traitements appliqués par l'industrie agroalimentaire et le bénéfice santé pour le consommateur.

Nous avons ainsi déterminé par CLHP (en phase reverse et phase chirale), la présence de la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, les dimères B2 et B5, dans l'extrait de chocolat ; puis d'un composé non naturel la (-)-catéchine dont les conséquences biologiques ne sont pas pour l'instant élucidées.

Nous avons par ailleurs, modifié par hémisynthèse trois des quatre molécules isolées du cacao et le dimère B2 isolé de l'extrait de pépins de raisin, puis isolé à l'état pur les énantiomères qui en résultent à savoir la (+)-épicatéchine, la (-)-catéchine et les produits issus du réarrangement de B2, que sont la (-)-épicatéchine, la (-)-catéchine et un phlobatannin : [Ebaphlobanidol] C7. Ces composés ont fait l'objet d'études biologiques, d'activité antioxydante et antiproliférative. Seule l'Ebaphlobanidol montre une activité antiproliférative satisfaisante sur les lignées cancéreuses U266 et Raji comparativement au resveratrol.

Ces résultats biologiques sont d'un grand concours pour éclairer l'opinion scientifique et les consommateurs du bénéfice santé réel des traitements des industries agroalimentaires face aux composés polyphénoliques chiraux, en plus de leur objectif premier de stimuler l'appétit par leurs saveurs, arômes et colorations.

A l'analyse des résultats obtenus dans le cadre de cette étude, spécifiquement sur le chocolat noir, qui contient en effet des polyphénols non naturels en plus des composés naturels et de l'Ebaphlobanidol C7, issu du réarrangement en milieu alcalin de B2 et de son activité sur les cellules U266.

Il nous semble très prometteur de continuer sur cette nouvelle lancée de recherche en se focalisant davantage sur les composés non naturels qui résultent des traitements de nos aliments et de s'évertuer à investiguer toutes les actions biologiques possibles afin de situer non seulement l'importance santé ou non des procédés de préparations, mais aussi de savoir si oui ou non il vaut mieux consommer par exemple du raisin que de boire du vin jeune ou vieux ; boire du thé vert ou plutôt du thé noir ?. En somme, lequel des aliments de quatrième ou de cinquième gamme est le plus bénéfique pour la santé de l'homme.